



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103773719 B

(45) 授权公告日 2016.01.20

(21) 申请号 201310743756.0

(22) 申请日 2013.12.30

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 7926 2013.07.15

CGMCC No. 7928 2013.07.15

CGMCC NO. 7927 2013.07.15

(73) 专利权人 邵素英

地址 100079 北京市丰台区横七条44号9号  
1603室

(72) 发明人 邵素英 孔日祥

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12N 1/14(2006.01)

C12R 1/07(2006.01)

C12R 1/125(2006.01)

C12R 1/685(2006.01)

C12R 1/25(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1140159 A, 1997.01.15, 第7-9页的实施例1以及说明书第3页的第2段.

CN 102154251 A, 2011.08.17, 权利要求1, 4.

CN 102531766 A, 2012.07.04, 全文.

CN 101186879 A, 2008.05.28, 全文.

CN 1140159 A, 1997.01.15, 第7-9页的实施例1以及说明书第3页的第2段.

审查员 李有朝

权利要求书1页 说明书10页

(54) 发明名称

一种微生态复合肥的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种微生态复合肥的制备方法,属于农用肥料技术领域,所微生态复合肥的制备方法,是将胶质芽孢杆菌菌剂、解磷巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉培养物和植物乳杆菌按比例组合为微生态复合肥。本发明的肥料由复合微生物发酵的方法而制备,能够改善土壤的生态环境,为农作物的生长提供有益条件。本发明的复合菌种中的胶质芽孢杆菌能分泌生长素物质和赤霉素物质等促生长物质,增根壮苗;分解土壤里硅元素供植物利用,使得植物的蜡质层增厚,提高植物保水能力;本发明使用的黑曲霉具有产高活力纤维素酶的特性,纤维素酶有利于土壤有机质的分解,腐殖质的形成和碳素营养的释放。

1. 一种微生态复合肥的制备方法,其特征在于,重量份数组成为:胶质芽孢杆菌菌剂 3-6 份,解磷巨大芽孢杆菌菌剂 2-6 份,枯草芽孢杆菌培养物 10-15 份,黑曲霉培养物 8-15 份,植物乳杆菌剂 1-4 份;所述枯草芽孢杆菌保藏号为 CGMCC No. 7926,所述黑曲霉保藏编号为 CGMCC NO. 7927,所述植物乳杆菌保藏编号为 CGMCC No. 7928。

2. 根据权利要求 1 所述微生态复合肥的制备方法,其特征在于,所述枯草芽孢杆菌培养物的制备方法如下: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、干燥后获得含枯草芽孢杆菌菌剂的培养物。

3. 根据权利要求 1 所述微生态复合肥的制备方法,其特征在于,所述植物乳杆菌剂的制备方法如下: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:CaCO<sub>3</sub> 20-30 份,糊精 10-15 份,流化床干燥,干燥温度 50℃。

4. 根据权利要求 1 所述微生态复合肥的制备方法,其特征在于,所述黑曲霉培养物的制备方法如下:固体发酵培养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;

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。

5. 根据权利要求 1 所述一种微生态复合肥的制备方法,其特征在于,重量份数组成为:胶质芽孢杆菌菌剂 5 份,解磷巨大芽孢杆菌菌剂 3 份,枯草芽孢杆菌培养物 10 份,黑曲霉培养物 12 份,植物乳杆菌剂 2 份。

6. 根据权利要求 1 所述一种微生态复合肥的制备方法,其特征在于,重量份数组成为:胶质芽孢杆菌菌剂 4 份,解磷巨大芽孢杆菌菌剂 5 份,枯草芽孢杆菌培养物 14 份,黑曲霉培养物 13 份,植物乳杆菌剂 3 份。

## 一种微生物复合肥的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物肥加工方法,属于农用肥料技术领域,特别涉及一种微生物复合肥及其制备方法。

### 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。微生物肥料的功效发挥主要是通过对传统化肥、有机肥的增效作用,对土壤的改良活化作用,以及微生物的生理作用等方式来实现的。

[0003] 因此,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。

[0004] 而目前市场上的农用微生物菌剂主要为单一的微生物菌种,难以还原微生物生态结构,同时普通菌种和农作物的协同作用弱,不利如提高植物抗逆性和根系营养吸收,例如公布号为 CN103374528A 的专利申请,公开了一种采用黑曲霉制备的能够高效解磷的微生物菌剂,利用了黑曲霉对难溶性磷酸盐具有较强的转化能力,并能将含磷的有机化合物(如植素等)分解成能被植物吸收利用的可溶性磷的特性。又例如公布号为 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。

[0005] 由于我国长期在微生物肥料方面研究缺乏投入,使得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。在农业可持续发展已成为人类共识的今天,这些问题成了微生物肥行业函待打通的“瓶颈”。

### 发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种微生物复合肥的制备方法。

[0007] 本发明的技术解决方案是:一种微生物复合肥的制备方法,将胶质芽孢杆菌菌剂、解磷巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉培养物和植物乳杆菌按比例组合为微生物复合

肥;所述生态复合肥料重量份数组成为:胶质芽孢杆菌菌剂 3-6 份,解磷巨大芽孢杆菌菌剂 2-6 份,枯草芽孢杆菌培养物 10-15,黑曲霉培养物 8-15,植物乳杆菌剂 1-4 份。

[0008] 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入发酵罐中,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菌剂的培养物。

[0009] 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:CaCO<sub>3</sub> 20-30 份,糊精 10-15 份。流化床干燥,干燥温度 50℃。

[0010] 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,26-33℃培养至菌丝长满培养料,低温流化床干燥,粉碎干燥物;采用常见固态发酵法制备获得。

[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*) CGMCC7928

[0014] 黑曲霉(*Aspergillus niger*) CGMCC NO. 7927

[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:中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号;邮编:100101。

[0016] 解磷巨大芽孢杆菌是芽孢杆菌属(*Bacillus*)中的一个种。运动,形成荚膜,好氧。从葡萄糖产酸,也常从阿拉伯糖和甘露醇产酸。水解淀粉,不产生卵磷脂酶,VP 阴性。能分解土壤中的有机磷成为植物可利用的速效磷。

[0017] 解磷巨大芽孢杆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。

[0018] 河北保定瑞谷生物科技有限公司提供胶质芽孢杆菌菌粉。

[0019] 有益效果

[0020] 本发明的肥料由复合微生物发酵而成,能够改善土壤的生态环境,为农作物的生长提供有益条件。

[0021] 胶质芽孢杆菌又称硅酸盐细菌,其重要特性是能够分解出长石、云母等矿物中的钾、硅,也能分解出磷灰石中的磷,以及分泌植物生长刺激素及多种酶,以增强作物对一些病害的抵抗力。菌体内的钾在菌体死亡后,游离出来,又可被植物吸收利用。作为微生物肥料中的一种重要功能菌,可提高土壤速效钾、磷含量,提高作物产量和品质等多种效。

[0022] 本发明的复合菌种中的胶质芽孢杆菌能分泌生长素物质和赤霉素物质等促生长物质,增根壮苗;分解土壤里硅元素供植物利用,使得植物的蜡质层增厚,提高植物保水能力;能促进土壤团粒结构形成,防止土壤板结;破坏土壤毛细现象,防止土壤水分蒸发。

[0023] 在生物肥料工业上,黑曲霉具有裂解大分子有机物和难溶无机物,便于作物吸收利用,改善土壤结构,增强土壤肥力,提高作物产量的效果。黑曲霉具有解磷的特性,可以利用固定态、吸附态的磷,有效缓解土壤中缺磷的现状,而且对提高磷肥利用率,减少磷肥的使用所造成的环境污染。

[0024] 本发明使用的黑曲霉还具有产高活力纤维素酶的特性,纤维素酶有利于土壤有机

质的分解,腐殖质的形成和碳素营养的释放,用在果类作物上,能使果肉细嫩清脆,果汁丰富,口感良好。

[0025] 本发明的肥料营养丰富,有机质含量高,能够满足有机食品的生产需要。

[0026] 本发明的肥料能够增强作物的抗病虫害能力。

[0027] 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,占土壤有机质的 0.1%,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,在一定的条件下,还能参与腐殖质形成。

[0028] 本产品使用方法简单,每亩地使用量 0.3-1 公斤,成本仅为 80-100 元/亩,拌种或生长期灌水前地表喷洒。

### 具体实施方式

[0029] 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。

[0030] 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。

[0031] 实施例 1

[0032] 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。

[0033] 所述菌株特性是产耐高温  $\alpha$ -淀粉酶的酶活力高,耐热、耐酸性强。

[0034] 所述菌株制备的耐高温  $\alpha$ -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。

[0035] 所述菌株特点如下:

[0036] 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。

[0037] 所述枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)Li-2013-02 由一株产耐高温  $\alpha$ -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:

[0038] (1) 菌悬液的制备

[0039] 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。

[0040] (2) 紫外线-氯化锂-硫酸二乙酯复合诱变

[0041] 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 $^{\circ}$ C 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。

[0042] (3) 高产菌种的初筛

[0043] 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。

[0044] (4) 摇瓶发酵复筛

[0045] 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。

[0046] (5) 酶活测定

[0047] 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。

[0048] 经测定,菌株 Li-2013-02,为稳定的最高产菌株,且酶活达到 30000U/mL。

[0049] 所述氯化锂平板:淀粉 1%,蛋白胨 1%, $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ 0.4%, $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.8%, $\text{CaCl}_2$ 0.2%,氯化锂 0.9%,琼脂 2%。

[0050] 所述的种子培养基:酵母粉 0.5%,蛋白胨 1%,可溶性淀粉 1%,NaCl1%。

[0051] 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%, $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.8%, $\text{CaCl}_2$ 0.2%。

[0052] 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。

[0053] 所述耐高温的  $\alpha$ -淀粉酶,其酶学性质如下:

[0054] (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。

[0055] (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。

[0056] (3) 酶活性:由本发明所提供的突变株 Li-2013-02,制备的耐高温  $\alpha$ -淀粉酶酶活力为 30000-35000U/ml。

[0057] 本发明所提供的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) Li-2013-01,该菌株保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC No. 7928,保藏地址: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。保藏日期 2013 年 7 月 15 日。该菌株特点如下:在显微镜下观察,该菌株为短杆状,革兰氏染色呈阳性,无边毛,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。理化特征为:过氧化氢酶(-),明胶液化(-),吡啶实验(+),运动性(-),发酵产气(-),亚硝酸盐还原(-),发酵产气(-),产硫化氢气体(-),pH4.5MRS 培养基中生长(+)

[0058] 本发明植物乳杆菌采用下述流程进行选育:

[0059] 原始出发菌种→试管活化→硫酸二乙酯(DES)诱变→平板初筛→亚硝基胍(NTG)诱变→平板初筛→摇瓶复筛→传代稳定性试验。

[0060] 原始出发菌种为 CICC20242, 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

[0061] 本发明所采用的原始菌株在木聚糖培养基中, 乳酸的产量为 12.5g/L。为了提高其乳酸产量, 依次采用 DES 和 NTG 对该菌种进行诱变, 诱变采用 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。

[0062] 菌株 CGMCC No. 7928 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, 因此把菌株 CGMCC No. 7928 作为选育得到的目的菌株。

[0063] 将目的菌株 CGMCC No. 7928 做 10L 发酵罐实验, 结果表明: 发酵 72h 后, 以木聚糖为碳源, 植物乳杆菌 CGMCC No. 7928 的乳酸浓度可以达到 57g/L, 与出发菌株相比提高了 356%。

[0064] 将目的菌株 CGMCC No. 7928 做 10L 发酵罐实验, 结果表明: 发酵 72h 后, 以葡萄糖为碳源, 植物乳杆菌 CGMCC No. 7928 的乳酸浓度可以达到 68g/L。

[0065] 具体过程如下:

[0066] 培养基:

[0067] 液体 MRS 木聚糖培养基(牛肉膏 2g、蛋白胨 10g、酵母膏 5g、木聚糖 20g、乙酸钠 5g、柠檬酸铵 2g、磷酸氢二钾 2g、七水硫酸镁 0.2g、七水硫酸锰 0.05g, 逐一溶解后, 自来水定容 1000mL, 调节 pH7.0-7.2); MRS 木聚糖筛选固体培养基(牛肉膏 2g、蛋白胨 10g、酵母膏 5g、木聚糖 90g、乙酸钠 5g、柠檬酸铵 2g、磷酸氢二钾 2g、七水硫酸镁 0.2g、七水硫酸锰 0.05g, 逐一溶解后, 自来水定容 1000mL, 调节 pH7.0-7.2, 加入 20g 琼脂)。

[0068] 1. 硫酸二乙酯(DES) 诱变选育

[0069] 1) 在超净台上取试管斜面上的植物乳杆菌一环, 接入装有 50mL 液体 MRS 木聚糖培养基的 250mL 三角瓶中, 200rpm, 40℃ 培养 12h 左右, 使菌体处于对数生长前期。

[0070] 2) 取 5mL 菌液, 5000rpm 离心 10min 收集菌体, 用生理盐水洗涤 2 次。

[0071] 3) 用 pH7.0 磷酸缓冲液稀释成  $10^7$  个/mL 菌悬液。

[0072] 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)。

[0073] 5) 在 30℃ 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。

[0074] 6) 稀释涂布于含 90g/L 木聚糖的 MRS 木聚糖筛选固体培养基平板中。在 40℃ 培养 2~3 天后挑取透明圈/菌落直径最大的菌株, 标号为 DES 菌。

[0075] 2. 亚硝基胍诱变

[0076] 1) 在超净台上取试管斜面上的植物乳杆菌 DES 一环, 接入装有 50mL 液体 MRS 木聚糖培养基的 250mL 三角瓶中, 200rpm, 40℃ 培养 12h 左右, 使菌体处于对数生长前期。

[0077] 2) 取 5mL 菌液 5000rpm 离心 10min 收集菌体, 用生理盐水洗涤 2 次。

[0078] 3) 用 pH6.0 磷酸缓冲液稀释成  $10^7$  个/mL 菌悬液。

[0079] 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。

[0080] 5) 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。

[0081] 6) 适当稀释,取最后稀释度的菌液 0.2mL,稀释涂布于含 90g/L 木聚糖的 MRS 木聚糖筛选固体培养基平板中。在 40℃ 培养 2~3 天后挑取透明圈/菌落直径较大的菌株 150 支。

[0082] 3. 摇瓶复筛

[0083] 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 液体 MRS 木聚糖培养基的 250mL 三角瓶中,200rpm,40℃ 培养 3-4 天,每天检测葡萄糖浓度和 L-乳酸浓度变化。发酵结束后,比较 150 株菌种的木聚糖消耗速率和乳酸产生速率、乳酸的转化率以及杂酸含量。

[0084] 2) 选择木聚糖代谢速率快、乳酸浓度高、转化率高以及杂酸含量少的菌种为最终菌种,命名为 Li 菌。

[0085] 4. 遗传稳定性试验

[0086] 将 Li-2013-01 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。

[0087] 本发明提供的黑曲霉 *Aspergillus niger* Li-2013-03 是由天津工业大学实验室保藏的一株产纤维素酶的黑曲霉 *Aspergillus niger* Li-2010 经亚硝基胍多轮诱变筛选,然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。

[0088] 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。

[0089] 本发明黑曲霉菌株 *Aspergillus niger* Li-2013-03 (CGMCC No. 7927) 具有以下微生物学特征:

[0090] 1、形态学特征:

[0091] 黑曲霉菌株 CGMCC No. 7927,生物学形态为包括分生孢子、胞梗、顶囊、产胞结构等几部分。分生孢子头球形至辐射形,直径 150-450  $\mu\text{m}$ ,分生孢子梗发生于基质。胞梗茎 1000-3000(长度) $\times$ 12-20(直径)  $\mu\text{m}$ ,黄色或黄褐色,壁平滑;顶囊球形或近似球形,直径 45-75  $\mu\text{m}$ ,表面全面可育;产胞结构双层,梗基 10-20(长度) $\times$ 4.5-7.0(直径)  $\mu\text{m}$ ,瓶梗 6-10(长度) $\times$ 2.5-3.5(直径)  $\mu\text{m}$ ,分生孢子球形或近球形,直径 3-4.5  $\mu\text{m}$ ,褐色,壁粗糙。

[0092] 2、培养学特征:

[0093] 菌株在麦芽汁琼脂培养基上生长迅速,28℃ 4 天孢子可铺满斜面;质地丝绒状或稍带絮状;分生孢子结构大量,褐黑色,无渗出液;菌落反面略带黄色。

[0094] 3、生理生化特征:

[0095] 黑曲霉菌株 CGMCC No. 7927 可在玉米秸秆、稻草、木屑、马铃薯、玉米粉、可溶性淀粉、糖蜜等碳源上生长,最适 pH 范围 5-6,最适生长温度范围 28-33℃,最适产酶温度范围 28-30℃。

[0096] 本发明黑曲霉菌株 CGMCC No. 7927 的筛选技术路线为:出发菌株→斜面培养→孢

子悬液的制备→诱变处理→平板分离→初筛→复筛→遗传稳定性测定→扩大实验(发酵性能测定)。

[0097] 按诱变筛选方案,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,得到一株高产酶性能菌株黑曲霉菌 *Aspergillus niger* Li-2013-03,发酵96小时后纤维素酶的外切 $\beta$ -葡聚糖酶、内切 $\beta$ -葡聚糖酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和滤纸酶活力分别达到620U/mL、1289U/mL、456U/mL和732U/mL。

[0098] 28℃发酵4天直径75mm,发酵液纤维素酶的外切 $\beta$ -葡聚糖酶、内切 $\beta$ -葡聚糖酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和滤纸酶活力分别达到620U/mL、1289U/mL、456U/mL和732U/mL,分别比出发菌株提高了9.21倍、7.43倍、8.15倍和10.31倍。

[0099] 产高活力纤维素酶菌株的筛选方法,包括以下步骤:

[0100] 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:120Brix 麦芽汁1000mL,pH值自然,121℃灭菌20min;

[0101] 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。

[0102] 3) 亚硝基胍(NTG)诱变

[0103] ①用无菌水将孢子悬浮液调节为稀释成 $10^6$ - $10^7$ 个/mL。

[0104] ②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。

[0105] ③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。

[0106] ④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)。

[0107] ⑤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。

[0108] 4) 遗传稳定性试验

[0109] 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。

[0110] 5) 放大试验

[0111] 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。

[0112] ②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  $6.0 \pm 0.2$ , 培养温度  $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , 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。

[0113] 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  $\beta$ -葡聚糖酶、内切  $\beta$ -葡聚糖酶、 $\beta$ -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。

[0114] 实施例 2

[0115] 一种微生态复合肥,重量份数组成为:胶质芽孢杆菌菌剂 5 份,解磷巨大芽孢杆菌菌剂 3 份,枯草芽孢杆菌培养物 10 份,黑曲霉培养物 12 份,植物乳杆菌剂 2 份。

[0116] 枯草芽孢杆菌培养物的制备方法:

[0117] 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;

[0118] (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;

[0119] (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;

[0120] (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;

[0121] (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;

[0122] (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。发酵液板框过滤后干燥获得。

[0123] 培养基组成:葡萄糖 6%, 酵母提取物 1%, 蛋白胨 0.2%,  $\text{CaCO}_3$  1%, pH6.8。

[0124] 植物乳杆菌剂的制备方法:

[0125] (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;

[0126] (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;

[0127] (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;

[0128] (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;

[0129] (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：CaCO<sub>3</sub>25 份，糊精 12 份，流化床干燥，干燥温度 50℃。

[0130] 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%，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0.2%，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O0.02%，MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O0.005%，CaCO<sub>3</sub>2%，琼脂 1.5%，pH6.8。

[0131] 黑曲霉培养物的制备方法：

[0132] 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；

[0133] 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；

[0134] 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；

[0135] 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；

[0136] 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；

[0137] 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。

[0138] 实施例 3

[0139] 一种微生物复合肥料，重量份数组成为：胶质芽孢杆菌菌剂 4 份，解磷巨大芽孢杆菌菌剂 5 份，枯草芽孢杆菌培养物 14 份，黑曲霉培养物 13 份，植物乳杆菌剂 3 份。

[0140] 一种生产微生物复合肥料的方法，将胶质芽孢杆菌菌剂、解磷巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉培养物和植物乳杆菌按比例组合为微生物复合肥料。

[0141] 枯草芽孢杆菌剂培养制备：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。

[0142] 植物乳杆菌剂的制备：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 0.6:1，载体组成为：CaCO<sub>3</sub>30 份，糊精 16 份。流化床干燥，干燥温度 50℃。

[0143] 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 35℃干燥，粉碎干燥物。

[0144] 实施例 4

[0145] 产品效果实验

[0146] 试验地的选择与试验设计：试验于 2009 年 3 月 27 日—10 月 30 日在宁夏盐池县花马池镇八堡村进行。

[0147] 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 0.5 公斤，出苗

1 个月左右通过锄地松土方式使用发明产品 0.5 公斤,对照组使用常规肥料。

[0148] 发明产品使用玉米地玉米产量达到 650 公斤,对照组达到 500 公斤;发明产品的使用使玉米亩产量提高了 30%。该地块在第 2 年种植春小麦,春小麦产量达到了 400 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。