



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106434403 B

(45)授权公告日 2019.10.08

(21)申请号 201510471307.4

(22)申请日 2015.08.04

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106434403 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(83)生物保藏信息  
CCTCC NO:M 2015041 2015.01.18

(73)专利权人 财团法人农业科技研究院  
地址 中国台湾新竹市香山区大湖路51巷1号

(72)发明人 李孟寰 林寅申 黄驿砚 张竹玮

(74)专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司 11139  
代理人 孙皓晨

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C05F 11/08(2006.01)

C05G 3/00(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

(56)对比文件

CN 102936568 A,2013.02.20,

CN 104817408 A,2015.08.05,

CN 101935236 A,2011.01.05,

审查员 吕小蒙

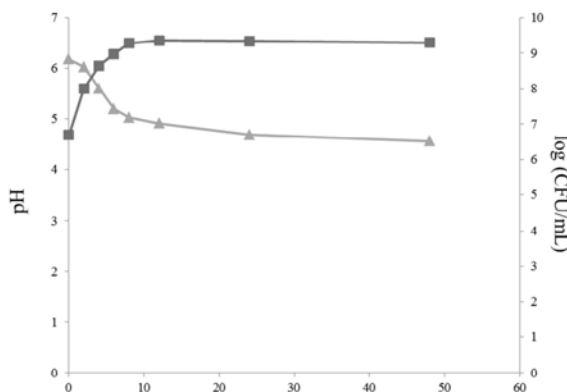
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

## (54)发明名称

一种戊糖片球菌菌株及其用途

## (57)摘要

本发明提供一种戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)L103-01菌株。本发明亦提供含有所述戊糖片球菌L103-01菌株的肥料组合物。另一方面,本发明提供所述戊糖片球菌L103-01菌株作为肥料或肥料添加剂的用途。



1. 一种戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) 菌株, 命名为L103-01, 保藏在中国典型培养物保藏中心, 地址在武汉大学, 其微生物保藏编号为CCTCC NO:M 2015041, 保藏日期为2015年1月18日。

2. 一种肥料组合物, 其包含权利要求1所述的戊糖片球菌L103-01菌株。

3. 如权利要求2所述的肥料组合物, 其用作溶磷肥料。

4. 如权利要求2所述的肥料组合物, 其中全氮含量为0.5%、全磷酐为0.2%、全氧化钾为0.6%、戊糖片球菌L103-01菌株菌数为 $10^9$ CFU/mL。

5. 如权利要求1所述的戊糖片球菌L103-01菌株作为肥料或肥料添加剂的用途。

6. 如权利要求5所述的用途, 其中该肥料或肥料添加剂分别为溶磷肥料或溶磷肥料添加剂。

## 一种戊糖片球菌菌株及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明关于一种戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) 菌株, 以及其作为肥料或添加剂的用途。

### 背景技术

[0002] 目前在台湾上市的微生物肥料产品, 登记为溶磷菌肥料的菌种皆属芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 国外则多为固氮根菌类型的菌种且兼具溶磷活性, 少有乳酸菌属的溶磷微生物肥料。目前市面上不论是生物肥料或是生物农药的商品多半集中在 *Bacillus* 菌属, 在菌种种类方面过于集中, 容易造成商品功效近似, 运用上无法互补的缺点。

[0003] 因此, 仍需要可弥补 *Bacillus* 菌属缺点, 而同时可增加土壤中溶磷效果的其他菌属的菌株。

### 发明内容

[0004] 本发明是不可预期地发现特定的戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) 菌株 (命名为「L103-01」) 具有极佳的溶磷效果, 且可弥补 *Bacillus* 菌发酵后气味不佳的缺点, 且其在发酵过程中还兼具产生乳酸的优势, 不仅可以增加土壤中溶磷效果, 对于杂菌的抑制亦有帮助。

[0005] 根据本发明, 戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) L103-01 菌株是由土壤中具有溶磷效果菌株中挑选, 并经高温紫外光诱变后进一步筛选得到的特定菌株。

[0006] 因此, 在一方面, 本发明提供一种戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) 菌株, 命名为 L103-01, 分类命名为 *Pediococcus pentosaceus* L103-01, 保藏在中国典型培养物保藏中心, 地址在武汉大学, 微生物保藏编号为 CCTCC NO:M 2015041, 保藏日期为 2015 年 1 月 18 日。

[0007] 本发明的戊糖片球菌 L103-01 菌株的特性如下:

[0008] 革兰氏阳性球菌, 在 MRS 固体培养基上菌落颜色为乳白色, 圆形凸起, 边缘整齐, 且在含有 0.5% 磷酸钙的 MRS 培养皿上菌落周围会出现透明圈。不具触酶或氧化酶、不具运动性、不会产生孢子、于好氧及厌氧环境皆会生长。适合生长的温度 35~40°C, 可以生长的 pH 值范围 4.5~8.0, 对酸具有耐受性。戊糖片球菌 L103-01 菌株的溶磷活性可促进植物对磷的吸收利用, 且会分泌有机酸 (使 MRS 培养基的 pH 值由 6.5 降至 4.5), 帮助土壤中磷的游离, 加乘溶磷效果。同时也具有植酸酶 (phytase), 于培养液中培养 24 小时植酸酶活性可达  $2.15 \pm 0.51 \text{ U/mL}$ , 此时菌数可高达  $10^9 \text{ CFU/mL}$ 。除此之外, 更可分泌吲哚乙酸 (indole acetic acid) 的植物激素, 浓度为  $4.53 \pm 1.23 \text{ mg/L}$ , 可促进植物的生长。

[0009] 本发明的戊糖片球菌 L103-01 菌株最大的优势在于其高耐热性, 可耐 50°C 高温 2 小时, 施用于田间曝晒在阳光下仍具有生长活性, 此为市售菌种无法达到的优点; 另, 由于其为兼性厌氧的革兰氏阳性菌, 若是喷洒于土壤中, 亦可存活。此外, 本发明的戊糖片球菌 L103-01 菌株可采静置培养方式, 不需特别供给氧气及搅拌, 培养约 48 小时即可达到

10<sup>9</sup>CFU/mL的菌数,节省了大量的生产成本及设备维护费用。特别是其溶磷效果,于田间可增加游离态磷,提高磷的利用率;更同时分泌植物激素,于小量盆栽试验可看到明显促进植物生长的成效;其有利于减少化学肥料的使用而降低肥料对生态的伤害,以达到土壤、生态体系及人类三者都能够维持永续的生产系统。

[0010] 如上所述,本发明的戊糖片球菌L103-01菌株具有极佳的溶磷效果,以及其他有利植物生长的特性,特别适合应用于肥料组合物。

[0011] 另一方面,本发明提供一种肥料组合物,其包含戊糖片球菌L103-01菌株,其在中国典型培养物保藏中心的微生物保藏编号为CCTCC NO:M 2015041。具体而言,该肥料组合物为一种溶磷肥料组合物,其中全氮含量为0.5%、全磷酐为0.2%以及全氧化钾为0.6%。

[0012] 又一方面,本发明提供所述戊糖片球菌L103-01菌株作为肥料或肥料添加剂的用途。其中,肥料或肥料添加剂分别为溶磷肥料或溶磷肥料添加剂。

[0013] 本发明的戊糖片球菌L103-01菌株亦可配合其他菌株或其他肥料成分达到更佳或所欲达成的效果。

### 附图说明

[0014] 图1显示戊糖片球菌L103-01菌株的生长曲线及MRS培养液中pH值的变化;其中,L103-01菌株培养于MRS培养基中,以6L发酵罐进行培养,37℃培养48小时,转速为50rpm、通气量0.5L/min,(▲)pH变化,(■)菌数变化。

### 具体实施方式

[0015] 本发明的其他目的及优点一部分记载于下述说明中,或者可透过本发明的实施例而理解。应了解前文的发明内容及下文的实施方式仅为例示性及阐释性的说明,而非如申请专利范围般限定本发明。

[0016] 现参照下列特别的非限定性实例更详细地说明本发明。

[0017] 实施例1:戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)L103-01菌株的分离

[0018] 戊糖片球菌L103-01菌株的MRS培养液的配方如下表1所示:

[0019] 表1. MRS培养液配方

[0020]

去离子水	1000 ml
蛋白胨	10.0 g
牛肉萃取物	10.0 g
酵母菌萃取物	5.0 g
右旋葡萄糖	20.0 g
山梨醇单油酸酯	1.0 g
柠檬酸铵	2.0 g
醋酸钠	5.0 g
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.05 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0 g

[0021] 1. 土壤分离:取5克土壤加入20mL的无菌水80rpm离心30分钟,稀释成适当的浓度,涂抹于含有0.5%磷酸钙的MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) 培养皿,37℃厌氧培养48小时。具有溶磷效果的菌株周围会出现溶磷透明圈,选择溶磷透明圈最大的菌株,以四区画线进行纯化分离。

[0022] 2. 高温紫外光诱变:将具有溶磷的菌株隔夜培养于MRS培养液,取培养液调整浓度为 $10^5 \sim 10^6$ CFU/ml,取0.1ml涂布于含有0.5%磷酸钙的MRS培养皿上,进行高温及紫外光诱变。先将培养皿置于50℃培养箱内2个小时,再将培养皿照射紫外光,照射距离约为15~20cm,照射时间为10分钟,37℃厌氧培养48小时。挑选3~5个透明圈较大者进行活性分析,选出活性最高菌株送样至食品工业研究所进行菌种鉴定,依据16Sr RNA鉴定结果为 *Pediococcus pentosaceus*,并将其命名为L103-01,分类命名为 *Pediococcus pentosaceus* L103-01,保藏在中国典型培养物保藏中心,地址在武汉大学,微生物保藏编号为CCTCC NO: M 2015041,保藏日期为2015年1月18日。

[0023] 实施例2:戊糖片球菌L103-01菌株的特性

[0024] MRS培养液按照实施例1的配方配制。戊糖片球菌L103-01菌株于37℃培养至48小时可得到 $2 \times 10^9$ cfu/mL的菌液浓度,之后便进入静止期。pH值由6.18分别降至4.5(如图1所示)。L103-01菌株亦发现可分泌植酸酶,其活性分别为 $2.15 \pm 0.51$ U/mL,将结合型态磷分解为游离型态磷,促进植物对磷的吸收利用,除了植酸酶之外的有机酸亦可帮助土壤中磷的游离,加乘溶磷效果,L103-01菌株为产生乳酸的菌种,发酵24小时后乳酸含量为32.46mg/mL(如下表2所示)。除此之外,植物激素吲哚乙酸(indole acetic acid; IAA)可促进根系生长强壮植株。培养液中添加色氨酸(tryptophan)培养4天,L103-01的IAA含量为 $4.53 \pm 1.23$

(mg/L),对于促进植物生长亦有帮助。

[0025] 表2. *P. pentosaceus* L103-01培养液中植酸酶活性、IAA、乳酸及乙酸含量变化  
[0026]

发酵时间	植酸酶 (U) <sup>a</sup>	IAA (mg/L) <sup>b</sup>	乳酸 (mg/mL)	乙酸 (mg/mL)
8 小时	1.69 ± 0.37	-- <sup>c</sup>	9.44	10.92
12 小时	1.99 ± 0.23	--	12.24	11.33
24 小时	2.15 ± 0.51	--	30.33	11.79
48 小时	1.05 ± 0.14	--	32.46	11.01
4 天	--	4.53 ± 1.23	--	--

[0027] <sup>a</sup>培养37℃48小时。

[0028] <sup>b</sup>培养于MRS培养基(含有质量分数为0.05%的L-色氨酸)37℃4天。

[0029] <sup>c</sup>--:未测得。

[0030] 实施例3:微生物肥料的制备

[0031] 将按照实施例1的配方配制的MRS培养液的pH值调整至6.5,以灭菌釜121℃灭菌15分钟。以1%菌液接种至10mL MRS培养液中,于37℃静置培养12-18小时,得到L103-01一次培养液;将L103-01一次培养液1%菌液接种至600mL MRS培养液中,于37℃静置培养12-18小时,得到L103-01二次培养液。接着进行放大培养:(a)发酵罐生产法:以3%的接种率接种至发酵罐中,温度为37℃、转速为50rpm、通气量0.5L/min,培养48小时,可得到10<sup>9</sup>CFU/mL;或(b)发酵袋或塑料桶生产法:以3%的接种率接种至发酵袋或塑料桶中,并将发酵袋或塑料桶静置发酵48小时,菌数可达到10<sup>9</sup>CFU/mL,此为L103-01微生物肥料发酵液。最后以灭菌水将发酵液稀释100倍作为微生物肥料。

[0032] 实施例4:盆栽及田间功效试验

[0033] 2种肥料组合物配方如下表3所示:

[0034] 表3.肥料组合物配方

[0035]

化学肥料 (台肥 43 号)	含氮素 15%、磷酐 15%、氧化钾 15% 及氧化镁 4%
溶磷菌肥料	含全氮 0.5%、全磷酐 0.2%、全氧化钾 0.6%及戊糖片球菌 L103-01 菌株菌数 $10^9$ CFU/mL

[0036] 1. 盆栽功效试验:以玉米及西红柿为作物,进行小量盆栽功效测试,分为对照组(未施肥)、化学肥料组及溶磷菌肥料组(N=5)。除了对照组之外,其他组别施用适当的化学肥料,化学肥料组为30g/株,溶磷菌肥料组为30g/株,其中,溶磷菌肥料组添加有戊糖片球菌L103-01菌株(液体,菌数 $10^9$ CFU/mL),50mL/株。溶磷菌肥料组的植栽生长状况佳,高度可达 $135\pm 10$ 公分,玉米穗实的长度 $14.3\pm 1.9$ 公分,皆为三组中生长状况最佳;西红柿的总开花数目也以溶磷菌组最多,约为46朵。

[0037] 2. 田间功效试验:于台湾苗栗县狮潭乡一处农地进行田间试验,将玉米种子浸泡溶磷菌肥料1小时,总共分为三组,分别为溶磷菌肥料组(L103-01)、化学肥料组以及对照组(不施用肥料),每组玉米100棵。为期三个月的种植时间,期间总共施肥两次,分别是发芽后的14天及40天。除了对照组之外,其他组别施用适当的化学肥料(化学肥料组为30g/株,溶磷菌肥料组为15g/株),其中,溶磷菌肥料组添加有戊糖片球菌L103-01菌株(液体,菌数 $10^9$ CFU/mL),50mL/株。并于第45天进行植栽生长参数记录及计算,采收作物后进行玉米穗参数的纪录。数值将以统计软件计算并得出各试验组的差异显著情形。结果如下:整体植株的状况有施肥者皆较未施肥对照组为佳,与仅施用化学肥料的组别比较,则发现溶磷菌肥料组不管是在根、茎、叶的生长状况皆与化学肥料组有显著的差异(见下表4),根系生长的影响可发现,不仅是长度较长,须根亦较多(根系干重较重)。在植株全长、湿重及干重,溶磷菌肥料组亦有明显的增加(见下表4)。

[0038] 表4. 不同肥料处理于田间试验中对玉米生长状况的影响

[0039]

	对照组	化学肥料组	溶磷菌肥料组
叶长度 (cm)	$51\pm 8.7$	$67\pm 6$	$81\pm 6$
茎截面积 (cm <sup>2</sup> )	$18.1\pm 0.4$	$21.8\pm 0.2$	$57.1\pm 0.03^*$
根长度 (cm)	$13\pm 3$	$15\pm 5$	$25\pm 6^*$
根干重 (gram)	$2.1\pm 0.7$	$5.1\pm 1.2$	$8.3\pm 1.3^*$
植株全长 (cm)	$87\pm 6.2$	$110\pm 6.8$	$130\pm 8$
植株湿重 (gram)	$182\pm 56$	$339\pm 69$	$576\pm 51^*$
植株干重 (gram)	$25\pm 8$	$47\pm 13$	$87\pm 10^*$

[0040] \*相对于化学肥料组 $P<0.05$ 。

[0041] 熟悉本技术者当知道可在不偏离广义的本发明概念下修饰上述具体例。应了解本

发明不局限于所揭示的特定具体实施例,而意欲涵盖如所附申请专利范围所界定的本发明的精神及范围内的修饰。



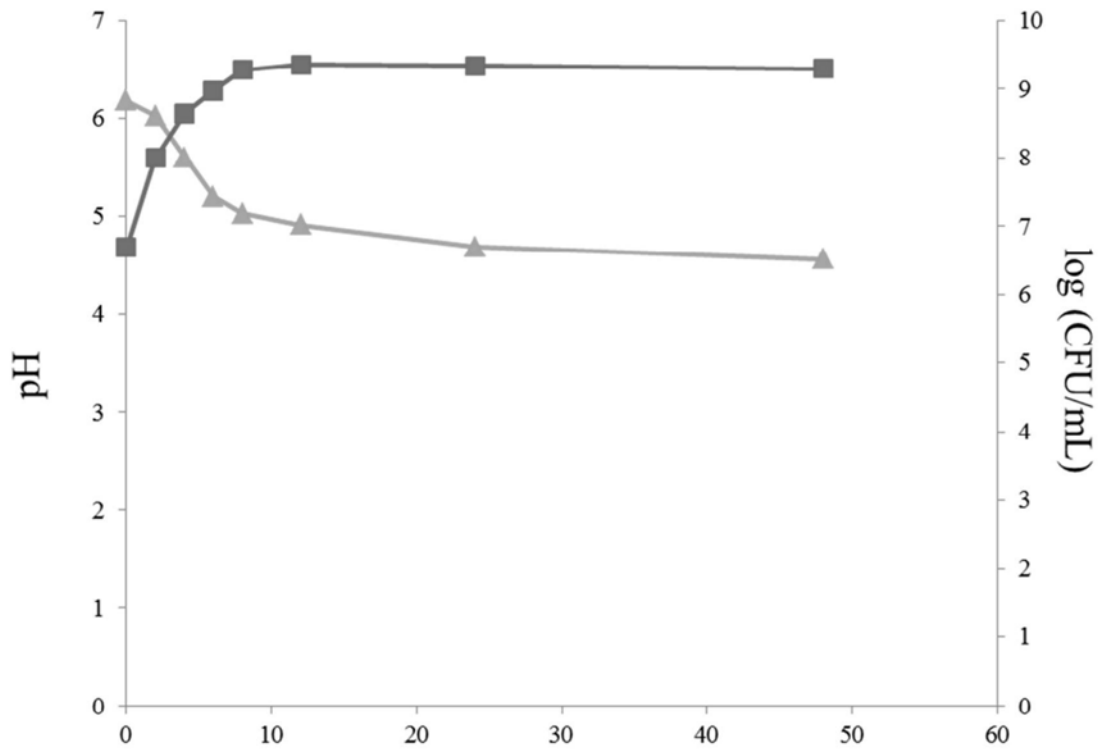


图1