



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103739316 B

(45) 授权公告日 2015.04.22

(21) 申请号 201310743070.1

CN 102276301 A, 2011.12.14,

(22) 申请日 2013.12.30

CN 102212494 A, 2011.10.12,

(83) 生物保藏信息

审查员 马田田

CGMCC No. 7926 2013.07.15

CGMCC NO. 7927 2013.07.15

(73) 专利权人 沈岩

地址 200120 上海市浦东新区浦东南路
3843 号 307 室

(72) 发明人 杨大千 吴丽妍 沈岩

(74) 专利代理机构 深圳国鑫联合知识产权代理
事务所(普通合伙) 44324

代理人 邓扬

(51) Int. Cl.

C05F 11/08(2006.01)

(56) 对比文件

CN 102910971 A, 2013.02.06,

KR 10-1073986 B1, 2011.10.17,

CN 103304285 A, 2013.09.18,

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种微生物复合肥料

(57) 摘要

本发明公开了一种微生物复合肥料,涉及农业技术中的肥料;所述微生物复合肥料,由黑曲霉培养物、枯草芽孢杆菌菌剂组成,微生物复合肥料的重量份数组成为黑曲霉培养物 20-50 份、枯草芽孢杆菌菌剂 20-35 份;实验表明使用本品可提高粮食产量 8-30%,提高蔬菜产量 10-40%,还可改善蔬菜、粮食的品质和风味。每亩土地使用本发明的肥料的量为 50-100 克,是目前国内外使用量较少的微生物复合肥料之一。

1. 一种微生物复合肥料,由黑曲霉培养物和枯草芽孢杆菌菌剂组成,微生物复合肥料的重量份数组成为黑曲霉培养物 20-50 份、枯草芽孢杆菌菌剂 20-35 份,枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)Li-2013-02 保藏号为 CGMCC No. 7926,黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 保藏号为 CGMCC NO. 7927。

2. 根据权利要求 1 所述的微生物复合肥料,其特征在于,微生物复合肥料由黑曲霉培养物和枯草芽孢杆菌菌剂组成,微生物复合肥料的重量份数组成为黑曲霉培养物 40 份、枯草芽孢杆菌菌剂 20 份。

一种微生物复合肥料

技术领域：

[0001] 发明涉及农业技术中的肥料，涉及一种新型的微生物复合肥料。

背景技术：

[0002] 现有的生物肥料大多是单一性的生物肥料。如：固氮菌肥，主要由具有固氮作用的细菌和真菌组成；又如：磷细菌，其功能是分解土壤中的有机磷，使之变为易于被植物吸收的磷素；再如：细菌，其功能是分解土壤中的钾化合物，使之成为能被植物吸收利用的速效钾。这些肥料在单独使用时均能发挥各自作用，部分满足植物对氮，磷，钾三要素的需要。它们不会产生长期使用化肥所造成的土壤板结现象。但其不足在于：单独使用上述三类生物肥料只能解决植物所需营养的一个方面，且成本较高，用量大，同时，将三者配合使用，又因难于做到比例适当而造成施肥量的不足或浪费。长期使用单一的或复合的生物肥料的实践证明，它们只能替代化肥的 30% 以下。

发明内容：

[0003] 本发明的发明目的是提供一种能针对我国土壤肥力的基本情况，开发一种微生物复合肥料。

[0004] 本发明的技术解决方案是：

[0005] 一种微生物复合肥料，由黑曲霉培养物、枯草芽孢杆菌菌剂组成，微生物复合肥料的重量份数组成为黑曲霉培养物 20-50 份、枯草芽孢杆菌菌剂 20-35 份；

[0006] 一种生产微生物复合肥料的方法，将特选的黑曲霉培养物、枯草芽孢杆菌分别进行培养、发酵，然后将发酵产物按比例组合为微生物复合肥料。

[0007] 黑曲霉培养物制备：菌种培养，采用常见固体发酵培养方法：孢子液接种到固态发酵培养料中，26-33℃ 培养至菌丝长满培养料，低温流化床干燥，粉碎干燥物。

[0008] 有益效果：

[0009] 实验表明，使用本品可提高粮食产量 8-30%，提高蔬菜产量 10-40%，还可改善蔬菜、粮食的品质和风味。每亩土地使用本发明的肥料的量为 60-100 克，是目前国内外使用量较少的微生物复合肥料之一。

[0010] 每亩使用量为 80-200 克。在本发明微生物复合肥料中加入 120 倍的自来水和 6 倍的尿素，在 22℃ 以上 45℃ 以下的水温中活化 28 小时，然后连同化肥（按照上年使用量的 50%）洒入土壤中。最好作基肥，每年使用 1-3 次。

具体实施方式：

[0011] 下面的实施例可以使本专业技术人员更全面地理解本发明，但不以任何方式限制本发明。1、菌剂培养制备：

[0012] 枯草芽孢杆菌剂培养制备：枯草芽孢杆菌菌剂制备：从斜面转接培养枯草芽孢杆菌，逐级扩培后的种子液转接入发酵罐中，发酵完毕离心分离获得湿菌体和发酵液；发

酵完毕发酵液经低温负压真空浓缩到原体积的 40-50%，得到菌浓缩液。添加载体：向浓缩液中添加混合好的载体，混合均匀；浓缩液与载体的重量比为 0.5-0.7:1，载体组成为：CaCO₃20-40 份，糊精 10-20 份。流化床干燥，干燥温度 50℃。

[0013] 黑曲霉培养物制备：菌种培养，固体发酵培养：孢子液接种到固态发酵培养料中，26-35℃培养至菌丝长满培养料，低温流化床干燥，粉碎干燥物；

[0014] 本发明提供的产耐高温 α-淀粉酶的菌株具体为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)Li-2013-02。该菌株已于 2013 年 7 月 15 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC,地址为：中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号)，保藏号为 CGMCCNo. 7926。

[0015] 所述菌株特点如下：

[0016] 所述菌株在固体平板上菌落颜色为乳白色，表面干燥不透明，边缘整齐，为具有运动性的好氧菌。镜检为长杆状，革兰氏染色呈阳性。该菌可利用柠檬酸盐，硝酸还原、V-P 实验成阳性。

[0017] 所述枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)Li-2013-02 由一株保藏于本实验室的产耐高温 α-淀粉酶的枯草芽孢杆菌 Li-2013 经紫外线-氯化锂-硫酸二乙酯复合诱变筛选获得，具体筛选步骤如下：

[0018] (1) 菌悬液的制备

[0019] 将在平板划线分离后长出的 Li-2013 单菌落接入种子培养基中，100r/min, 40℃培养 12h 后，取 1mL 培养液离心后用生理盐水洗涤两次，并重悬与 9mL 生理盐水中。

[0020] (2) 紫外线-氯化锂-硫酸二乙酯复合诱变

[0021] 将菌悬液置于无菌平板中，在距离为 30cm，功率 15w 的紫外灯下搅拌照射 100s。将经过照射的菌液经梯度稀释后涂布于氯化锂平板，并以未经紫外照射的菌液稀释涂平板做对照。将上述涂布均匀的平板，用黑色的布或报纸包好，置 40℃培养 48h，在长出菌落的平板上筛选出水解圈与菌落直径比值最大者挑至斜面保存，纯化后配制成菌悬液，经梯度稀释后与硫酸二乙酯原液充分混合，并于 40℃震荡处理 40min，将处理过的菌液经梯度稀释后涂布于氯化锂平板。

[0022] (3) 高产菌种的初筛

[0023] 将上述涂布均匀的平板，置 40℃培养 48h，在长出菌落的平板上初筛出水解圈与菌落直径比值较大者挑至斜面保存，纯化后获得三株菌 Li-2013-01, Li-2013-02, Li-2013-03

[0024] (4) 摇瓶发酵复筛

[0025] 将获得的三株菌 Li-2013-01, Li-2013-02, Li-2013-03 在含有 30mL 发酵培养基的 250mL 摇瓶中进行摇瓶发酵，种子接种量 10% (V/V)，40℃、100r/min 培养 72h，离心取发酵上清液制得粗酶液。

[0026] (5) 酶活测定

[0027] 酶活单位的定义：1mL 粗酶液，于 105℃、pH4.2 条件下，1min 液化 1mg 可溶性淀粉，即为 1 个酶活力单位，以 U/mL 表示。

[0028] 经测定，菌株 Li-2013-02，为稳定的最高产菌株，且酶活达到 30000U/mL，比原始菌株酶活提高 1.6 倍。

[0029] 所述氯化锂平板：淀粉 1%，蛋白胨 1%，(NH)₂SO₄0.4%，K₂HPO₄0.8%，CaCl₂0.2%，氯

化锂 0.9%, 琼脂 2%。

[0030] 所述的种子培养基: 酵母粉 0.5%, 蛋白胨 1%, 可溶性淀粉 1%, NaCl 1%。

[0031] 所述的发酵培养基: 玉米粉 5%~15%, 豆饼粉 4%~10%, (NH)₂SO₄ 0.4%, K₂HPO₄ 0.8%, CaCl₂ 0.2%。

[0032] 所述的摇瓶培养条件: 该菌在含有 30mL 发酵培养基的 250mL 摇瓶中, 接种量 10% (V/V), 100r/min、40℃ 发酵培养 72h。

[0033] 由菌株 Li-2013-02 发酵获得了一种耐高温的 α-淀粉酶, 其酶学性质如下:

[0034] (1) 该酶温度适应范围较宽, 最适作用温度在 105-115℃ 之间, 且在 110℃ 以下保存的温度稳定性较好, 而 115℃ 以上保存长时间温度稳定性较差。

[0035] (2) 该酶最适反应 pH 值为 4.2。在 pH 值 3.0-7.0 之间均有较高酶活力, 在 pH 值为 3.0 时酶活完全稳定。

[0036] (3) 酶活性: 由本发明所提供的突变株 Li-2013-02, 制备的耐高温 α-淀粉酶酶活力为 30000-35000U/ml。

[0037] 1、本发明使用紫外线-氯化锂-硫酸二乙酯复合诱变的方法获得了一株高产耐高温 α-淀粉酶的枯草芽孢杆菌 Li-2013-02, 该菌株具有强耐酸、耐热性, 产酶活力高的特点。

[0038] 2、有该菌株生产所得的耐高温 α-淀粉酶酶活力高达 30000-35000u/ml, ; 适用温度范围为 25-115℃, 最适反应温度 110℃, 在 110℃ 酶活完全稳定; 适用反应 pH 值范围为 3.0-7.0, 在 pH 值为 3.0 时酶活完全稳定, 最适反应 pH 值为 4.2, 比现有的耐高温 α-淀粉酶酶活力高, 酶作用最适 pH 值范围宽泛, 耐温度高, 特别适合反应温度高、液化工艺与糖化工艺并存的工业化需求。

[0039] 本发明提供的黑曲霉菌株 *Aspergillus niger* Li-2013-03 是由实验室保藏的一株产纤维素酶产的黑曲霉 *Aspergillus niger* Li-2010 经多轮亚硝基胍诱变, 然后对突变株逐级筛选淘汰, 最后对优良菌株经发酵性能测试筛选得到产高活力纤维素酶的黑曲霉菌株 *Aspergillus niger* Li-2013-03。

[0040] 本发明提供的产高活力纤维素酶的菌株具体为黑曲霉 *Aspergillus niger* Li-2013-03。该菌株已于 2013 年 7 月 15 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC, 地址为: 中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 邮编 100101), 保藏号为 CGMCC NO. 7927。

[0041] 产高活力纤维素酶菌株的筛选方法, 包括以下步骤:

[0042] 1) 斜面培养: 将原始黑曲霉菌株 *Aspergillus niger* Li-2010 划线接种斜面培养基, 30℃ 培养 2~3d, 直至菌丝体成熟、产大量黑色孢子。所述斜面培养基组成如下: 12°Brix 麦芽汁 1000mL, pH 值自然, 121℃ 灭菌 20min;

[0043] 2) 孢子悬液制备(以下步骤均在无菌条件下操作): 向试管斜面加入 15mL 无菌水, 把孢子刮下, 用滤纸过滤, 将滤过液倒入已灭菌、并加有 5-10 粒无菌玻璃珠的 150mL 三角瓶中, 将三角瓶放入摇床振荡 10-15min, 使孢子分散。

[0044] 3) 亚硝基胍 (NTG) 诱变

[0045] A. 用无菌水将孢子悬浮液调节为稀释成 10⁶-10⁷个/mL。

[0046] B. 取 10mL 菌悬液转移至 100mL 三角瓶中, 加入 10mg 的 NTG, 配制成终浓度为 10mg/

mL 的 NTG 溶液, 并加入 4-5 滴丙酮, 以利于 NTG 溶解。

[0047] C. 在 30℃ 下 200rpm 振荡反应 30min, 5000rpm 离心 10min 收集菌体, 用无菌生理盐水洗涤数次, 中止反应。

[0048] D. 适当稀释将孢子浓度调节为 10^3 个 / mL, 取最后稀释度的菌液 0.2mL, 稀释涂布于纤维素 - 刚果红平板筛选培养基上。在 30℃ 培养 2 ~ 3 天后挑取透明圈 / 菌落直径较大的菌株 200 支。(所述纤维素 - 刚果红平板筛选培养基组成如下: 纤维素粉 10g、刚果红 0.2g、硫酸铵 5g、硫酸镁 0.25g、磷酸二氢钾 1g、氯化钠 0.1g、明胶 2g、琼脂 20g、自来水定容 1000mL, pH 值 5-6, 121℃ 灭菌 20min)。

[0049] E. 复筛: 将获得的 200 株菌分别用无菌牙签接种于斜面培养基, 30℃ 培养至孢子铺满斜面。分别将孢子以无菌水洗下接种于装有 50mL 复筛培养基的 250mL 三角瓶中进行发酵, 接种量 10% (v/v), 30℃、100r/min 培养 96h, 分别测定各菌株的纤维素酶活性。(所述复筛培养基组成如下: 纤维素粉 50g、硫酸铵 5g、硫酸镁 0.25g、磷酸二氢钾 1g、氯化钠 0.1g、自来水定容 1000mL, pH 值 5-6, 121℃ 灭菌 20min)。选取纤维素酶活力最高的菌株进行放大实验。

[0050] 4) 遗传稳定性试验

[0051] 将 Li-2013-03 菌株在斜面上连续十次传代, 并用摇瓶复筛的方法检测每次传代后的发酵情况。实验发现, 在斜面上连续十次传代, 该菌种性状没有明显变化, 各项性能指标都正常, 说明该菌种的遗传稳定性较强。

[0052] 5) 放大试验

[0053] ①种子培养: 将纤维素酶活力最高的菌株 *Aspergillus niger* Li-2013-03 接入 500mL 三角瓶中, 种子培养基装量 100 毫升, 30℃、150rpm 摇床培养 72-96h。

[0054] ③种子罐培养: 将种子液以 10% (v/v) 接种量接入装有 7.5L 发酵液的 10L 发酵罐中, 控制 pH 值恒定为 6.0 ± 0.2 , 培养温度 30 ± 0.1 ℃, 搅拌速度 300rpm, 通风量 (v/v) 1:0.8-1.2, 培养时间 96h, 溶解氧 20-30%。所述发酵培养基组成为: 纤维素粉 100g、硫酸铵 5g、硫酸镁 0.25g、磷酸二氢钾 1g、氯化钠 0.1g、自来水定容 1000mL, pH 值 5-6, 121℃ 灭菌 20min。

[0055] 发酵结束后, 取发酵上清液 (粗酶液) 进行酶活力检测经测定, 菌株 *Aspergillus niger* Li-2013-03 的外切 β -葡聚糖酶、内切 β -葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶和滤纸酶活力分别达到 620U/mL、1289U/mL、456U/mL 和 732U/mL, 分别比出发菌株 *Aspergillus niger* Li-2010 提高了 9.21 倍、7.43 倍、8.15 倍和 10.31 倍。

[0056] 实施例 1

[0057] 一种微生物复合肥料, 由黑曲霉培养物和枯草芽孢杆菌菌剂组成, 微生物复合肥料的重份数组成成为黑曲霉培养物 40 份、枯草芽孢杆菌菌剂 20 份;

[0058] 本发明产品的具体生产方法步骤如下:

[0059] 菌剂培养制备:

[0060] 枯草芽孢杆菌菌剂培养制备: 枯草芽孢杆菌菌剂制备: 从斜面转接培养枯草芽孢杆菌, 逐级扩培后的种子液转接入发酵罐中, 发酵完毕离心分离获得湿菌体和发酵液; 发酵完毕发酵液经低温负压真空浓缩到原体积的 50%, 得到菌浓缩液。添加载体: 向浓缩液中添加混合好的载体, 混合均匀; 浓缩液与载体的重量比为 0.6:1, 载体组成为: CaCO_3 30 份, 糊精

15 份。流化床干燥,干燥温度 50℃。

[0061] 黑曲霉培养物制备:菌种培养,固体发酵培养:孢子液接种到固态发酵培养料中,30℃培养至菌丝长满培养料,低温流化床 45℃干燥,粉碎干燥物;

[0062] 采用的菌种如下:

[0063] 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* subsp) CGMCC7926

[0064] 上述菌种的保藏单位是中国普通微生物菌种保藏管理中心。地址:中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号;邮编:100101。

[0065] 黑曲霉培养物的制备方法:

[0066] 技术方案如下:

[0067] 斜面菌种活化培养:将黑曲霉斜面菌种转接到斜面培养基上,27℃培养 3 天。

[0068] 固体一级种子培养:挑取黑曲霉斜面菌种接入装有 100 克培养基的 500 毫升三角瓶中进行种子培养,30℃培养 3 天即可。

[0069] 固体二级种子培养:将上述培养好的固体一级种子搅拌为碎块后加入装有 1000 克培养基的 5000 毫升三角瓶中进行种子培养,培养条件:30℃培养 3 天即可。

[0070] 固体发酵培养:将二级摇瓶种子粉碎,加入装有灭菌培养基的发酵池或托盘中混合均匀后培养,曲料培养温度控制在 26-35℃,湿度 80-90%,每隔 10 小时翻料一次,培养时间 5-7 天;固体曲料的培养采用常用曲料培养技术;待培养料长满菌丝即可结束培养,培养基预先经高温蒸煮灭菌处理,灭菌条件控制温度 121℃,时间 1 小时。

[0071] 干燥粉碎:发酵结束培养料在流化床或其他干燥设备上干燥,干燥温度控制在 60℃,干燥到水分含量在 10% 以下,然后将固体培养料进行粉碎,物料粉碎孔径在 60 目以上。

[0072] 培养基组成:固体原料:麸皮 70%,粉碎的作物秸秆 15%,豆饼粉 5%,玉米淀粉 10%,添加等量自来水;初始 pH 自然。

[0073] 枯草芽孢杆菌的制备方法:

[0074] 1. 发酵液的获得:采用斜面菌种逐级扩培获得枯草芽孢杆菌发酵液;

[0075] (1) 一级种子培养:将枯草芽孢杆菌斜面菌种接入 500 毫升摇瓶中,培养基装量 100 毫升,旋转式摇床 180 转/分,培养温度 30℃,培养时间 24 小时;

[0076] (2) 二级种子培养:将一级种子按照 10% 的接种量接入 500 毫升二级种子摇瓶中,培养条件与一级种子相同;

[0077] (3) 三级种子培养:将二级种子以 10% 接种量接入 5000 毫升三级种子摇瓶中,培养基装量 1000 毫升,旋转式摇床 100 转/分,培养温度 30℃,培养时间 24 小时;

[0078] (4) 一级种子罐培养:将三级种子以 10% 接种量接入总容积为 150L 的一级种子罐,发酵培养基装量 100L,培养温度 28℃,搅拌速度 100 转/分,通风量(V/V) 1:0.5,罐压 0.05Mpa,培养时间 24 小时;

[0079] (5) 发酵培养:将一级种子罐菌种以 10% 接种量接入总容积为 1.5 吨二级种子罐,发酵培养基装量 1 吨,培养条件培养温度 28℃,搅拌速度 100 转/分,通风量(V/V) 1:0.5,罐压 0.05Mpa,培养时间 24 小时。

[0080] 培养基组成:葡萄糖 6%,酵母提取物 1%,蛋白胨 0.2%,CaCO₃ 1%,pH6.8。

[0081] 试验地的选择与试验设计:试验于 2012 年 3 月 27 日—9 月 30 日在宁夏盐池县花

马池镇八堡村进行。

[0082] 试验田达到田种植玉米 10 亩,分别在种植时使用本发明产品每亩 0.1 公斤,出苗 1 个月左右通过锄地松土方式使用发明产品 0.7 公斤,对照组使用常规肥料。

[0083] 发明产品使用玉米地玉米产量达到 650 公斤,对照组达到 520 公斤;该地块在第 2 年种植春小麦,春小麦产量达到了 410 公斤,比对照组单产提高了 20%。且试验田土壤结构良好,无大块和板结。