



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104341183 A

(43) 申请公布日 2015.02.11

(21) 申请号 201410486023.8

(22) 申请日 2014.09.22

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO. 9405 2014.07.02

(71) 申请人 北京科慧通智慧科技有限公司

地址 100176 北京市大兴区经济技术开发区
荣华中路5号院1号楼10层101

(72) 发明人 孔日祥 李建树

(51) Int. Cl.

C05F 11/08 (2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

(54) 发明名称

一种生物菌肥制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种生物菌肥制备方法,属于农用肥料技术领域,所述生物菌肥制备方法如下:将植物乳杆菌剂,解磷菌剂,解钾菌剂,枯草芽孢杆菌培养物,泡盛曲霉培养物按照比例混合均匀;投入制粒机造粒,粒径控制在0.5-2毫米,然后使肥料颗粒黏附添加潮湿态的聚谷氨酸,随后控制温度在30-40度保持1-3小时。其中:植物乳杆菌剂20-35份,解磷菌剂1-2份,解钾菌剂2-4份,枯草芽孢杆菌培养物10-15份,泡盛曲霉培养物8-15份,聚谷氨酸5-8。本发明的肥料能够增强作物的抗旱能力;改善土壤物理性状,增加肥料的使用效率,有利于提高土壤肥力;调节土壤酸碱平衡,降低土壤中亚硝酸盐等有害物质污染。

1. 一种生物菌肥制备方法,其特征在于,将植物乳杆菌剂,解磷菌剂,解钾菌剂,枯草芽孢杆菌培养物,泡盛曲霉培养物按照比例混合均匀;投入制粒机造粒,粒径控制在0.5-2毫米,然后使肥料颗粒黏附添加潮湿态的聚谷氨酸,随后控制温度在30-40度保持1-3小时;所述生物菌肥重量份数组成为:植物乳杆菌剂20-35份,解磷菌剂1-2份,解钾菌剂2-4份,枯草芽孢杆菌培养物10-15份,泡盛曲霉培养物8-15份,聚谷氨酸5-8份。

2. 根据权利要求1所述生物菌肥制备方法,其特征在于,所述聚谷氨酸为 γ -聚谷氨酸。

3. 根据权利要求1-2所述生物菌肥制备方法,其特征在于,枯草芽孢杆菌为CGMCC7926,植物乳杆菌为CGMCC9405;泡盛曲霉为CGMCC3.6484。

4. 根据权利要求1.2.3所述生物菌肥的制备方法,其特征在于,生物菌肥重量份数组成为:植物乳杆菌剂25份,解磷菌剂1份,解钾菌剂3份,枯草芽孢杆菌培养物12份,泡盛曲霉培养物10份,聚谷氨酸6份。

5. 根据权利要求1-3所述生物菌肥的制备方法,其特征在于,生物菌肥重量份数组成为:植物乳杆菌剂20份,解磷菌剂2份,解钾菌剂2份,枯草芽孢杆菌培养物15份,泡盛曲霉培养物8份,聚谷氨酸5份。

6. 根据权利要求1.2.3所述生物菌肥的制备方法,其特征在于,生物菌肥重量份数组成为:植物乳杆菌剂35份,解磷菌剂2份,解钾菌剂2份,枯草芽孢杆菌培养物10份,泡盛曲霉培养物15份,聚谷氨酸8份;所述聚谷氨酸为 γ -聚谷氨酸。

一种生物菌肥制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于农用肥料技术领域,特别涉及一种生物菌肥制备方法。

背景技术

[0002] 微生物肥是一种以微生物生命活动及其产物导致农作物得到特定肥料效应的微生物活体制品,它在培肥地力、提高化肥利用率、抑制农作物对重金属及农药等有害物质的吸收、净化和修复土壤、促进农作物秸秆和城市垃圾的腐熟利用、提高农产品品质等方面有着不可替代的作用。微生物肥料就有了化肥、有机肥、有益生物菌的多种肥力和功效,是活化肥料养分、提高肥料效果、改良作物品质、促进农业增产增效的理想肥料。微生物肥料是活体肥料,它的作用主要靠它含有的大量有益微生物的生命活动来完成。只有当这些有益微生物处于旺盛的繁殖和新陈代谢的情况下,物质转化和有益代谢产物才能不断形成。因此,微生物肥料中有益微生物的种类、生命活动是否旺盛是其有效性的基础,而不像其它肥料是以氮、磷、钾等主要元素的形式和多少为基础。正因为微生物肥料是活制剂,所以其肥效与活菌数量、强度及周围环境条件密切相关,包括温度、水分、酸碱度、营养条件及原生活在土壤中土著微生物排斥作用都有一定影响。

[0003] 公布号为 CN102888356A 的专利申请,公开了一种利用枯草芽孢杆菌制备微生物肥料的方法及其应用。虽然目前市场上已出现一些复合微生物菌剂,但其或者功能单一,或者其使用方法受到限制,使用后的作物增产效果还不能达到令人满意,所以目前仍需要开发适用于多种施用途径、具有综合功能和良好增产效果的复合微生物菌剂或肥料。发明名称为一种大颗粒教槽料及其制备方法,专利申请号:201410040955.X 公开了枯草芽孢杆菌 CGMCCNo. 7926。

[0004] 我国的微生物肥料产业依然存在整体水平不高、技术创新不足、产品质量与应用效果表现欠稳定的问题。

发明内容

[0005] 本发明提供一种生物菌肥制备方法,将植物乳杆菌剂,解磷菌剂,解钾菌剂,枯草芽孢杆菌培养物,泡盛曲霉培养物按照比例混合均匀;投入制粒机造粒,粒径控制在 0.5-2 毫米,然后使肥料颗粒黏附添加潮湿态的聚谷氨酸,随后控制温度在 30-40 度保持 1-3 小时;所述生物菌肥重量份数组成为:植物乳杆菌剂 20-35 份,解磷菌剂 1-2 份,解钾菌剂 2-4 份,枯草芽孢杆菌培养物 10-15 份,泡盛曲霉培养物 8-15 份,聚谷氨酸 5-8。

[0006] 所述聚谷氨酸为 γ -聚谷氨酸。

[0007] 所述枯草芽孢杆菌培养物制备: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,发酵完毕发酵液经过板框过滤、干燥后获得枯草芽孢杆菌培养物。

[0008] 植物乳杆菌剂的制备方法:从斜面转接培养植物乳杆菌,逐级扩培后的种子液转接入发酵罐中,发酵完毕发酵液经低温负压真空浓缩到原体积的 45%,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 0.5-0.6:1,载

体组成为 :CaCO₃20-30 份,糊精 10-15 份。流化床干燥,干燥温度 50℃。

[0009] 泡盛曲霉培养物制备 :菌种培养,固体发酵培养 :孢子液接种到米曲霉固态发酵培养料中,26-33℃培养至菌丝长满培养料,低温流化床干燥,粉碎干燥物。

[0010] 所述高效微生物肥制备方法如下 :按照上述比例将各种菌剂混合,或混合后制粒。

[0011] 本发明采用的菌种如下 :

[0012] 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* subsp)CGMCC7926 ;

[0013] 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)CGMCC9405 ;

[0014] 泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*)CGMCC3.6484 ;

[0015] 上述三种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 :北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所,邮编 100101。

[0016] 解磷菌为解磷巨大芽孢杆菌,解磷菌剂由沧州旺发生物技术研究所提供,地址 :中国河北沧州市运河区解放西路颐和国际商务中心 A 座 1 区 807-812。

[0017] 解钾菌由广州市微元生物科技有限公司提供,地址 :广州市萝岗区科学大道 101 号 506。

[0018] 本发明中植物乳杆菌 CGMCC9405 菌株特点如下 :在显微镜下观察,该菌株为短杆状,革兰氏染色呈阳性,无鞭毛,不产芽孢 ;在固体培养基上,该菌菌落为白色,表面光滑,致密,形态为圆形,边缘较整齐。

[0019] 理化特征为 :过氧化氢酶 (-),明胶液化 (-),吲哚实验 (+),运动性 (-),发酵产气 (-),亚硝酸盐还原 (-),发酵产气 (-),产硫化氢气体 (-),pH4.0MRS 培养基中生长 (+)。

[0020] 本发明植物乳杆菌采用下述流程进行选育 :

[0021] 原始出发菌种→试管活化→硫酸二乙酯 (DES) 诱变→亚硝基胍 (NTG) 诱变→等离子体诱变→平板初筛→摇瓶复筛→传代稳定性试验。

[0022] 本发明所采用的出发菌株在 MRS 葡萄糖培养基中,其乳酸的生产速率为 1.5g/L/d,当培养基 pH 为 3.5 时几乎停止生长,对亚硝酸钠的分解速率为 0.34mg/h/kg 白菜。出发菌株为李政采集于宁夏盐池县育肥羊场的青储饲料,采集时间 2013 年 9 月 15 日。

[0023] 为了提高其乳酸生产速率、耐酸能力和亚硝酸盐的分解速率,依次采用 DES 和 NTG 技术对该菌种进行诱变,诱变后菌株采用 MRS 碳酸钙平板进行初筛,然后采用 500mL 摇瓶发酵,生物传感器分析仪对高产菌进行复筛,选育优良的植物乳杆菌菌株,然后做传代实验,评价其遗传稳定性。

[0024] 植物乳杆菌 t1j-2014 遗传稳定性结果表明 :经过连续传代十次,各项性能指标都比较稳定,遗传性较好,性状没有回复,因此把植物乳杆菌 t1j-2014 作为选育得到的目的菌株。

[0025] 经验证发现 :该诱变菌株的乳酸生产速率可以达到 35g/L/d,该菌株经过 71 小时发酵后乳酸浓度达到 95g/L ;能够在 pH 为 1.80 的条件下存活。降解亚硝酸盐速度快,分解能力达到 9.8mg/h/kg (自然发酵过程亚硝酸盐积累的速率大约为 1.1mg/h/kg),能够耐 1% 胆盐。

[0026] 因此采用该菌种生产泡菜,整个发酵过程中亚硝酸盐浓度在 5mg/kg 以下,远低于国家标准 GB2714-2003 中规定的含量 (20mg/kg)。

[0027] 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)t1j-2014,该菌株已于 2014 年 7 月 2 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. 9405。

[0028] 1. DES 诱变选育

[0029] 1) 在超净台上取试管斜面上的植物乳杆菌 L 一环，接入装有 50mL 培养基 MRS（无琼脂，葡萄糖 20g/L）培养基的 250mL 三角瓶中，200rpm，37℃培养 12h 左右，使菌体处于对数生长前期。

[0030] 2) 取 5mL 菌液，5000rpm 离心 10min 收集菌体，用生理盐水洗涤 2 次。

[0031] 3) 用 pH7.0 磷酸缓冲液稀释成 10^7 个/mL 菌悬液。

[0032] 4) 取 32mL pH7.0 的磷酸钾缓冲液、8mL 菌悬液、0.4mL DES 在预先放入转子的 150mL 三角瓶中充分混合，使 DES 最终浓度为 1% (v/v)。

[0033] 5) 在 37℃摇床中 150rpm 反应 30min，取 1mL 混合液，加入 0.5mL 25% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液中中止反应。

[0034] 6) 适当稀释，取最后稀释度的菌液 0.2mL，涂布于碳酸钙筛选培养基（含 100g/L 葡萄糖的碳酸钙 MRS 培养基）平皿中。在 37℃培养 2~3 天后，采用影印法将该筛选平板的菌株转印到 pH 为 1.5、1.8 和 2.0 的 LPHMRS 培养基（低 pH 值改性 MRS 培养基）上和亚硝酸钠筛选培养基（单一氮源为 2g/L 亚硝酸钠的改性 MRS 筛选培养基）上。

[0035] 7) 在 37℃培养 2~3 天后，挑选菌落较大，分别能在 LPHMRS 培养基、亚硝酸钠筛选培养基上生长并且在碳酸钙筛选培养基上。经初步筛选，挑取出的菌落命名为植物乳杆菌 L1。

[0036] 2. 亚硝基胍诱变

[0037] 1) 在超净台上取试管斜面上的植物乳杆菌 L1 一环，接入装有 50mL 培养基 MRS（无琼脂）培养基（葡萄糖浓度为 60g/L）的 250mL 三角瓶中，200rpm，37℃培养 12h 左右，使菌体处于对数生长前期。

[0038] 2) 取 5mL 菌液 5000rpm 离心 10min 收集菌体，用生理盐水洗涤 2 次。

[0039] 3) 用 pH6.0 磷酸缓冲液稀释成 10^7 个/mL 菌悬液。

[0040] 4) 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。

[0041] 5) 在 37℃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。

[0042] 6) 适当稀释，取最后稀释度的菌液 0.2mL，涂布于碳酸钙筛选培养基（含 100g/L 葡萄糖的碳酸钙 MRS 培养基）平皿中。在 37℃培养 2~3 天后，采用影印法将该筛选平板的菌株转印到 pH 为 1.5、1.8 和 2.0 的 LPHMRS 培养基（低 pH 值改性 MRS 培养基）上和亚硝酸钠筛选培养基（单一氮源为 2g/L 亚硝酸钠的改性 MRS 筛选培养基）上。

[0043] 7) 挑选菌株方法：挑选菌落较大，分别能在 LPHMRS 培养基、亚硝酸钠筛选培养基上生长并且在碳酸钙筛选培养基上。经初步筛选，挑取 100 支符合以上条件的菌落。

[0044] 3. 摇瓶复筛

[0045] 1) 在超净台上分别取各试管斜面上的植物乳杆菌一环，接入装有 50mL 培养基 MRS（无琼脂）培养基（葡萄糖浓度为 100g/L）的 250mL 三角瓶中，200rpm，37℃培养 15h 左右，使菌体处于对数生长中期。

[0046] 2) 分别取 5mL 菌液, 接入装有 50mL 碳酸钙筛选液体培养基 (含 250g/L 葡萄糖的碳酸钙 MRS 培养基) 平皿中、pH 为 1.5、1.8 和 2.0 的 LPHMRS 液体培养基 (低 pH 值改性 MRS 培养基) 和亚硝酸钠液体筛选培养基 (单一氮源为 2g/L 亚硝酸钠的改性 MRS 筛选培养基) 上 (注: 采用 250mL 三角瓶)。200rpm, 37°C 培养 3-4 天, 每天分别检测碳酸钙筛选液体培养基中 L- 乳酸产生速率、LPHMRS 液体培养基中的生物量和亚硝酸钠液体筛选培养基中亚硝酸盐的消耗速率。发酵结束后, 比较 100 株菌种的碳酸钙筛选液体培养基中 L- 乳酸产生速率、LPHMRS 液体培养基中的生物量和亚硝酸钠液体筛选培养基中亚硝酸盐的消耗速率。

[0047] 3) 选择兼具高 L- 乳酸产生速率、耐受低 pH (该菌种仅能在最低为 pH1.8 的培养基中生长) 和亚硝酸盐的消耗速率高的菌株, 将其命名为 L2 菌。

[0048] 4. 遗传稳定性试验

[0049] 将 L2 菌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。菌株命名为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) t1j-2014。

[0050] 5. 5L 发酵罐试验

[0051] 1) 取斜面上的植物乳杆菌 L2 一环, 接入装有 50mL 培养基 MRS (无琼脂) (葡萄糖浓度为 150g/L) 培养基的 250mL 三角瓶中, 200rpm, 37°C 培养 12h 左右, 使菌体处于对数生长中期。

[0052] 2) 将对数期的菌种接入装有 3L MRS 液体培养基 (初始葡萄糖为 150g/L) 的 5L 发酵罐中。接种量为 10%, 37°C 下 100rpm 培养 8 小时, 对数前期溶氧控制 10% (通气 0.5L/min), 后期厌氧培养 63 小时。发酵结束后, 植物乳杆菌 L2 的乳酸产量达到 95g/L。这样的产乳酸速率利于缓冲平衡土壤的碱性, 调节土壤酸碱平衡。

[0053] 3) 将对数期的菌种接入装有 3L pH 为 1.8 的 LPHMRS 液体培养基 (初始葡萄糖为 50g/L) 的 5L 发酵罐中。接种量为 10%, 37°C 下 100rpm 培养 8 小时, 对数前期溶氧控制 10% (通气 0.5L/min), 后期厌氧, 整个过程用 0.5mol/L 的氢氧化钠将发酵液 pH 控制在 1.8, 总培养时间为 48 小时。发酵结束后, 检测植物乳杆菌 L2 的生物量为 2.5g/L, 说明植物乳杆菌 L2 能够在 pH1.8 的环境中生存。

[0054] 4) 将对数期的菌种接入装有 3L 亚硝酸钠液体筛选培养基 (单一氮源为 2g/L 亚硝酸钠的改性 MRS 筛选培养基) 的 5L 发酵罐中。接种量为 10%, 37°C 下 100rpm 培养 8 小时, 对数前期溶氧控制 10% (通气 0.5L/min), 后期厌氧, 发酵过程根据亚硝酸盐的消耗速率流加 20g/L 的亚硝酸钠溶液, 培养 2-3 天。发酵结束后, 计算发酵过程植物乳杆菌 L2 对亚硝酸钠的降解速率。结果发现: 在该条件下, L2 对亚硝酸钠的降解速率可以达到 563mg/h/L。

[0055] 5) 将对数期的菌种 10mL 接入装有 2kg 预处理过的白菜中, 按照传统泡菜方法进行加工, 每 12 小时测定泡菜中的亚硝酸盐含量。结果发现, 在整个发酵过程中, L2 菌对亚硝酸钠的分解速率为 9.8mg/h/kg 白菜。泡菜中的亚硝酸钠含量始终低于 5mg/kg, 远低于国家标准 GB2714-2003 中规定的含量 (20mg/kg)。

[0056] 有益效果

[0057] 本发明的肥料能够增强作物的抗旱能力。本发明的聚谷氨酸能提高植物保水能

力;能促进土壤团粒结构形成,破坏土壤毛细现象,防止土壤水分蒸发。本发明的肥料能够改良土壤。肥料中有益微生物能产生糖类物质与植物粘液,矿物胚体和有机胶体结合在一起,可以改善土壤团粒结构,增强土壤的物理性能和减少土壤颗粒的损失,还能参与腐殖质形成。所以施用微生物肥料能改善土壤物理性状,有利于提高土壤肥力。

[0058] 采用本发明所述方法制备的肥料,外表面的聚谷氨酸在遇水后形成类似水凝胶,可以使肥料颗粒中菌剂达到缓慢释放的效果,增加肥料的使用效率。试验验证,这种方法制备肥料比同样对照产品能提高粮食产量 13-28%,比同类产品可以减少灌溉用水 15%以上。

[0059] 本发明植物乳杆菌产酸能力强,缓冲平衡土壤的碱性,调节土壤酸碱平衡。

[0060] 本发明植物乳杆菌降解亚硝酸盐速度快,可降低土壤中氨氮,亚硝酸盐等有害物质污染。

[0061] 本产品使用方法简单,每亩地使用量 0.5-1 公斤,成本仅为 70-100 元/亩,拌种或生长期灌水前地表喷洒。

[0062] 土壤生物酶的转化,在降低农业生产成本、减少化肥的使用、恢复土壤生态地力和有效提高农作物产量等方面均能起到显著的作用,充分发挥土壤的有机质效能。

具体实施方式

[0063] 除非特别说明,本发明中所用的技术手段均为本领域技术人员所公知的方法。另外,实施方案应理解为说明性的,而非限制本发明的范围,本发明的实质和范围仅由权利要求书所限定。对于本领域技术人员而言,在不背离本发明实质和范围的前提下,对这些实施方案中的反应条件、分离提取条件进行的各种改变或改动也属于本发明的保护范围。

[0064] 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。实施例 1

[0065] 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 CGMCC No. 7926。

[0066] 所述菌株特性是产耐高温 α -淀粉酶的酶活力高,耐热、耐酸性强。

[0067] 所述菌株制备的耐高温 α -淀粉酶酶活力为 30000-35000u/ml;适用温度范围为 105-115 $^{\circ}$ C,最适反应温度 110 $^{\circ}$ C,在 110 $^{\circ}$ C 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。

[0068] 所述菌株特点如下:

[0069] 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。

[0070] 所述枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)Li-2013-02 由一株产耐高温 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:

[0071] (1) 菌悬液的制备

[0072] 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 $^{\circ}$ C

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。

[0073] (2) 紫外线 - 氯化锂 - 硫酸二乙酯复合诱变

[0074] 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。

[0075] (3) 高产菌种的初筛

[0076] 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。

[0077] (4) 摇瓶发酵复筛

[0078] 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。

[0079] (5) 酶活测定

[0080] 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,

[0081] 即为 1 个酶活力单位,以 U/mL 表示。

[0082] 经测定,菌株 Li-2013-02,为稳定的最高产菌株,且酶活达到 30000U/mL。

[0083] 所述氯化锂平板:淀粉 1%,蛋白胨 1%, $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ 0.4%, K_2HPO_4 0.8%, CaCl_2 0.2%,氯化锂 0.9%,琼脂 2%。

[0084] 所述的种子培养基:酵母粉 0.5%,蛋白胨 1%,可溶性淀粉 1%,NaCl1%。

[0085] 所述的发酵培养基:玉米粉 5% -15%,豆饼粉 4% -10%, $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ 0.4%, K_2HPO_4 0.8%, CaCl_2 0.2%。

[0086] 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。

[0087] 所述耐高温的 α -淀粉酶,其酶学性质如下:

[0088] (1) 该酶温度适应范围较宽,最适作用温度在 100-110℃ 之间,且在 110℃ 以下保存的,温度稳定性较好,而 110℃ 以上保存长时间温度稳定性较差。

[0089] (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。

[0090] (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。

[0091] 本发明所提供的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) t1j-2014 采用下述流程进行选育:

[0092] 原始出发菌种→试管活化→硫酸二乙酯 (DES) 诱变→亚硝基胍 (NTG) 诱变→等离子体诱变→平板初筛→摇瓶复筛→传代稳定性试验。

[0093] 本发明所采用的出发菌株在 MRS 葡萄糖培养基中,其乳酸的生产速率为 1.5g/L/

d, 当培养基 pH 为 3.5 时几乎停止生长, 对亚硝酸钠的分解速率为 0.34mg/h/kg 白菜。出发菌株为李政采集于宁夏盐池县育肥羊场的青储饲料, 采集时间 2013 年 9 月 15 日。

[0094] 为了提高其乳酸生产速率、耐酸能力和亚硝酸盐的分解速率, 依次采用 DES 和 NTG 技术对该菌种进行诱变, 诱变后菌株采用 MRS 碳酸钙平板进行初筛, 然后采用 500mL 摇瓶发酵, 生物传感器分析仪对高产菌进行复筛, 选育优良的植物乳杆菌菌株, 然后做传代实验, 评价其遗传稳定性。

[0095] 植物乳杆菌 t1j-2014 遗传稳定性结果表明: 经过连续传代十次, 各项性能指标都比较稳定, 遗传性较好, 性状没有回复, 因此把植物乳杆菌 t1j-2014 作为选育得到的目的菌株。

[0096] 经验证发现: 该诱变菌株的乳酸生产速率可以达到 35g/L/d, 该菌株经过 71 小时发酵后乳酸浓度达到 95g/L; 能够在 pH 为 1.80 的条件下存活。降解亚硝酸盐速度快, 分解能力达到 9.8mg/h/kg (自然发酵过程亚硝酸盐积累的速率大约为 1.1mg/h/kg), 能够耐 1% 胆盐。

[0097] 因此采用该菌种生产泡菜, 整个发酵过程中亚硝酸盐浓度在 5mg/kg 以下, 远低于国家标准 GB2714-2003 中规定的含量 (20mg/kg)。

[0098] 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) t1j-2014, 该菌株已于 2014 年 7 月 2 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. 9405。

[0099] 1. DES 诱变选育

[0100] 1) 在超净台上取试管斜面上的植物乳杆菌 L 一环, 接入装有 50mL 培养基 MRS (无琼脂, 葡萄糖 20g/L) 培养基的 250mL 三角瓶中, 200rpm, 37°C 培养 12h 左右, 使菌体处于对数生长前期。

[0101] 2) 取 5mL 菌液, 5000rpm 离心 10min 收集菌体, 用生理盐水洗涤 2 次。

[0102] 3) 用 pH7.0 磷酸缓冲液稀释成 10^7 个/mL 菌悬液。

[0103] 4) 取 32mL pH7.0 的磷酸钾缓冲液、8mL 菌悬液、0.4mL DES 在预先放入转子的 150mL 三角瓶中充分混合, 使 DES 最终浓度为 1% (v/v)。

[0104] 5) 在 37°C 摇床中 150rpm 反应 30min, 取 1mL 混合液, 加入 0.5mL 25% Na₂S₂O₃ 溶液中中止反应。

[0105] 6) 适当稀释, 取最后稀释度的菌液 0.2mL, 涂布于碳酸钙筛选培养基 (含 100g/L 葡萄糖的碳酸钙 MRS 培养基) 平皿中。在 37°C 培养 2~3 天后, 采用影印法将该筛选平板的菌株转印到 pH 为 1.5、1.8 和 2.0 的 LPHMRS 培养基 (低 pH 值改性 MRS 培养基) 上和亚硝酸钠筛选培养基 (单一氮源为 2g/L 亚硝酸钠的改性 MRS 筛选培养基) 上。

[0106] 7) 在 37°C 培养 2~3 天后, 挑选菌落较大, 分别能在 LPHMRS 培养基、亚硝酸钠筛选培养基上生长并且在碳酸钙筛选培养基上。经初步筛选, 挑取出的菌落命名为植物乳杆菌 L1。

[0107] 2. 亚硝基胍诱变

[0108] 1) 在超净台上取试管斜面上的植物乳杆菌 L1 一环, 接入装有 50mL 培养基 MRS (无琼脂) 培养基 (葡萄糖浓度为 60g/L) 的 250mL 三角瓶中, 200rpm, 37°C 培养 12h 左右, 使菌体处于对数生长前期。

[0109] 2) 取 5mL 菌液 5000rpm 离心 10min 收集菌体,用生理盐水洗涤 2 次。

[0110] 3) 用 pH6.0 磷酸缓冲液稀释成 10⁷ 个 /mL 菌悬液。

[0111] 4) 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。

[0112] 5) 在 37℃ 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。

[0113] 6) 适当稀释,取最后稀释度的菌液 0.2mL,涂布于碳酸钙筛选培养基(含 100g/L 葡萄糖的碳酸钙 MRS 培养基)平皿中。在 37℃ 培养 2 ~ 3 天后,采用影印法将该筛选平板的菌株转印到 pH 为 1.5、1.8 和 2.0 的 LPHMRS 培养基(低 pH 值改性 MRS 培养基)上和亚硝酸钠筛选培养基(单一氮源为 2g/L 亚硝酸钠的改性 MRS 筛选培养基)上。

[0114] 7) 挑选菌株方法:挑选菌落较大,分别能在 LPHMRS 培养基、亚硝酸钠筛选培养基上生长并且在碳酸钙筛选培养基上。经初步筛选,挑取 100 支符合以上条件的菌落。

[0115] 3. 摇瓶复筛

[0116] 1) 在超净台上分别取各试管斜面上的植物乳杆菌一环,接入装有 50mL 培养基 MRS(无琼脂)培养基(葡萄糖浓度为 100g/L)的 250mL 三角瓶中,200rpm,37℃ 培养 15h 左右,使菌体处于对数生长中期。

[0117] 2) 分别取 5mL 菌液,接入装有 50mL 碳酸钙筛选液体培养基(含 250g/L 葡萄糖的碳酸钙 MRS 培养基)平皿中、pH 为 1.5、1.8 和 2.0 的 LPHMRS 液体培养基(低 pH 值改性 MRS 培养基)和亚硝酸钠液体筛选培养基(单一氮源为 2g/L 亚硝酸钠的改性 MRS 筛选培养基)上(注:采用 250mL 三角瓶)。200rpm,37℃ 培养 3-4 天,每天分别检测碳酸钙筛选液体培养基中 L-乳酸产生速率、LPHMRS 液体培养基中的生物量和亚硝酸钠液体筛选培养基中亚硝酸盐的消耗速率。发酵结束后,比较 100 株菌种的碳酸钙筛选液体培养基中 L-乳酸产生速率、LPHMRS 液体培养基中的生物量和亚硝酸钠液体筛选培养基中亚硝酸盐的消耗速率。

[0118] 3) 选择兼具高 L-乳酸产生速率、耐受低 pH(该菌种仅能在最低为 pH1.8 的培养基中生长)和亚硝酸盐的消耗速率高的菌株,将其命名为 L2 菌。

[0119] 4. 遗传稳定性试验

[0120] 将 L2 菌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。菌株命名为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) t1j-2014。

[0121] 泡盛曲霉菌剂的制备方法:

[0122] 斜面菌种活化培养:将泡盛曲霉斜面菌种转接到斜面培养基上,27℃ 培养 3 天。

[0123] 固体一级种子培养:挑取泡盛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。

[0124] 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。

[0125] 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。

[0126] 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。

[0127] 培养基组成:固体原料:麸皮 80,豆饼粉 10%,玉米淀粉 10%,添加等量自来水;初始 pH 自然。

[0128] 实施例 2

[0129] 一种生物菌肥,重量份数组成为:植物乳杆菌剂 25 份,解磷菌剂 1 份,解钾菌剂 3 份,枯草芽孢杆菌培养物 12 份,泡盛曲霉培养物 10 份,聚谷氨酸 6 份。

[0130] 所述生物菌肥的制备方法如下:将植物乳杆菌剂,解磷菌剂,解钾菌剂,枯草芽孢杆菌培养物,泡盛曲霉培养物按照比例混合均匀;投入制粒机造粒,粒径控制在 1 毫米,然后使肥料颗粒黏附添加潮湿态的聚谷氨酸,随后控制温度在 35 度保持 1 小时即可。

[0131] 所述聚谷氨酸为 γ -聚谷氨酸。

[0132] 枯草芽孢杆菌培养物的制备方法:

[0133] 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;

[0134] (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;

[0135] (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;

[0136] (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;

[0137] (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;

[0138] (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。发酵完毕发酵液经过板框过滤、干燥后获得含枯草芽孢杆菌剂在内的枯草芽孢杆菌培养物。

[0139] 培养基组成:葡萄糖 6%,酵母提取物 1%,蛋白胨 0.2%,CaCO₃1%,pH6.8。

[0140] 植物乳杆菌剂的制备方法:

[0141] (1) 一级种子培养:将植物乳杆菌菌种接入 500 毫升摇瓶中,培养基装量 100 毫升,培养温度 30℃,培养时间 24 小时;

[0142] (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;

[0143] (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,培养温度 30℃,培养时间 24 小时;

[0144] (4) 一级种子罐培养:将三级种子以 5%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 30℃,罐压 0.05MPa,培养时间 18 小时;

[0145] (5) 发酵罐培养:将一级种子罐菌种以 5%接种量接入总容积为 3 吨二级种子罐,

发酵培养基装量 2 吨,培养条件培养温度 30℃,罐压 0.05MPa,培养时间 22 小时。发酵完毕发酵液经低温负压真空浓缩到原体积的 45%,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 0.5:1,载体组成为:CaCO₃25 份,糊精 12 份,流化床干燥,干燥温度 50℃。

[0146] 培养基组成为:酪蛋白胨 1%,牛肉提取物 1%,酵母提取物 0.5%,葡萄糖 0.5%,乙酸钠 0.5%,柠檬酸二胺 0.2%,Tween800.1%,K₂HPO₄0.2%,MgSO₄·7H₂O0.02%,MnSO₄·H₂O0.005%,CaCO₃2%,琼脂 1.5%,pH6.8。

[0147] 实施例 3 基本同例 1 和 2

[0148] 一种生物菌肥,重量份数组成为:植物乳杆菌剂 25 份,解磷菌剂 2 份,解钾菌剂 2 份,枯草芽孢杆菌培养物 12 份,泡盛曲霉培养物 9 份,聚谷氨酸 7。

[0149] 所述生物菌肥的制备方法如下:将植物乳杆菌剂,解磷菌剂,解钾菌剂,枯草芽孢杆菌培养物,泡盛曲霉培养物按照比例混合均匀;投入制粒机造粒,粒径控制在 0.5-2 毫米,然后使肥料颗粒黏附添加潮湿态的聚谷氨酸,随后控制温度在 35 度保持 2 小时。

[0150] 所述聚谷氨酸为 γ -聚谷氨酸。

[0151] 实施例 4 基本同例 1 和 2

[0152] 一种生物菌肥,重量份数组成为:植物乳杆菌剂 20 份,解磷菌剂 2 份,解钾菌剂 2 份,枯草芽孢杆菌培养物 15 份,泡盛曲霉培养物 8 份,聚谷氨酸 5 份。所述聚谷氨酸为 γ -聚谷氨酸。

[0153] 实施例 5 基本同例 1 和 2

[0154] 一种生物菌肥,重量份数组成为:植物乳杆菌剂 35 份,解磷菌剂 2 份,解钾菌剂 2 份,枯草芽孢杆菌培养物 10 份,泡盛曲霉培养物 15 份,聚谷氨酸 8 份。所述聚谷氨酸为 γ -聚谷氨酸。

[0155] 实施例 6

[0156] 产品效果实验

[0157] 试验地的选择与试验设计:试验于 2013 年 4 月 20 日—10 月 30 日在宁夏盐池县花马池镇八堡村进行。

[0158] 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 0.7 公斤,出苗 2 个月通过锄地松土方式使用发明产品 0.3 公斤,对照组使用同类市场销售菌肥。

[0159] 发明产品使用玉米地玉米产量达到 695 公斤,对照组 590 公斤,试验地块比对照组减少灌溉用水 18%。该地块在第 2 年种植春小麦,春小麦产量达到了 390 公斤,比对照组单产提高了 18%。且试验田土壤结构良好,无大块和板结。