



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106187331 B

(45)授权公告日 2019.11.05

(21)申请号 201610552259.6

(22)申请日 2016.07.13

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106187331 A

(43)申请公布日 2016.12.07

(73)专利权人 中国科学院合肥物质科学研究院

地址 230031 安徽省合肥市蜀山区蜀山路350号

(72)发明人 吴丽芳 黄胜威 高战元 潘高志

李明浩 赵薇薇 陈雪 蔡冬清

吴正岩

(74)专利代理机构 合肥市浩智运专利代理事务所(普通合伙) 34124

代理人 丁瑞瑞

(51)Int.Cl.

C05F 3/00(2006.01)

C05F 17/00(2006.01)

C12N 15/01(2006.01)

C12N 1/20(2006.01)

C12R 1/065(2006.01)

C12R 1/40(2006.01)

C12R 1/125(2006.01)

C12R 1/07(2006.01)

C12R 1/645(2006.01)

C12R 1/46(2006.01)

(56)对比文件

CN 105624072 A,2016.06.01,

审查员 周磊

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种利用禽畜粪便制备复合微生物生态菌肥及其方法

(57)摘要

本发明公开了一种利用禽畜粪便制备复合微生物生态菌肥及其方法,将自土壤和猪粪便中分离得到圆褐固氮菌和恶臭假单胞菌进行氮离子注入诱变,筛选高活性突变菌株;将枯草芽孢杆菌、侧孢芽孢杆菌,圆褐固氮菌和恶臭假单胞菌、酵母菌、乳酸链球菌六株菌株分别单独发酵,获得发酵菌液;按照1~3:5~8:1~2:2~3:1.5~3:3~5的体积比混合,制得复合菌液,按质量浓度2~5%向上述复合菌剂中加入甘蔗糖蜜的新鲜培养基质;按质量浓度2~2.5%向复合菌液中加入山梨酸钾,搅拌均匀;添加0.4~1g/L的凹凸棒土,搅拌均匀,即制得活性菌剂;在化粪池内投入上述活性菌剂,待粪便分解处理完成后,干湿分离,固体部分为复合微生物菌肥。

1. 一种利用禽畜粪便制备复合微生物生态菌肥的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 辐照诱变:

将自土壤和猪粪便中分离得到圆褐固氮菌*A. chroococcumcas1*和恶臭假单胞菌*Pseudomonasputida*进行氮离子注入诱变,筛选高活性突变菌株;

(2) 单菌株发酵:

将枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilisCZ9*、侧孢芽孢杆菌*Bacillus LateraporusHF12*、圆褐固氮菌*A. chroococcumcas1*、恶臭假单胞菌*P. putidacas8*、酵母菌*SporobolomycesroseusCZ3*、乳酸链球菌*StreptococcuslactisCZ5*六株菌株分别单独发酵,获得发酵菌液;

步骤(2)中,枯草芽孢杆菌*B. subtilisCZ9*和侧孢芽孢杆菌*Bacillus LateraporusHF12*采用LBG培养基培养24~36h:接种量为1~2%,摇床转速为180~200rpm,所述LBG培养基包括葡萄糖50g,蛋白胨10g,酵母膏5g,氯化钠10g,纯水1000ml;

步骤(2)中,圆褐固氮菌*A. chroococcumcas1*采用Ashby培养基培养24~36h:接种量为1~2%,摇床转速为180~200rpm,所述Ashby培养基包括葡萄糖10g,磷酸氢二钾0.2g,硫酸镁0.2g,氯化钠0.2g,硫酸钙0.2g,碳酸钙5g,纯水1000ml;

步骤(2)中,恶臭假单胞菌*P. putidacas8cas8*采用LB培养基培养24~36h:接种量为1~2%,摇床转速为180~200rpm,所述LB培养基包括胰蛋白胨10g,酵母膏5g,氯化钠10g,纯水1000ml;

步骤(2)中,酵母菌*SporobolomycesroseusCZ3*采用YPD培养基培养24~36h:接种量为1~2%,摇床转速为180~200rpm,所述YPD培养基包括酵母提取物10g,蛋白胨20g,葡萄糖20g,纯水1000ml;

步骤(2)中,乳酸链球菌*StreptococcuslactisCZ5*采用发酵培养基培养24~36h:接种量为1~2%,摇床转速为180~200rpm,所述发酵培养基包括蔗糖10g,蛋白胨20g,酵母膏10g,磷酸二氢钾30g,氯化钠2g,硫酸镁0.2g,纯水1000ml;

(3) 复合菌液制备:

上述各单菌株发酵结束后,将枯草芽孢杆菌*B. subtilisCZ9*、侧孢芽孢杆菌*Bacillus LateraporusHF12*、圆褐固氮菌*A. chroococcumcas1*、恶臭假单胞菌*P. putidacas8*、酵母菌*SporobolomycesroseusCZ3*、乳酸链球菌*StreptococcuslactisCZ5*的新鲜发酵菌液,按照1~3:5~8:1~2:2~3:1.5~3:3~5的体积比混合,制得复合菌液,其中有效活菌数为 $1.35 \times 10^9 \sim 2.4 \times 10^9$ cfu/ml;

(4) 新鲜培养基添加:

按质量浓度2~5%向上述复合菌剂中加入甘蔗糖蜜新鲜培养基质;

(5) 保护剂添加:

按质量浓度2~2.5%向步骤(4)的液体中加入山梨酸钾,搅拌均匀;

(6) 载体添加:

向步骤(5)的菌液中添加0.4~1g/L的凹凸棒土,搅拌均匀,即制得活性菌剂;

(7) 复合微生物生态菌肥制备:

在化粪池内投入上述活性菌剂,待粪便分解处理完成后,干湿分离,固体部分为复合微生物菌肥。

2. 根据权利要求1所述的一种利用禽畜粪便制备复合微生物生态菌肥的方法,其特征在于,所述步骤(1)中的圆褐固氮菌*A. chroococcumcas1*氮离子注入诱变及筛选具体过程如下:

圆褐固氮菌*A. chroococcumcas1*采用Ashby培养平板上培养48~72h,挑取单菌落至Ashby液体培养基中,120rpm,震荡培养48~72h,菌液离心洗涤3~4次,制成单细胞悬液,使细胞浓度在 $10^8 \sim 10^9$ 个/mL;取0.1mL菌悬液均匀涂布到无菌培养皿中,置于超净工作台风干制成菌膜;在 N^+ 注入机中进行离子注入,注入能量为12~18KeV,注入剂量为 $4.6 \times 10^{14} \sim 27.6 \times 10^{14} N^+ / cm^2$,获得固氮能力相比出发菌株提高361%的菌株*cas1*,命名为*A. chroococcumcas1*。

3. 根据权利要求1所述的一种利用禽畜粪便制备复合微生物生态菌肥的方法,其特征在于,所述步骤(1)中的恶臭假单胞菌*P. putidacas8*氮离子注入诱变及筛选具体过程如下:

恶臭假单胞菌*P. putidacas8*采用LB培养平板上培养24~48h,挑取单菌落至LB液体培养基中,120rpm,震荡培养36~48h,菌液离心洗涤3~4次,制成单细胞悬液,使细胞浓度在 $10^8 \sim 10^9$ 个/mL;取0.1mL菌悬液均匀涂布到无菌培养皿中,置于超净工作台风干制成菌膜,在 N^+ 注入机中进行离子注入,注入能量10~12KeV,注入剂量为 $3.8 \times 10^{14} \sim 24.8 \times 10^{14} N^+ / cm^2$,获得解磷能力相比出发菌株提高285%的菌株*cas8*,命名为*P. putidacas8*。

4. 根据权利要求1所述的一种利用禽畜粪便制备复合微生物生态菌肥的方法,其特征在于,所述步骤(7)包括以下步骤:

(71) 在装有禽畜粪便、沼液的化粪池中,按照1~2公斤/吨的用量,添加步骤(6)制得的活性菌剂,每天向化粪池中供氧2~4h,提供微生物所需的氧气;

(72) 3~5d后,化粪池中布满气泡,同时臭味消失,表明粪便分解处理完成;

(73) 然后将化粪池中的粪便抽取上来,进行干湿分离,其中固体部分即为复合微生物菌肥,按照常规有机肥施用方式运用于农业生产中。

5. 如权利要求1~4任一项所述的一种利用禽畜粪便制备复合微生物生态菌肥的方法制备得到的复合微生物菌肥。

一种利用禽畜粪便制备复合微生物生态菌肥及其方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种微生物菌肥,尤其涉及的是一种利用禽畜粪便制备复合微生物生态菌肥及其方法。

背景技术

[0002] 随着我国畜禽养殖业的发展和“菜篮子工程”的实施,规模化、集约化畜禽养殖业迅速崛起,畜禽粪便的产生量逐年增加。大量禽畜粪便因得不到充分利用,造成巨大的污染,如侵占土地、污染土壤、污染水体、污染空气、影响环境卫生等,成为种植、养殖、农副产品加工等生产企业及各级政府棘手的问题。因此,实现禽畜粪便的资源化利用,是我国发展生态养殖业亟需解决的重要问题之一。

[0003] 近年来,化肥和农药大量使用带来的环境污染、土壤板结、农产品品质降低等一系列问题日益引起人们重视。利用禽畜粪便、秸秆等废弃物生产生物菌肥,不仅可以改良土壤结构和地力,而且可以有效减少化肥和农药的用量,是当前农业环境领域发展方向之一。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供了一种利用禽畜粪便制备复合微生物生态菌肥及其方法,生产出有效氮磷钾含量丰富的生物菌肥。

[0005] 本发明是通过以下技术方案实现的,本发明包括以下步骤:

[0006] (1) 辐照诱变:

[0007] 将自土壤和猪粪便中分离得到圆褐固氮菌*A. chroococcum*cas1和恶臭假单胞菌*Pseudomonas putida*进行氮离子注入诱变,筛选高活性突变菌株;

[0008] (2) 单株菌发酵:

[0009] 将枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*CZ9、侧孢芽孢杆菌*Bacillus laterosporus*HF12、圆褐固氮菌*A. chroococcum*cas1、恶臭假单胞菌*P. putida*cas8、酵母菌*Sporobolomyces roseus*CZ3、乳酸链球菌*Streptococcus lactis*CZ5六株菌株分别单独发酵,获得发酵菌液;

[0010] (3) 复合菌液制备:

[0011] 上述各单菌株发酵结束后,将枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*CZ9、侧孢芽孢杆菌*Bacillus laterosporus*HF12、圆褐固氮菌*A. chroococcum*cas1、恶臭假单胞菌*P. putida*cas8、酵母菌*Sporobolomyces roseus*CZ3、乳酸链球菌*Streptococcus lactis*CZ5的新鲜发酵菌液,按照1~3:5~8:1~2:2~3:1.5~3:3~5的体积比混合,制得复合菌液,其中有效活菌数为 $1.35 \times 10^9 \sim 2.4 \times 10^9$ cfu/ml;

[0012] (4) 新鲜培养基添加:

[0013] 按质量浓度2~5%向上述复合菌剂中加入甘蔗糖蜜新鲜培养基;

[0014] (5) 保护剂添加:

[0015] 按质量浓度2~2.5‰向步骤(4)的液体中加入山梨酸钾,搅拌均匀;

[0016] (6) 载体添加:

[0017] 向步骤(5)的菌液中添加0.4~1g/L的凹凸棒土,搅拌均匀,即制得活性菌剂;

[0018] (7) 复合微生物生态菌肥制备:

[0019] 在化粪池内投入上述活性菌剂,待粪便分解处理完成后,干湿分离,固体部分为复合微生物菌肥。

[0020] 所述步骤(1)中的圆褐固氮菌*A. chroococcum*cas1氮离子注入诱变及筛选具体过程如下:

[0021] 圆褐固氮菌*A. chroococcum*cas1采用Ashby培养平板上培养48~72h,挑取单菌落至Ashby液体培养基中,120rpm,震荡培养48~72h,菌液离心洗涤3~4次,制成单细胞悬液,使细胞浓度在 $10^8 \sim 10^9$ 个/mL;取0.1mL菌悬液均匀涂布到无菌培养皿中,置于超净工作台风干制成菌膜。在N+注入机中进行离子注入,注入能量为12~18KeV,注入剂量为 $4.6 \times 10^{14} \sim 27.6 \times 10^{14} N^+ / cm^2$,获得固氮能力相比出发菌株提高361%的菌株cas1,命名为*A. chroococcum*cas1cas1。

[0022] 所述步骤(1)中的恶臭假单胞菌*P. putidaca*s8氮离子注入诱变及筛选具体过程如下:

[0023] 恶臭假单胞菌*P. putidaca*s8采用LB培养平板上培养24~48h,挑取单菌落至LB液体培养基中,120rpm,震荡培养36~48h,菌液离心洗涤3~4次,制成单细胞悬液,使细胞浓度在 $10^8 \sim 10^9$ 个/mL。取0.1mL菌悬液均匀涂布到无菌培养皿中,置于超净工作台风干制成菌膜,在N+注入机中进行离子注入,注入能量10~12KeV,注入剂量为 $3.8 \times 10^{14} \sim 24.8 \times 10^{14} N^+ / cm^2$,获得解磷能力相比出发菌株提高285%的菌株cas8,命名为*P. putidaca*s8。

[0024] 所述步骤(2)中,枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*CZ9和侧孢芽孢杆菌*Bacillus Lateraporus*HF12采用LBG培养基培养24~36h:接种量为1~2%,摇床转速为180~200rpm,所述LBG培养基包括葡萄糖50g,蛋白胨10g,酵母膏5g,氯化钠10g,纯水1000ml。

[0025] 所述步骤(2)中,圆褐固氮菌*A. chroococcum*cas1采用Ashby培养基)培养24~36h:接种量为1~2%,摇床转速为180~200rpm,所述Ashby培养基包括葡萄糖10g,磷酸氢二钾0.2g,硫酸镁0.2g,氯化钠0.2g,硫酸钙0.2g,碳酸钙5g,纯水1000ml。

[0026] 所述步骤(2)中,恶臭假单胞菌*P. putidaca*s8cas8采用LB培养基培养24~36h:接种量为1~2%,摇床转速为180~200rpm,所述LB培养基包括胰蛋白胨10g,酵母膏5g,氯化钠10g,纯水1000ml。

[0027] 所述步骤(2)中,酵母菌*Sporobolomyces roseus*CZ3采用YPD培养基培养24~36h:接种量为1~2%,摇床转速为180~200rpm,所述YPD培养基包括酵母提取物10g,蛋白胨20g,葡萄糖20g,纯水1000ml。

[0028] 所述步骤(2)中,乳酸链球菌*Streptococcus lactis*CZ5采用发酵培养基培养24~36h:接种量为1~2%,摇床转速为180~200rpm,所述发酵培养基包括蔗糖10g,蛋白胨20g,酵母膏10g,磷酸二氢钾30g,氯化钠2g,硫酸镁0.2g,纯水1000ml。

[0029] 所述步骤(7)包括以下步骤:

[0030] (71) 在装有禽畜粪便、沼液的化粪池中,按照1~2公斤/吨的用量,添加步骤(6)制得的活性菌剂,每天向化粪池中供氧2~4h,提供微生物所需的氧气;

[0031] (72) 3~5d后,化粪池中布满气泡,同时臭味消失,表明粪便分解处理完成;

[0032] (73)然后将化粪池中的粪便抽取上来,进行干湿分离,其中固体部分即为复合微生物菌肥,按照常规有机肥施用方式运用于农业生产中。

[0033] 如所述的一种利用禽畜粪便制备复合微生物生态菌肥的方法制备得到的复合微生物菌肥。

[0034] 通过多种秸秆降解菌/解磷菌/解钾菌的协同作用,直接在化粪池中快速分解禽畜粪便,同时杀死粪便中残留的病原菌,从而生产出有效氮磷钾含量丰富的生物菌肥。

[0035] 本发明相比现有技术具有以下优点:本发明利用六种秸秆降解菌/解磷菌/解钾菌的协同作用,解决了传统禽畜粪便堆肥处理需预先粪尿分离、粪便降解慢、肥效差等问题,具有菌株组合新、结构稳、活性强、有机物降解程度高、有效氮磷钾含量高等特点,大大提高了粪便资源化利用的处理速度和效率,制得的微生物复合菌肥施用到农田中,可显著改善土壤结构,提高土壤肥力,减少化肥和农药的使用,具有明显的生态效益和经济效益。本发明提供的微生物复合菌肥制造工艺简单,且制备过程中采用的保护剂和载体均环境友好,保证了菌肥的安全性。

具体实施方式

[0036] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0037] 实施例1

[0038] 本实施例的复合微生物菌肥的菌株构成如下:

[0039] 枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*CZ9, 1.0×10^8 cfu/ml;

[0040] 恶臭假单胞菌*P. putidacas*8, 5.0×10^8 cfu/ml;

[0041] 侧孢芽孢杆菌*Bacillus Lateraporus*HF12, 1.0×10^8 cfu/ml;

[0042] 圆褐固氮菌*A. chroococcumcas*1, 2.0×10^8 cfu/ml;

[0043] 酵母菌*Sporobolomyces roseus*CZ3, 1.5×10^8 cfu/ml;

[0044] 乳酸链球菌*Streptococcus lactis*CZ5, 3.0×10^8 cfu/ml。

[0045] 本实施例的制备方法如下:

[0046] (1)单株菌发酵:将枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*CZ9、侧孢芽孢杆菌*Bacillus Lateraporus*HF12、圆褐固氮菌*A. chroococcumcas*1、恶臭假单胞菌*P. putidacas*8、酵母菌*S. roseus*CZ3、乳酸链球菌*Streptococcus lactis*CZ5六株菌分别单独进行发酵,获得发酵菌液。

[0047] 具体发酵过程如下:

[0048] 枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*CZ9和侧孢芽孢杆菌*Bacillus Lateraporus*HF12采用LBG培养基(葡萄糖50g,蛋白胨10g,酵母膏5g,氯化钠10g,纯水1000ml)培养;接种量为1%,180rpm,培养24h。

[0049] 圆褐固氮菌*A. chroococcumcas*1采用Ashby培养基(葡萄糖10g,磷酸氢二钾0.2g,硫酸镁0.2g,氯化钠0.2g,硫酸钙0.2g,碳酸钙5g,纯水1000ml)培养;接种量为1%,180rpm,培养24h。

[0050] 恶臭假单胞菌*P. putidacas*8采用LB培养基(胰蛋白胨10g,酵母膏5g,氯化钠10g,

纯水1000ml)培养。接种量为1%，180rpm，培养24h。

[0051] 酵母菌SporobolomycesroseusCZ3采用YPD培养基(酵母提取物10g,蛋白胨20g,葡萄糖20g,纯水1000ml)培养;接种量为1%，180rpm，培养24h。

[0052] 乳酸链球菌StreptococcuslactisCZ5发酵培养基(蔗糖10g,蛋白胨20g,酵母膏10g,磷酸二氢钾30g,氯化钠2g,硫酸镁0.2g,纯水1000ml),接种量为1%，180rpm，培养24h。

[0053] (2) 复合菌液制备:上述各单菌株发酵结束后,将枯草芽孢杆菌Bacillus subtilisCZ9、侧孢芽孢杆菌Bacillus LateraporusHF12、圆褐固氮菌A. chroococcumcas1和恶臭假单胞菌P. putidacas8、酵母菌SporobolomycesroseusCZ3、乳酸链球菌StreptococcuslactisCZ5六株菌新鲜发酵菌液按照1:5:1:2:1.5:3的体积比混合,制得复合菌液,其中有效活菌数为 1.35×10^9 cfu/ml。

[0054] (3) 新鲜培养基添加:按质量浓度2.0%向复合菌剂中加入新鲜培养基质-甘蔗糖蜜(含糖分50%以上,锤度Bx85%以上)。

[0055] (4) 保护剂添加:按质量浓度2.0%向步骤(3)中得到的液体中加入山梨酸钾(纯度98%以上),搅拌均匀(120rpm,1h)。

[0056] (5) 载体添加:向步骤(4)中得到的菌液中添加100目凹凸棒土(0.4g/L),搅拌均匀(120rpm,1h),即制得活性菌剂。

[0057] (6) 复合微生物生态菌肥制备:在装有禽畜粪便、沼液的化粪池中,按照2公斤/吨的用量,添加活性菌剂,同时采用移动式污水处理鼓风机(章丘信德制造有限公司生产,型号ZCSR200,功率45kw,风量30m³/min,风机风管直径25公分),每天向化粪池中供氧2h,提供微生物所需的氧气,45d后,化粪池中布满气泡,同时臭味消失,表明粪便分解处理完成。随后,通过干湿分离机(成都莘明过滤设备有限公司生产,型号XM-2,功率5.5kw),将化粪池中的粪便抽取上来,进行干湿分离,其中固体部分即为复合微生物菌肥,可按照常规有机肥施用方式运用(250公斤/亩)于农业生产中。

[0058] 本实施例制备的复合微生物菌肥试验效果研究:

[0059] 试验地点:安徽省亳州市涡阳县楚店镇麦田。

[0060] 试验作物:小麦。

[0061] 试验材料:本实施例制备的复合微生物菌肥,普通复合肥(N-P205-K20=25-13-7)。

[0062] 试验设计:设置三个处理,每个处理3个重复,小区面积为200m²。

[0063] 具体处理如下:

[0064] 处理1:施用普通复合肥,每亩40kg,后期追肥(每亩8kg尿素)。

[0065] 处理2:施用本实施例制备的复合微生物生态菌肥,每亩250kg,后期不追肥。

[0066] 对照:不施用任何肥料。

[0067] 试验方法:在小麦乳熟期采集0~20cm耕层土样测定土壤有机质、N、P、K含量及脲酶、碱性磷酸酶活性。

[0068] 试验结果:本实施例中,与对照(不施用任何肥料)相比,处理1和处理2均可以大幅提高土壤有机质,全氮量、速效磷、速效钾的含量以及脲酶和碱性磷酸酶活性,且处理2提高幅度更大。复合微生物菌肥对土壤理化性质的改善更优于普通复合肥。

[0069] 表1实施例1的复合微生物生态菌肥处理对土壤理化性质的改善

	有机质 (g/kg)	全氮量 (mg/kg)	速效磷 (mg/kg)	速效钾 (mg/kg)	脲酶 (NH ₃ -N mg/g)	碱性磷酸酶 (mg/kg)
[0070] 处理 1	38.3	1.72	113.2	84.5	0.614	5.24
处理 2	49.9	2.33	126.8	96.3	0.634	6.01
对照	27.6	1.42	84.2	76.5	0.557	2.11

[0071] 实施例2

[0072] 本实施例的复合微生物菌肥的菌株构成如下：

[0073] 枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*CZ9, 2.0×10^8 cfu/ml；

[0074] 恶臭假单胞菌*P. putidacas*8, 7.0×10^8 cfu/ml；

[0075] 侧孢芽孢杆菌*Bacillus Lateraporus*HF12, 1.5×10^8 cfu/ml；

[0076] 圆褐固氮菌*A. chroococcumcas*1, 2.5×10^8 cfu/ml；

[0077] 酵母菌*Sporobolomycesroseus*CZ3, 2.0×10^8 cfu/ml；

[0078] 乳酸链球菌*Streptococcuslactis*CZ5, 4.0×10^8 cfu/ml。

[0079] 本实施例的制备方法如下：

[0080] (1) 单株菌发酵：将枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*CZ9、侧孢芽孢杆菌*Bacillus Lateraporus*HF12, 圆褐固氮菌*A. chroococcumcas*1和恶臭假单胞菌*P. putidacas*8、酵母菌*Sporobolomycesroseus*CZ3、乳酸链球菌*Streptococcuslactis*CZ5六株菌分别单独进行发酵, 获得发酵菌液。

[0081] 枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*CZ9和侧孢芽孢杆菌*Bacillus Lateraporus*HF12采用LB培养基(葡萄糖50g, 蛋白胨10g, 酵母膏5g, 氯化钠10g, 纯水1000ml) 培养; 接种量为1.5%, 190rpm, 培养30h。

[0082] 圆褐固氮菌*A. chroococcumcas*1采用Ashby培养基(葡萄糖10g, 磷酸氢二钾0.2g, 硫酸镁0.2g, 氯化钠0.2g, 硫酸钙0.2g, 碳酸钙5g, 纯水1000ml) 培养; 接种量为1.5%, 190rpm, 培养30h。

[0083] 恶臭假单胞菌*P. putidacas*8采用LB培养基(胰蛋白胨10g, 酵母膏5g, 氯化钠10g, 纯水1000ml) 培养。接种量为1.5%, 190rpm, 培养30h。

[0084] 酵母菌*Sporobolomycesroseus*CZ3采用YPD培养基(酵母提取物10g, 蛋白胨20g, 葡萄糖20g, 纯水1000ml) 培养; 接种量为1.5%, 190rpm, 培养30h。

[0085] 乳酸链球菌*Streptococcuslactis*CZ5发酵培养基(蔗糖10g, 蛋白胨20g, 酵母膏10g, 磷酸二氢钾30g, 氯化钠2g, 硫酸镁0.2g, 纯水1000ml), 接种量为1.5%, 190rpm, 培养30h。

[0086] (2) 复合菌液制备：上述各单菌株发酵结束后, 将枯草芽孢杆菌*B. subtilis*CZ9、侧孢芽孢杆菌*B. Lateraporus*HF12、圆褐固氮菌*A. chroococcumcas*1和恶臭假单胞菌*P. putidacas*8、酵母菌*Sporobolomycesroseus*CZ3、乳酸链球菌*Streptococcuslactis*CZ5六株菌新鲜发酵菌液按照2:7:1.5:2.5:2:4的体积比混合, 制得复合菌液, 其中有效活菌数为 1.9×10^9 cfu/ml。

[0087] (3) 新鲜培养基添加：按质量浓度3.5%向复合菌剂中加入新鲜培养基质-甘蔗糖蜜(含糖分50%以上, 锤度Bx85%以上)。

[0088] (4) 保护剂添加:按质量浓度2.3‰向步骤(3)中得到的液体中加入山梨酸钾(纯度98%以上),搅拌均匀(120rpm,1.5h)。

[0089] (5) 载体添加:向步骤(4)中得到的菌液中添加100目凹凸棒土(0.6g/L),搅拌均匀(120rpm,1.5h),即制得活性菌剂。

[0090] (6) 复合微生物生态菌肥制备:在装有禽畜粪便、沼液的化粪池中,按照2公斤/吨的用量,添加活性菌剂,同时采用移动式污水处理鼓风机(章丘信德制造有限公司生产,型号ZCSR200,功率45kw,风量30m³/min,风机风管直径25公分),每天向化粪池中供氧3h,提供微生物所需的氧气。4d后,化粪池中布满气泡,同时臭味消失,表明粪便分解处理完成。随后,通过干湿分离机(成都莘明过滤设备有限公司生产,型号XM-2,功率5.5kw),将化粪池中的粪便抽取上来,进行干湿分离,其中固体部分即为复合微生物菌肥,可按照常规有机肥施用方式运用(300公斤/亩)于农业生产中。

[0091] 本实施例制备的复合微生物菌肥试验效果研究:

[0092] 试验地点:安徽省亳州市涡阳县楚店镇麦田。

[0093] 试验作物:小麦。

[0094] 试验材料:本实施例制备的复合微生物菌肥,普通复合肥(N-P205-K20=25-13-7)。

[0095] 试验设计:设置三个处理,每个处理3个重复,小区面积为200m²。

[0096] 处理1:施用普通复合肥,每亩40kg,后期追肥(每亩8kg尿素)。

[0097] 处理2:施用实施例2制备的复合微生物生态菌肥,每亩300kg,后期不追肥。

[0098] 对照:不施用任何肥料。

[0099] 试验方法:在小麦乳熟期采集0-20cm耕层土样测定土壤有机质、N、P、K含量及脲酶、碱性磷酸酶活性。

[0100] 试验结果:本实施例中,与对照(不施用任何肥料)相比,处理1和处理2均可以大幅提高土壤有机质,全氮量、速效磷、速效钾的含量以及脲酶和碱性磷酸酶活性,且处理2提高幅度更大。复合微生物菌肥对土壤理化性质的改善更优于普通复合肥。

[0101] 表2实施例2的复合微生物生态菌肥处理对土壤理化性质的改善

处理	有机质 (g/kg)	全氮量 (mg/kg)	速效磷 (mg/kg)	速效钾 (mg/kg)	脲酶 (NH ₃ -N mg/g)	碱性磷酸酶 (mg/kg)
处理1	38.3	1.72	113.2	84.5	0.614	5.24
处理2	53.1	2.47	143.1	106.4	0.644	6.14
对照	27.6	1.42	84.2	76.5	0.557	2.11

[0102] 实施例3

[0104] 本实施例的复合微生物菌肥的菌株构成如下:

[0105] 枯草芽孢杆菌*B.subtilis*CZ9,3.0×10⁸cfu/ml;

[0106] 恶臭假单胞菌*P.putidacas*8,8.0×10⁸cfu/ml;

[0107] 侧孢芽孢杆菌*BacillusLateraporus*HF12,2.0×10⁸cfu/ml;

[0108] 圆褐固氮菌*A.chroococcumcas*1,3.0×10⁸cfu/ml;

[0109] 酵母菌*Sporobolomycesroseus*CZ3,3.0×10⁸cfu/ml;

[0110] 乳酸链球菌StreptococcuslactisCZ5, 5.0×10^8 cfu/ml。

[0111] 本实施例的制备方法如下:

[0112] (1) 单菌株发酵: 将枯草芽孢杆菌Bacillus subtilisCZ9、侧孢芽孢杆菌Bacillus LateraporusHF12, 圆褐固氮菌A. chroococcumcas1和恶臭假单胞菌P. putidacas8、酵母菌SporobolomycesroseusCZ3、乳酸链球菌StreptococcuslactisCZ5六菌株分别单独进行发酵, 获得发酵菌液。

[0113] 枯草芽孢杆菌Bacillus subtilisCZ9和侧孢芽孢杆菌Bacillus LateraporusHF12采用LBG培养基(葡萄糖50g, 蛋白胨10g, 酵母膏5g, 氯化钠10g, 纯水1000ml) 培养; 接种量为2.0%, 200rpm, 培养36h。

[0114] 圆褐固氮菌A. chroococcumcas1采用Ashby培养基(葡萄糖10g, 磷酸氢二钾0.2g, 硫酸镁0.2g, 氯化钠0.2g, 硫酸钙0.2g, 碳酸钙5g, 纯水1000ml) 培养; 接种量为2.0%, 200rpm, 培养36h。

[0115] 恶臭假单胞菌P. putidacas8采用LB培养基(胰蛋白胨10g, 酵母膏5g, 氯化钠10g, 纯水1000ml) 培养; 接种量为2.0%, 200rpm, 培养36h。

[0116] 酵母菌SporobolomycesroseusCZ3采用YPD培养基(酵母提取物10g, 蛋白胨20g, 葡萄糖20g, 纯水1000ml) 培养; 接种量为2.0%, 200rpm, 培养36h。

[0117] 乳酸链球菌StreptococcuslactisCZ5发酵培养基(蔗糖10g, 蛋白胨20g, 酵母膏10g, 磷酸二氢钾30g, 氯化钠2g, 硫酸镁0.2g, 纯水1000ml) 培养; 接种量为2.0%, 200rpm, 培养36h。

[0118] (2) 复合菌液制备: 上述各单菌株发酵结束后, 将枯草芽孢杆菌Bacillus subtilisCZ9、侧孢芽孢杆菌Bacillus LateraporusHF12、圆褐固氮菌A. chroococcumcas1和恶臭假单胞菌P. putidacas8、酵母菌SporobolomycesroseusCZ3、乳酸链球菌StreptococcuslactisCZ5六菌株新鲜发酵菌液按照3:8:2:3:3:5的体积比混合, 制得复合菌液, 其中有效活菌数为 2.4×10^9 cfu/ml。

[0119] (3) 新鲜培养基添加: 按质量浓度5%向复合菌剂中加入新鲜培养基质-甘蔗糖蜜(含糖分50%以上, 锤度Bx85%以上)。

[0120] (4) 保护剂添加: 按质量浓度2.5%向步骤(3)中得到的液体中加入山梨酸钾(纯度98%以上), 搅拌均匀(120rpm, 2h)。

[0121] (5) 载体添加: 向步骤(4)中得到的菌液中添加100目凹凸棒土(1.0g/L), 搅拌均匀(120rpm, 2h), 即制得活性菌剂。

[0122] (6) 复合微生物生态菌肥制备: 在装有禽畜粪便、沼液的化粪池中, 按照2公斤/吨的用量, 添加活性菌剂, 同时采用移动式污水处理鼓风机(章丘信德制造有限公司生产, 型号ZCSR200, 功率45kw, 风量30m³/min, 风机风管直径25公分), 每天向化粪池中供氧3h, 提供微生物所需的氧气。5d后, 化粪池中布满气泡, 同时臭味消失, 表明粪便分解处理完成。随后, 通过干湿分离机(成都莘明过滤设备有限公司生产, 型号XM-2, 功率5.5kw), 将化粪池中的粪便抽取上来, 进行干湿分离, 其中固体部分即为复合微生物菌肥, 可按照常规有机肥施用方式运用(300公斤/亩)于农业生产中。

[0123] 本实施例制备的复合微生物菌肥试验效果研究:

[0124] 试验地点: 安徽省亳州市涡阳县楚店镇麦田。

[0125] 试验作物:小麦。

[0126] 试验材料:本实施例制备的复合微生物菌肥,普通复合肥(N-P205-K20=25-13-7)。

[0127] 试验设计:设置三个处理,每个处理3个重复,小区面积为200m²。

[0128] 处理1:施用普通复合肥,每亩40kg,后期追肥(每亩8kg尿素)。

[0129] 处理2:施用实施例3制备的复合微生物生态菌肥,每亩300kg,后期不追肥。

[0130] 对照:不施用任何肥料。

[0131] 试验方法:在小麦乳熟期采集0-20cm耕层土样测定土壤有机质、N、P、K含量及脲酶、碱性磷酸酶活性。

[0132] 试验结果:本实施例中,与对照(不施用任何肥料)相比,处理1和处理2均可以大幅提高土壤有机质,全氮量、速效磷、速效钾的含量以及脲酶和碱性磷酸酶活性,且处理2提高幅度更大。复合微生物菌肥对土壤理化性质的改善更优于普通复合肥。

[0133] 表3实施例3的复合微生物生态菌肥处理对土壤理化性质的改善

处理	有机质 (g/kg)	全氮量 (mg/kg)	速效磷 (mg/kg)	速效钾 (mg/kg)	脲酶 (NH ₄ -N mg/g)	碱性磷酸酶 (mg/kg)
[0134] 处理 1	38.3	1.72	113.2	84.5	0.614	5.24
处理 2	48.6	2.26	121.1	97.7	0.614	5.23
对照	27.6	1.42	84.2	76.5	0.557	2.11

[0135] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。