

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/465 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510097902.2

[43] 公开日 2006年5月17日

[11] 公开号 CN 1772880A

[22] 申请日 2004.3.18

[21] 申请号 200510097902.2

分案原申请号 200410039818.0

[71] 申请人 浙江省农业科学院

地址 310021 浙江省杭州市石桥路198号

[72] 发明人 薛智勇 王卫平 朱凤香 钱红

吴传珍 何福恒 章锦秋

[74] 专利代理机构 杭州丰禾专利事务所有限公司

代理人 沈伾伾

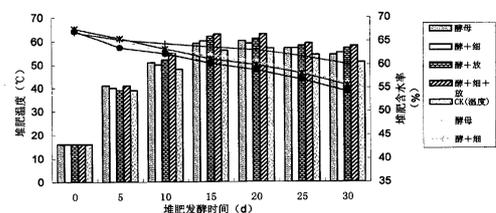
权利要求书1页 说明书15页 附图2页

## [54] 发明名称

农业废弃物发酵菌剂及其制备方法

## [57] 摘要

本发明公开了一种用于农业废弃物处理的发酵菌剂及其制备方法。本发明分离选育到活力强、生长快、耐高温的扣囊复膜孢酵母 ZJY<sub>2</sub> 和灰藤黄链霉菌 W<sub>1</sub> 两种新菌株及另一已知菌种蜡状芽孢杆菌 ME1-2。将上述三菌种分别培养，发酵生产后，按一定比例即可制成复合菌剂或单种菌剂。应用时，通过添加调理剂将废弃物含水率调控至 55~65%，同时加入 1~5% 的菌剂并拌匀后，再定期翻堆通气，约经 20~30 天的好氧高温发酵，即能达到减量化、无害化及资源化的目的。该菌剂具有发酵升温快，维持堆肥温度高，发酵腐熟周期短的特点。适用于畜禽规模养殖场和其他农业有机废弃物及食品加工下脚料的快速发酵处理。



1、灰藤黄链霉菌(*Streptomyces griseoluteus*)W1 菌株,其菌株保藏号为 CGMCC NO. 1086。

## 农业废弃物发酵菌剂及其制备方法

本申请是原申请日：2004年3月18日，申请号：200410039818.0，发明创造名称为“用于农业废弃物处理的发酵菌剂及其制备方法”申请的分案申请。

### 技术领域

本发明属于处理农牧业与食品加工废弃物的发酵菌剂及其制造领域，尤其是属于能加快物料发酵的菌剂和该菌剂的制备方法及其应用。

### 背景技术

我国的畜禽规模养殖业在近十几年里得到迅速发展，尤其是集约化养殖程度很高的养猪业得到了长足的发展，但在提高生产水平的同时也造成了较严重的环境污染。此外，农业生产中每年产生大量的农作物秸秆等，以及农产品加工废弃物（如果皮、叶、渣、和食用菌渣等），更加剧了农村环境污染。这些畜禽粪便及农业废弃物既是污染源，又是很好的有机肥料资源，经微生物好氧高温发酵，实现减量化（物料含水量、体积、重量减少）、无害化（消除有害物质、杀灭寄生虫、卵、病原微生物、草籽等）处理和资源化（有机肥料、营养基质等）利用，是缓解农业污染和可持续发展农牧业的有效途径之一。当前农村大部分有机废弃物未经处理就直接排放、堆弃或施入农田，有少部分则采用传统堆制自然发酵的办法。但自然堆肥的发酵微生物菌群起始数量少、增殖慢，且往往不耐高温，故堆肥发酵升温缓慢，发酵周期长，通常需要2个月以上。由于发酵堆温不高，发酵不充分，有害生物杀灭不彻底。

### 发明内容

本发明的目的是，针对以上的不足，从自然界定向分离选育出具有耐高温，活力强、生长快等特性的微生物菌株；通过培养增殖后，制成并提供发酵用菌

剂产品及其制备方法；同时也提供应用该菌剂加速农牧业与食品加工有机废弃物发酵腐熟的技术。

本发明的目的通过以下技术方案得以实现。

### 使用的微生物

本发明所述的菌剂是由以下三种菌种经培养、增殖、配制而成。所用菌株是扣囊复膜孢酵母 (*Saccharomycopsis fibuligera*) ZJY<sub>2</sub>，灰藤黄链霉菌 (*Streptomyces griseoluteus*) W1 及蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) ME1—2。于 1997 年从杭州、温州及北京、沈阳、南京等不同地区采集牛粪、猪粪、鸡粪和垃圾等高温堆肥及土壤样品，利用不同类菌种常规培养基从中定向分离出酵母菌、放线菌和芽孢杆菌共 71 株，并进行菌株纯化，进而对菌株通过 44℃ 斜面和 50℃ 摇瓶进行耐高温培养和测定，从中筛选出耐高温菌株如下：

扣囊复膜孢酵母 ZJY<sub>2</sub> (以下简称为 ZJY<sub>2</sub> 菌株)，该菌株于 1997 年 3 月，用上述方法从浙江杭州分离而得。经中国科学院微生物研究所依据下述实验结果，对照《YEASTS: Characteridtics and Identification》的检索表分析，确定该酵母菌为复膜孢酵母属 (*Saccharomycopsis*) 中的扣囊复膜孢酵母 (*Saccharomycopsis fibuligera*)。其主要不同点在于该菌株生长速度快，易培养，不易污染，培养基配制简单，耐一定程度的高温 (40℃ 烘干不死亡)。该新菌株于 2003 年 3 月 24 日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏，保藏编号为 CGMCC NO.0909。

灰藤黄链霉菌 W1 (以下简称为 W1 菌株)，该菌株于 1997 年 3 月，用上述方法从浙江温州分离而得。经中国科学院微生物研究所，按《放线菌的分类和鉴定》，《链霉菌鉴定手册》，《放线菌研究与应用》，结合下述形态特征，细胞壁化学组分和培养特征及各项生理生化特征，W1 菌株与灰藤黄链霉菌十分相

似，故 W1 菌株定名为灰藤黄链霉菌 (*Streptomyces griseoluteus*)。其主要不同点在于该菌株生长速度快，生长量大，耐高温 (50℃，5 小时不死，温度适宜时快速生长)，易培养。该新菌株于 2004 年 1 月 9 日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏，保藏编号为 CGMCC NO.1086。

蜡状芽孢杆菌 ME1—2，该菌于 1989 年 5 月用上述方法从浙江绍兴分离而得，经浙江农业大学鉴定，根据碳源利用，酶反应等特征，按《伯杰细菌鉴定手册》和 R.E.Gordon 等分类法，确定该菌株属于芽孢杆菌属的蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)，为已知菌种。报道文献发表在《土壤肥料》1993 年第 2 期，29~32 页，“多效菌菌种选育、鉴定及菌剂的研制”，作者何福恒、章锦秋、薛智勇等，《浙江农业学报》1993 年第 5 卷第 2 期，89~93 页，“多效菌及其制剂的主要特性”，作者何福恒、章锦秋、薛智勇等。公众可以从该微生物菌种的持有人（专利发明人）处获得该微生物菌种。

## **ZJY<sub>2</sub> 菌株，W1 菌株及 ME1—2 具有下述性质**

### **1. ZJY<sub>2</sub> 菌株:**

菌落特征、细胞形态及理化性质：在麦芽汁和 YEPD 培养基平皿上，28℃ 恒温静止培养 2~4 天观察，菌落表面呈暗-灰白色，中央凸起，表面粗糙。在麦芽汁液体培养基上，28℃ 振荡培养 24 小时镜检观察：繁殖方式为双边或多边芽殖。细胞卵形、椭圆形及腊长形，个别细胞为锥形。细胞大小为(2.0-2.5)×(3.3-12.5) μm。接种 YEPD、麦芽汁琼脂培养基上，28℃ 培养 3 天后产生子囊孢子，子囊球形-卵形。每个子囊含 1~4 个子囊孢子。该菌能弱发酵葡萄糖、蔗糖、麦芽糖，不能发酵半乳糖、乳糖、棉籽糖、海藻糖等单糖及双糖。能同化葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖、棉籽糖、纤维二糖、糊精、可溶性淀粉、乙醇、

藓糖醇、甘油、硝酸钠、琥珀酸、水杨苷等。不能同化乳糖、密二糖、菊糖、木糖、D-阿拉伯糖、核糖、鼠李糖、氨基葡萄糖、甲醇、N-乙酰葡萄糖胺、卫矛醇等。另外在含有 10%NaCl 和 5%葡萄糖的培养基中也能正常生长。一般在 37℃生长。经耐高温性测定，在 45℃培养生长较好。

## 2. W1 菌株:

菌落特征、细胞形态及理化性质：在高氏合成一号和蔗糖察氏琼脂上 28℃ 插片培养 7~10 天，镜检观察显示，菌株的基内菌丝体无横隔，不断裂；气生菌丝体生长丰茂，多分枝；孢子丝直形，有的有柔曲成丛状；孢子多于 10 个。孢子卵圆形或短柱状，表面光滑。

W1 菌株在 7 种培养基上的培养特征

培养基	气生菌丝	基内菌丝	可溶性色素
高氏合成一号 琼脂	气丝微长灰 白色	杏仁黄色	无
蔗糖察氏琼脂	银鼠灰色	乳脂黄色	无
甘油天门冬素 琼脂	浅灰色	浅藤黄色	无
克氏合成一号 琼脂	尘灰色	黄褐色	无
无机盐淀粉琼 脂	珠母灰色	黄褐色	无
燕麦粉琼脂	瓦灰色	藤黄色	无
马铃薯浸汁琼 脂	夜灰色	草褐色	无

经细胞壁化学组分分析，菌株全细胞水解液含有 LL-DAP（左旋二氨基庚二酸，Diaminopimelic acid），甘氨酸；无特征性糖（糖型 C）。细胞壁化学组分属

于 I 型。能发酵葡萄糖、阿拉伯糖、果糖、甘露醇、半乳糖、鼠李糖，不发酵棉子糖、木糖、肌醇，液化明胶，能使牛奶酪化，但不凝固牛奶，淀粉水解阳性，能还原硝酸盐，纤维素上不生长，不产生  $H_2S$  和类黑色素。经耐高温性测定，在  $50^{\circ}C$  高温中生长良好，菌丝球干重达  $2.17g/60ml$ 。

### 3.蜡状芽孢杆菌 ME1—2:

菌落特征、细胞形态及理化性质：菌落特征为近圆形、平展，边缘似镶边状，不透明，蜡质状；细胞形态为革兰氏阳性，直杆状，细胞大小为  $(1.2\sim 1.5) \times (2.0\sim 3.5) \mu m$ 。幼龄菌石炭酸复红染色，细胞具有不着色的小球。芽孢为椭圆形，孢囊不膨大，运动周身鞭毛。能发酵葡萄糖、木糖、海藻糖、麦芽糖，不能发酵阿拉伯糖、甘露醇、乳糖，能在 7%氯化钠培养液中生长，能还原硝酸盐，具有氨化作用，能利用柠檬酸盐，吲哚试验、VP 反应为阴性，脲酶、接触酶、卵磷脂酶测定为阳性，不利用丙二酸盐，能水解淀粉，在 PH5.7 的营养肉汤上生长，水解纤维素不明显，能厌氧生长，酪氨酸水解为阴性反应。经耐高温性测定，在  $45^{\circ}C$  培养生长较好。

### 菌株培养与发酵

扣囊复膜孢酵母 ZJY2 以麦芽汁培养基为基础加入少量无机盐如钙、镁、磷等进行液体摇瓶发酵， $25\sim 35^{\circ}C$  培养，转速  $120\sim 220rpm$ 。以此为菌种接种固体发酵曲盘制作固体母种，固曲原料为麸皮、菜饼和豆饼粉（比例 100%~40%：0~30%：0~30%）及少量无机盐等，含水量为 50~65%， $25\sim 35^{\circ}C$  培养 16-26 小时，再按 0.5~5%的接种量接种于灭菌的麸皮、菜饼、米糠和豆饼粉（比例 100%~10%：0~30%：0~30%：0~30%）及少量无机盐混合发酵固体培养基中，含水量为 40~65%，拌匀堆放 30min 后经  $0.01MPa$  灭菌 60min，16-26 小时通气曲盘发酵

或曲池或用固体发酵罐培养工厂化生产，温度控制在 20~38℃，发酵菌数达 1 亿 cfu/克以上即可，40~50℃干燥，粉碎。

灰藤黄链霉菌 W1 以可溶性淀粉 2~6%、酵母粉 0.1~1.0%、豆饼粉 5~30%等为基础培养基加入少量无机盐如钙、镁、磷等进行液体摇瓶发酵，pH 调整为 5~9，转速 120~220rpm，20~40℃培养 36~48 小时。以此为母种按 1~10%的接种量接种于灭菌的固体发酵培养基中，固体发酵培养基主要成分为麸皮、豆饼粉、砵糠(比例 25~70%: 50~20%: 25~10%) 及少量无机盐如钙、镁、磷、钾等，培养基含水量为 50~65%，温度控制在 35~37℃，通气培养 48~72 小时，发酵菌数达 0.5 亿/克以上 即可，40~50℃干燥，粉碎。

蜡状芽孢杆菌 ME1—2 先用牛肉膏蛋白胨斜面菌种接种摇瓶制作液体种子，液体摇瓶培养基以牛肉膏蛋白胨为基础培养基加入少量无机盐如钙、镁、磷、钾等制备而成，调整 pH 7.0~7.8，转速 120~220rpm，28℃~35℃培养 8 至 16 小时。以此为母种按 5~10%的接种量接种于液体发酵罐培养工厂化生产，液体发酵罐培养基为玉米粉 0.1~0.6%、酵母粉 0.1~0.5%、豆饼粉 0.1~0.6%，葡萄糖或蔗糖 0.1~0.3%及少量无机盐组成，余量为水，温度控制在 25~35℃，通气培养 18-30 小时，发酵菌数达 1 亿 cfu/克以上即可，用麸皮按 1: 1 (v/w) 吸附，混匀，40~45℃干燥，粉碎。

### 菌剂的制备

上述三种菌经分别培养发酵粉碎后即单种菌剂，将三种或任二种按 10~1:0~3:0~6 的重量份数比例进行复合即为复合菌剂，根据不同菌剂组合对猪粪堆肥发酵试验结果可看出，将 ZJY2, W1 和蜡状芽孢杆菌 ME1—2 三种菌剂按 4:3:3 的重量份数比例进行复合，该优选比例复合的菌剂对猪粪堆肥发酵温度和脱水效果最好（见图 1）。上述复合菌剂或单种菌剂的菌数均应控制在 0.5 亿 cfu/克

以上，含水率应控制在 8~14%之间。包装固体粉剂可用防潮编织袋或塑料袋，液体菌剂可用密封容器或袋装。

本发明菌剂经试验，在室温下贮存 6 个月，菌数为  $12.17 \times 10^8$  cfu/g，存活率高达 84.11%；贮存 9 个月的菌数为  $9.53 \times 10^8$  cfu/g，存活率 65.86%；贮存 1 年后的菌数仍达  $2.27 \times 10^8$  cfu/g，存活率为 18.65%。

本发明菌剂经浙江省医学科学院省实验动物与安全性研究重点实验室依据《食品安全性毒理学评价程序》检验，菌剂对 ICR 小鼠经口饲喂最大耐受量大于 40.0g/kg，实验期间，小鼠无毒性反应及死亡，且体重增加，属实际无毒。ME1-2 菌剂对实验动物 NIH 小鼠（雌、雄分组）采用“寇氏法”经口灌胃急性毒性实验，雌、雄小鼠  $LD_{50} > 20$  g/kg, 属基本无毒。故本发明菌剂有可能用做食品或饲料添加剂。

#### 对小鼠经口给药最大耐受量的实验记录

组别	剂 量 (g/kg)	动物数 (只)	性 别	毒性反 应	体重 (g, $\bar{x} \pm SD$ )		
					给药前	五天	十天
ZJY2	40.0	10	♀	无异常	22.5±0.97	26.5±1.27	27.7±1.64
			♂	无异常	22.5±0.97	29.3±1.57	31.4±1.90
W1	40.0	10	♀	无异常	22.6±0.84	27.0±1.56	28.4±1.78
			♂	无异常	22.5±0.97	29.4±1.43	31.0±2.11

#### 菌剂在堆肥发酵中的应用

根据我国，尤其是南方地区猪的规模养殖场最多，饲养量最大，而猪粪含水率高（70~90%），粘糊，透气性差，C/N 比低，自然发酵难的特点，本发明菌剂以鲜猪粪发酵试验为主，提出了具体应用方法。

(1) 通过添加调理剂, 如木屑, 砵糠, 中药渣, 香菇渣等, 把猪粪的含水率从 70~90% 降调至 55~65%, 添加量一般为畜禽粪便等废弃物总量的 5~30% 左右, 优选添加量为 10~15%;

(2) 菌剂接种量以发酵物料(即废弃物添加调理剂后的混合物)重的 1‰ ~ 5‰ 为宜, 优选为 2‰; 菌种添加后翻拌均匀, 堆肥高度一般以 80~100 公分为宜, 利于好氧发酵与水分蒸发;

(3) 定期翻堆, 通气; 1~3 天左右翻堆一次, 既增氧通气, 促进堆肥发酵, 尤其是在前期可明显提高堆肥温度上升; 又加速堆肥水分蒸发, 达到减量化; 并周期性地使堆肥中心温度下降, 使外围浅层的正常菌种随着物料进入内层, 加快新一轮好氧高温发酵, 从而加快整个堆肥的发酵腐熟进程。

#### (4) 堆肥发酵腐熟标准及质量检测

堆肥在 55~60℃ 以上连续发酵 15~20 天时, 用发酵产物与清水按 1:10 浸泡 1 天, 观察浸提液呈咖啡色, 同时堆温开始下降, 则表明生物发酵物料已进入腐熟阶段, 再延续发酵 3~5 天后, 经晒干或烘干粉碎, 含水量控制在 20% 以下, 即成有机肥产品。要求该产品中大肠杆菌数  $< 10^5$  个/kg, 蛔虫卵数死亡率  $> 95\%$ , 达到无害化要求(畜禽养殖业污染物排放标准 GB18596—2001), 产品质量符合国家农业行业标准(NY525—2002)。

除猪粪外的其余畜禽粪便及农业有机废弃物, 应根据其含水量高低, 通气性好坏, 对上述办法作适当调整, 如发酵物料含水率低于 60%, 则不需要添加调理剂等, 均能取得较好的发酵腐熟效果。

本发明的有益效果: 一、本发明菌剂应用于畜禽粪便及农业有机废弃物堆肥处理后, 前期表现发酵升温快, 起始 5 天即能达到 55~65℃ 以上, 堆肥 10

天温度已接近峰值 70℃，15 天内比不接菌的堆肥提高 5~11℃；中后期能保持较高的发酵温度，平均温度较对照（自然发酵）高 8~10℃，从而加快了整个发酵腐熟进程，发酵腐熟期由对照的 2 个月以上缩短为 20 天至 30 天，大大提高了加工场地设备的利用率，降低了生产成本。发酵堆物料升温、发酵腐熟过程受气候因素的影响，夏季周期更短，冬季延长。二、由于发酵增温快，维持温度高，一般 10 天左右即能使堆肥中的大肠杆菌数及蛔虫卵数等达到无害化要求，杂草种子死亡。三、堆制物料发酵温度高，也加快了发酵物料水分的蒸发。一般发酵 20~30 天内，即可使物料起始含水率下降 30%左右，达到减量化要求，同时也取得了较好的除臭效果。四、菌剂发酵有机肥使用安全效果良好。本发明采用黄瓜种子的发芽指数试验显示，猪粪堆肥发酵至 20~30 天，其发芽指数（GI%）值均在 70%以上，表明对植物已经安全；施肥后经对土壤养分释放测定，表现较为平稳，保肥性好，并能活化根际土壤和提高土壤肥力，土壤中细菌、放线菌、芽孢杆菌、真菌等均大量增加，改善了土壤环境和团粒结构；经作物应用试验明确，该有机肥对蔬菜、瓜类、甘蔗、柑桔、草莓等均有提高产量，增加维生素 C、糖分等含量，降低瓜果蔬菜可食部分的硝酸盐含量，利于人体健康。五、有较好的经济及社会效益，经测算，该发酵有机肥生产与销售成本约 250 元/吨，市场价可达 350 元/吨左右。因此，本发明既能变废为宝，适用于规模化畜禽牧场粪便及农业有机废弃物的发酵处理，并能形成发酵菌剂及商品有机肥的产业化开发，提高农业效益。

## 附图说明

图 1 不同菌种组合对猪粪堆肥发酵温度和含水率的影响示意图

图 2 接种菌剂对堆肥温度和发芽指数的影响示意图

图3 菌剂不同接种量对猪粪堆肥发酵温度和脱水效果影响示意图

### 具体实施方式

通过借助以下实施例将更详细说明本发明。以下实施例仅是说明性的，本发明并不受这些实施例的限制。

#### 一、粉剂制造例：

##### 1、扣囊复膜孢酵母菌株 ZJY2 菌剂的制备：

扣囊复膜孢酵母 ZJY2 液体摇瓶培养基：麦芽汁（10° Bx）1000ml，葡萄糖 18 克，pH 自然。以此为培养基加入 20 克琼脂即制备成固体母种斜面进行接种培养，按无菌操作方法取斜面母种一环接种于酵母液体摇瓶（装 60ml 培养基/250ml 三角瓶）培养基中，28℃，转速 180rpm，培养 18 小时，菌数达  $0.5 \times 10^8$  cfu/ml 以上即可。扣囊复膜孢酵母固体发酵曲盘培养基：以麸皮 99% 及少量无机盐  $MgSO_4$ 、NaCl 各 0.05%，按料、水比 1:1(w/w) 加水使物料含水量约为 60%。以摇瓶培养的液体菌剂为菌种，按 0.1% 的接种量均匀接种于固体发酵料曲中（曲盘为木制，长宽高分别为 60 cm、45 cm、6cm，固体培养基厚度 3~5 cm），25℃ 培养，20 小时，菌数达到  $2 \times 10^8$  cfu/g 即可，40~50℃ 干燥，粉碎制作固体母种。若采用规模化曲盘发酵或曲池或固体发酵罐生产，其培养基同固体发酵曲盘培养基，培养基按料水比拌匀堆放 30min 后，先经 0.1MPa 灭菌 60min，按 3% 的接种量接种于曲盘固体发酵培养基中，温度控制在 26℃，26 小时曲盘通气发酵或曲池或用固体发酵罐培养工厂化生产，发酵菌数达 1 亿 cfu/克以上即可，40~50℃ 干燥，粉碎过 40 目筛，含水量约 14% 即为该菌粉剂产品。

##### 2、灰藤黄链霉菌 W1 菌剂的制备：

灰藤黄链霉菌 W1 液体摇瓶培养基：可溶性淀粉 2.5%、酵母粉 0.3%、豆饼粉 5%为基础培养基，加入 NaCl 2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{CaCO}_3$  0.4%，pH 调整为 7.2。先以此为培养基加入 2%琼脂即制备成固体母种斜面进行接种培养，按无菌操作方法取斜面母种用无菌水制取灰藤黄链霉菌菌悬液 1ml 接种于酵母液体摇瓶（装 100ml 培养基/500ml 三角瓶）培养基中，转速 160rpm，20~40℃培养 48 小时，菌剂发酵生物量(干重)达 0.5g/100ml 即可。灰藤黄链霉菌固体发酵培养基各原料重量百分比为：麸皮 68.06%、豆饼粉 20%、麸糠 10%及 NaCl 1.5%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.04%、 $\text{CaCO}_3$  0.4%，另外再添加水，使培养基含水量为 55%，以液体摇瓶培养菌剂为母种按 1%的接种量接种于灭菌的固体发酵培养基中，温度控制在 32℃，通气培养 72 小时，发酵菌数达 0.5 亿/克以上即可，灰藤黄链霉菌规模化固体发酵方法同前，50℃干燥，粉碎过 40 目筛，含水量约 14%即为该菌粉剂产品。

### 3、蜡状芽孢杆菌 ME1—2 菌剂的制备：

蜡状芽孢杆菌 ME1—2 液体摇瓶培养基：选用牛肉膏蛋白胨培养基，调整 pH 7.2。按无菌操作方法先用牛肉膏蛋白胨斜面菌种一环接种于液体摇瓶（装 60ml 培养基/250ml 三角瓶）培养基中，28℃，转速 200rpm，培养 16 小时，发酵菌数达 1 亿 cfu/克以上即可作为液体种子。液体发酵罐培养基：玉米粉 1%、酵母粉 1%、豆饼粉 1%、糊精 1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.07%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%、 $\text{CaCO}_3$  0.5%、菜油 0.3%，灭菌前 pH 调整至 7.4~7.4，121℃灭菌 2 小时。以液体摇瓶培养菌剂为母种按 5%的接种量接种于 6 吨液体发酵罐培养，温度控制在 28~30℃，通气培养 26 小时，工厂化生产，发酵菌数达 10 亿 cfu/克以上即可，用麸皮按 1: 1 (v/w) 吸附，50℃干燥，粉碎过 40 目筛，含水量约 14%即为该菌粉剂产品。

### 4、复合菌剂的制备：

上述三种菌剂按 4: 3: 3 (w/w/w) 比例均匀混合, 菌剂数量达 0.5 亿/克以上, 包装即为三菌种复合菌剂。

采用上述制备扣囊复膜孢酵母 ZJY2 菌剂与蜡状芽孢杆菌 ME1—2 菌剂或灰藤黄链霉菌 W1 菌剂, 两种菌剂按 7: 3 (w/w) 比例均匀混合, 菌剂数量达 0.5 亿/克以上, 即成二菌种复合菌剂, 包装即可。

## 二、液剂制造例

### 1、扣囊复膜孢酵母菌株 ZJY2 菌剂的制备:

扣囊复膜孢酵母 ZJY2 液体培养基: 麦芽汁 (10° Bx) 1000ml, 葡萄糖 18 克, pH 自然。先以此为培养基加入 2%琼脂即制备成固体母种斜面进行接种培养, 按无菌操作方法取斜面母种一环接种于酵母液体摇瓶(装 60ml 培养基/250ml 三角瓶) 培养基中, 28℃, 转速 180rpm, 培养 18 小时, 菌数达  $0.5 \times 10^8$  cfu/ml 以上, 按无菌操作密封包装即为该菌液剂产品。

### 2、灰藤黄链霉菌 W1 菌剂的制备

灰藤黄链霉菌 W1 液体培养基: 可溶性淀粉 2.5%、酵母粉 0.3%、豆饼粉 5% 为基础培养基, 加入 NaCl 2%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{CaCO}_3$  0.4%, pH 调整为 7.2。先以此为培养基加入 2%琼脂即制备成固体母种斜面进行接种培养, 按无菌操作方法取斜面母种用无菌水制取灰藤黄链霉菌菌悬液 1ml 接种于酵母液体摇瓶 (装 100ml 培养基/500ml 三角瓶) 培养基中, 转速 160rpm, 20~40℃培养 48 小时, 菌剂发酵生物量(干重)达 0.5g/100ml, 按无菌操作密封包装即为该菌液剂产品。

### 3、蜡状芽孢杆菌 ME1—2 菌剂的制备

按蜡状芽孢杆菌 ME1—2 菌剂粉剂方法生产, 在发酵菌数达 10 亿 cfu/ ml 以上, 不用麸皮吸附, 直接按无菌操作密封包装即为该菌液剂产品。

### 4、复合菌剂的制备

上述三种菌剂按 4: 3: 3 (V/V/V) 比例按无菌操作方法均匀混合, 菌剂数量达 0.5 亿/ml 以上, 密封包装即为三菌种复合菌剂液剂产品。

采用上述制备扣囊复膜孢酵母 ZJY2 菌剂与蜡状芽孢杆菌 ME1—2 菌剂或灰藤黄链霉菌 W1 菌剂, 两种菌剂按 7: 3 (w/w) 比例用无菌操作方法均匀混合, 菌剂数量达 10 亿 cfu / ml 以上, 密封包装即成二菌种复合菌剂液剂产品。

### 三、实验例:

本发明菌剂与日本酵素菌、北京“有机废物发酵菌曲”、不接种对照, 以鲜猪粪为原料加 15%的砵糠及适量菌剂进行堆肥发酵对比试验, 结果见下表, 试验地点在浙江萧山市, 时间 2003 年 6 月, 酵素菌购于浙江绿宝酵素生物工程公司, “有机废物发酵菌曲”购于北京市京圃园生物工程有限公司。

处理	菌剂价格 (元/吨)	菌剂添加量 (%)	发酵天数 (天)	含水率降低 (%)	5 天后堆温 (℃)	无害化指标	规模化、 标准化生产 难易
对照 (自然)	0	0	>30	<30	39	难达标	困难
酵素菌	8000	3	30	>30	55	达标	易
有机废物发酵 菌曲	30000	3	25	>30	56	达标	易
本发明 菌剂	5000	2	20	>30	60	易达标	容易

### 四、应用例:

#### 1、 畜禽废弃物处理

鲜猪粪(含水率约 70%)添加调理剂砵糠 15%, 按 3%的接种量接种本发明发酵菌剂 (三菌混合菌剂), 翻匀后, 堆高 80 厘米, 以不接种菌剂的作为对照。

发酵粪肥的初始含水量为 62.38%。每隔 3 天翻一次堆，每天记载高温层的堆温和 5 天取样测定堆肥的发芽指数。结果显示（见图 2），堆肥从发芽指数（GI%）测定结果来看，接种发酵菌剂的在堆肥 15 天时已接近 70%，而未接菌的要在堆肥 25 天时才接近 70%，接种发酵菌剂的堆肥 5 天的堆温已达到 61℃，分别比未用菌剂和初始堆肥温度增加了 8℃和 36℃，在堆肥发酵的前 15 天内，接种的比不接种的堆肥发酵温度提高 8~11℃；堆肥脱水速度也较快，（见图 3）比对照降低 11 个百分点，经发酵菌剂接种发酵所获得的有机肥产品经农业部农产品质量检测中心测定，产品质量、大肠杆菌数、蛔虫卵死亡率全部符合国家及行业标准。在等成本情况下，在鲜食玉米田施用生物发酵有机肥比用菜饼增产 5.7%；比对照增产 10.8%，产量差异达极显著水平；施用生物发酵有机肥的明前优质茶比菜饼增产 18.5%，增收 140 元，普通春茶增产 24.2%，增收 76.5 元，合计增收 216.5 元，差异达极显著水平。

## 2、 农作物秸秆发酵处理

将农作物秸秆（或蔬菜加工废弃物）晒干粉碎至 3-5cm，加入 20%粪尿废水，0.3%的碳酸氢铵，按 3%的接种量接种本发明发酵菌剂（三菌混合菌剂）混匀，堆高 100 厘米，以不接种菌剂的作为对照。发酵秸秆物料的初始含水量为 60.2%，每隔 3 天翻一次堆，每天记载高温层的堆温，接种发酵菌剂的堆肥 5 天的堆温已达到 58℃，分别比未用菌剂和初始堆肥温度增加了 6℃和 13℃，在堆肥发酵的前 12 天内，接种的比不接种的堆肥发酵温度提高 9℃；堆肥脱水速度也较快，比对照降低 11 个百分点，经发酵菌剂接种发酵所获得的有机肥产品经测定，产品质量符合行业标准。在等成本情况下，施用生物发酵有机肥，在蔬菜番茄上施用生物发酵有机肥比用菜饼增产 5.1%；比对照增产 8.7%，每亩增收 124.5 元。

## 3、 用于栽培基质生产

鲜猪粪(含水率约 70%)40%、麸糠 20%、香菇渣 10%、蘑菇泥 20%、中药渣 10%、，按 3%的接种量接种本发明发酵菌剂（三菌混合菌剂），翻匀后，堆高 80 厘米，以不接种菌剂的作为对照。发酵基质的初始含水量为 55.6%。每隔 3 天翻一次堆，每天记载高温层的堆温和 5 天取样测定堆肥的发芽指数。发酵基质以发芽指数（GI%）测定结果来看，接种发酵菌剂的在堆肥 14 天时已接近 70%，而未接菌的要在堆肥 25 天时才接近 70%，接种发酵菌剂的堆肥 5 天的堆温已达到 60℃，发酵基质比对照脱水速率快 10.2%，25 天后发酵基质含水率为 32.3%，此发酵物料再加入 10%风化煤混匀，作为蔬菜栽培基质用作无土栽培，番茄长势良好。

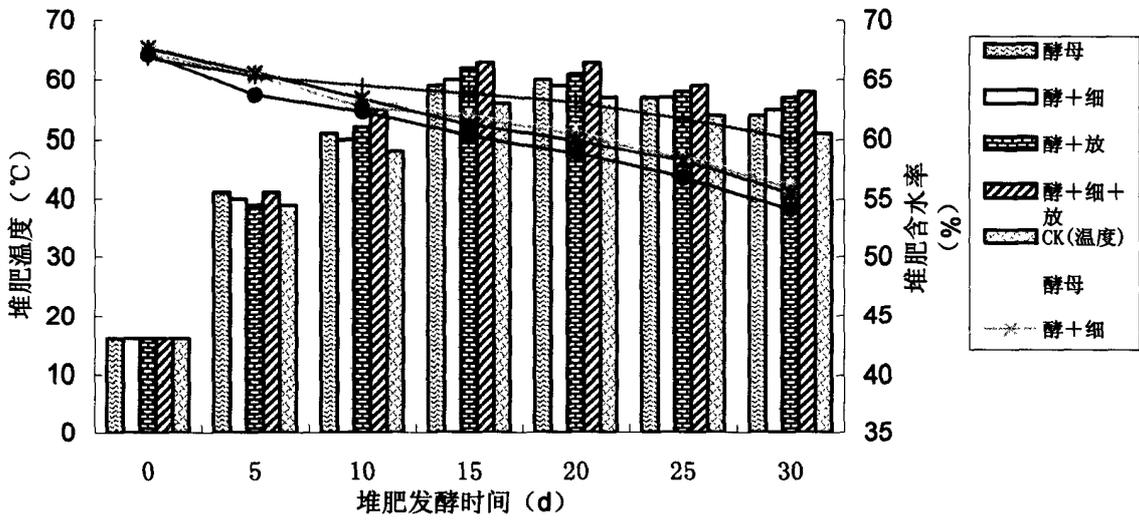


图1

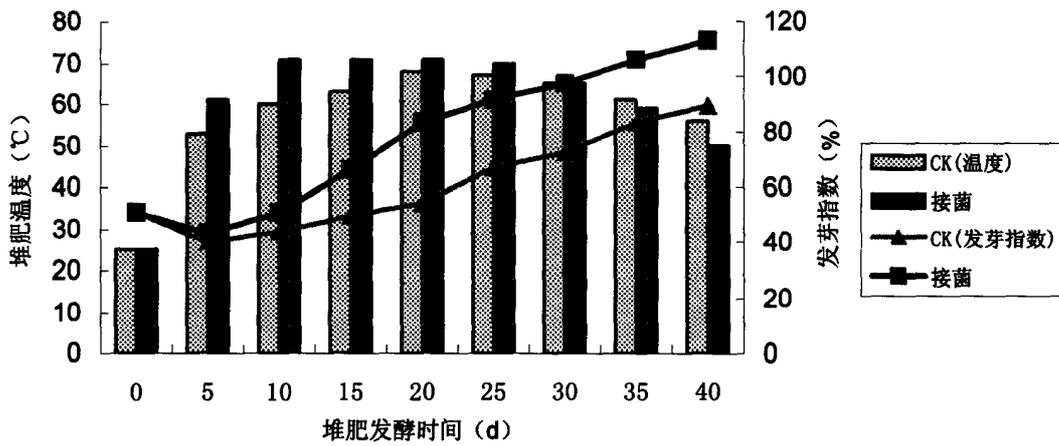


图2

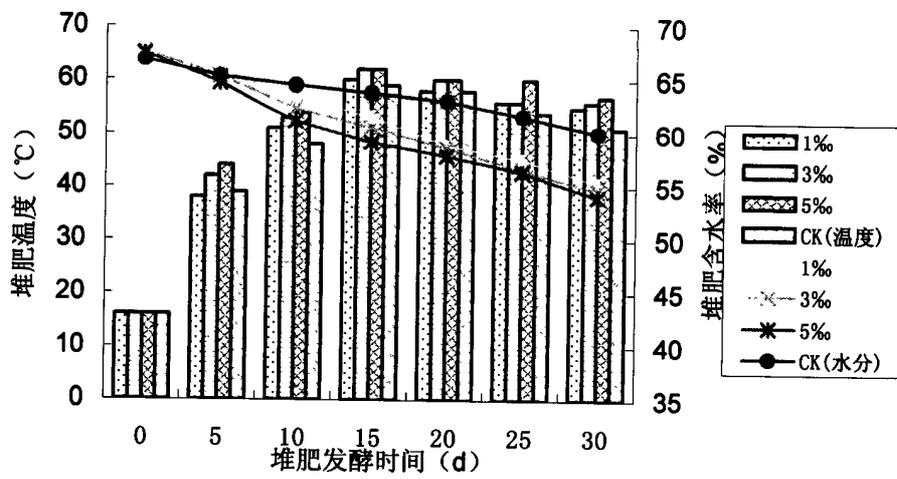


图3