



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103553828 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 15

(21) 申请号 201310561591. 5

(22) 申请日 2013. 11. 12

(73) 专利权人 天津北洋百川生物技术有限公司  
地址 300457 天津市滨海新区经济技术开发区相安路 29 号

(72) 发明人 乔长晟 王凡 李雪 罗喆  
孙芳艳

(51) Int. Cl.  
C05G 3/00(2006. 01)

审查员 宋晓晖

权利要求书3页 说明书9页

(54) 发明名称

一种长保质期的液态复合生物菌肥及其制备方法与应用

(57) 摘要

一种长保质期的液态复合生物肥料及其制备方法和应用,所述液态复合生物菌肥的组成包括微生物菌体、复合营养素、菌体保护剂和添加剂;其重量份数组成为,微生物菌体 2-5,复合营养素 80-130,菌体保护剂 10-30,添加剂 0.5-3.0,其中微生物菌体是以发酵液离心后的沉淀湿重计。所述微生物菌体的组成包括:苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌,其中总活菌数达  $5 \times 10^8$ - $5 \times 10^9$  个/mL。本发明所述液态复合生物菌肥可用作生物农药,可直接应用于植物表面喷施,或施用于浸种、灌根等,具有抗虫、解磷、解钾、解有机质、抗虫害等效果且保质期长。

1. 一种液态复合生物菌肥,所述液态复合生物菌肥的组成包括微生物菌体、复合营养素、菌体保护剂和添加剂;其重量份数组成为,微生物菌体 2-5,复合营养素 80-130,菌体保护剂 10-30,添加剂 0.5-3.0,其中微生物菌体是以发酵液离心后的沉淀湿重计;

所述微生物菌体的组成包括:苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、胶质芽孢杆菌 (*Bacillus mucilaginosus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*),其中总活菌数达  $5 \times 10^8$ - $5 \times 10^9$  个/mL;所述微生物菌体中四种菌活菌数比例如下:苏云金芽孢杆菌:巨大芽孢杆菌:胶质芽孢杆菌:解淀粉芽孢杆菌 = 1-2:2-3:2-3:1-2;

所述复合营养素的重量份数组成为:磷酸二氢钾 50-150, EDTA-Ca25-30, EDTA-Mg 或 EDTA-Mg 与  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  二者混合物 50-80, EDTA-Zn 或 EDTA-Zn 与  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  或二者混合物 0.15-0.18, EDTA-Mn 或 EDTA-Mn 与  $MnSO_4 \cdot H_2O$  或二者混合物 0.3-0.5, EDTA-Fe0.1-0.3, EDTA-Cu0.06-0.08, 硼酸 0.1-0.3, 腐植酸 5-15, 大豆蛋白 20-100, 复合氨基酸 50, 海藻粉 20-100;

所述菌体保护剂为细胞固定化载体中的一种或几种;

所述添加剂为有机酸中的一种或几种;

所述液态复合生物菌肥的生产方法如下:

(1) 菌种活化及种子液制备:将苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌菌株分别进行活化并培养制得种子液;

(2) 发酵培养:将培养好的苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌的种子液分别以 8% -10% 的接种量接种至 5L 发酵罐,发酵培养基均为 3 号培养基,  $37^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ , 转速 300rpm, 通风比 1:1, 发酵 15-18h 后收集发酵液;将培养好的胶质芽孢杆菌的种子液以 8% -10% 的接种量接种至 5L 发酵罐,发酵培养基为 4 号培养基,  $37^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ , 转速 400rpm, 通风比 1:1, 发酵 15-18h 后收集发酵液;

所述 3 号培养基组成:以质量百分比计, 1.0% -1.2% 葡萄糖, 0.5% -0.6%  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0.3% -0.5%  $KH_2PO_4$ , 0.1% -0.2% 尿素, 0.4% -0.6% 酵母粉, 0.35% -0.45%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 其余为水, pH7.0-7.2;

所述 4 号培养基:以质量百分比计, 1% 蔗糖, 0.5%  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0.5% 酵母粉, 0.02%  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 0.4%  $CaCO_3$ , 0.2%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 其余为水, pH7.0;

(3) 菌体收集与固定:将步骤 (2) 收集的四种发酵液混合,  $4^\circ\text{C}$ , 3000rpm-5000rpm, 8min-10min 离心, 弃去上清, 收集菌体, 菌体用混合发酵液总体积 1/5-1/10 的无菌水重新悬浮, 加入混合发酵液 5% -15% (W/V) 的菌体保护剂, 在磁力搅拌器上进行吸附 30min-40min, 或手动搅匀, 静置 10-15min;

(4) 复合营养素与添加剂的加入:在步骤 (3) 收集并固定后得到的菌液中添加复合营养素与添加剂, 定容至离心前的混合发酵液体积;

(5) 灌装:将步骤 (4) 所得含菌体、营养素、菌体保护剂与添加剂的液态复合生物菌肥加入经紫外消毒的塑料瓶中, 贴产品标签, 即得所述液态复合生物肥料。

2. 根据权利要求 1 所述的液态复合生物菌肥, 其特征在于, 所述复合氨基酸的重量份数组成为:丙氨酸 6.0-6.5, 精氨酸 6.5-6.8, 天冬氨酸 6.8-7.2, 胱氨酸 2.2-2.5, 甘氨酸 3.2-3.5, 组氨酸 2.2-2.5, 赖氨酸 6.4-6.5, 蛋氨酸 3.0-3.2, 苯丙氨酸 5-5.5, 脯氨酸 4-4.2,

丝氨酸 8.4-8.5, 苏氨酸 4.8-5.0, 色氨酸 1.5-1.8, 酪氨酸 4.2-4.5, 缬氨酸 7.4-7.5。

3. 根据权利要求 1 所述的液态复合生物菌肥, 其特征在于, 所述菌体保护剂为硅藻土、高岭土、滑石粉中的一种或至少两种的混合物。

4. 根据权利要求 1 所述的液态复合生物菌肥, 其特征在于, 所述添加剂为苹果酸、乳酸、柠檬酸中的一种或至少两种的混合物。

5. 根据权利要求 1-4 任一所述的液态复合生物菌肥的生产方法, 包括如下步骤:

(1) 菌种活化及种子液制备

将苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌菌株分别进行活化并培养制得种子液;

(2) 发酵培养

将培养好的苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌的种子液分别以 8% -10% 的接种量接种至 5L 发酵罐, 发酵培养基均为 3 号培养基, 37°C ~ 40°C, 转速 300rpm, 通风比 1:1, 发酵 15-18h 后收集发酵液;

将培养好的胶质芽孢杆菌的种子液以 8% -10% 的接种量接种至 5L 发酵罐, 发酵培养基为 4 号培养基, 37°C ~ 40°C, 转速 400rpm, 通风比 1:1, 发酵 15-18h 后收集发酵液;

所述 3 号培养基组成: 以质量百分比计, 1.0% -1.2% 葡萄糖, 0.5% -0.6%  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0.3% -0.5%  $KH_2PO_4$ , 0.1% -0.2% 尿素, 0.4% -0.6% 酵母粉, 0.35% -0.45%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 其余为水, pH7.0-7.2;

所述 4 号培养基: 以质量百分比计, 1% 蔗糖, 0.5%  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0.5% 酵母粉, 0.02%  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 0.4%  $CaCO_3$ , 0.2%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 其余为水, pH7.0;

(3) 菌体收集与固定

将步骤 (2) 收集的四种发酵液混合, 4°C, 3000rpm-5000rpm, 8min-10min 离心, 弃去上清, 收集菌体, 菌体用混合发酵液总体积 1/5-1/10 的无菌水重新悬浮, 加入混合发酵液 5% -15% (W/V) 的菌体保护剂, 在磁力搅拌器上进行吸附 30min-40min, 或手动搅匀, 静置 10-15min;

(4) 复合营养素与添加剂的加入

在步骤 (3) 得到的菌液中添加营养素与添加剂, 定容至离心前的混合发酵液体积;

(5) 灌装

将步骤 (4) 所得含菌体、营养素、菌体保护剂与添加剂的液态复合生物菌肥加入经紫外消毒的塑料瓶中, 贴产品标签, 即得所述液态复合生物肥料。

6. 根据权利要求 5 所述的液态复合生物菌肥的生产方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

(1) 菌种活化及种子液制备

将苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌菌株分别进行活化并培养制得种子液;

(2) 发酵培养

将培养好的四菌的种子液分别以 10% 的接种量接种至各自 5L 发酵罐, 装液量 3L, 苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌, 3 号培养基, 37°C, 转速 300rpm, 通风比 1:1; 胶质芽孢杆菌, 4 号培养基, 37°C, 转速 400rpm, 通风比 1:1; 均发酵 15-18h 后收集发酵液;

3 号培养基: 以质量百分比计, 1.0% 葡萄糖, 0.6%  $K_2HPO_4$ , 0.3%  $KH_2PO_4$ , 0.15% 尿素,

0.5%酵母粉,0.4%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,其余为水, pH7.2 ;

4号培养基:以质量百分比计,1%蔗糖,0.5%  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ,0.5%酵母粉,0.02%  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ,0.4%  $CaCO_3$ ,0.25%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,其余为水, pH7.0 ;

发酵结束后,经检测,各发酵液菌浓度为:巨大芽孢杆菌  $8 \times 10^8$ 个/mL,苏云金芽孢杆菌  $1 \times 10^9$ 个/mL,解淀粉芽孢杆菌  $5 \times 10^8$ 个/mL,胶质芽孢杆菌  $6 \times 10^8$ 个/mL,各菌芽胞生成率均达95% ;

### (3) 菌体收集与固定

将步骤(2)收集的四种发酵液以体积比3:2:3:4混合,4℃,4000rpm,10min离心,弃去上清,收集菌体,菌体用总发酵液1/5(V/V)的无菌水重新悬浮,加入总发酵液10%(W/V)的硅藻土,在磁力搅拌器上进行吸附30min,静置10min ;

### (4) 复合营养素与添加剂的加入

在(3)收集并固定得到的菌液中添加复合营养素与添加剂,定容至离心前的混合发酵液体积 ;

所述复合营养素的重量份数组成为:磷酸二氢钾150,EDTA-Ca28, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ +EDTA-Mg60,EDTA-Zn+ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.16,EDTA-Mn+ $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.4,EDTA-Fe0.2,EDTA-Cu0.07,硼酸0.13,腐植酸10,大豆蛋白40,复合氨基酸50,海藻粉50 ;

其中复合氨基酸的组成为:质量份数为,丙氨酸6.1,精氨酸6.6,天冬氨酸7.0,胱氨酸2.3,甘氨酸3.5,组氨酸2.4,赖氨酸6.4,蛋氨酸3.1,苯丙氨酸5.0,脯氨酸4.2,丝氨酸8.4,苏氨酸5.0,色氨酸1.6,酪氨酸4.3,缬氨酸7.4 ;

所述添加剂为苹果酸和柠檬酸1:2体积混合 ;

### (8) 灌装

将上述混匀液体加入经紫外消毒的塑料瓶中,铝箔封口再加盖塑料盖,贴产品标签,即得所述液态复合微生物肥料 ;

所述液态复合生物菌肥的重量份数组成为,微生物菌体5,复合营养素110,菌体保护剂30,添加剂3.0,其中微生物菌体是以发酵液离心后的沉淀湿重计。

7. 权利要求1-4任一所述液态复合生物菌肥作为生物农药的用途。

## 一种长保质期的液态复合生物菌肥及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于复合微生物菌肥领域,具体涉及一种长保质期的液态复合生物肥料及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 生态文明是当代的潮流,而农业的发展又与生态环境息息相关,健康的生态环境会给农业提供强有力的支撑保证,并且会是农业发展的重要基础和保障,但由于长期以来施用化学肥料或者有机肥料,以及施肥结构的不合理导致我国面临着农业生态环境的污染和破坏、土壤理化性能下降的局面并且造成了许多严重问题。在绿色农业已成为世界农业发展方向的今天,我们应大力提倡、发展和施用微生物肥料,坚持走可持续发展的道路。

[0003] 微生物复合肥,是以有益微生物为主,配以有机、无机成分而成的一种新型绿色肥料。复合肥中微生物的生命活动,可以活化土壤中的养分,从而提高植物营养元素的供应量,通过微生物的生命活动产生植物生长刺激素,刺激植物生长,促进作物对营养元素的吸收,拮抗某些致病微生物,减轻作物病虫害,而增加产量。

[0004] 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*),可对昆虫产生特异性的杀灭作用,分别对鳞翅目、双翅目、鞘翅目、膜翅目、同翅目、直翅目、食毛目等多种昆虫具有活性。巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*),能分解难溶性磷化合物,且具有较强的亚硝酸盐降解能力。胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*),可分解长石、云母等铝硅酸盐类的原生态矿物,使土壤中难溶性 K、P、Si 等转变为可溶性供植物生长利用。还可以产生生长素、细胞分裂素等生物活性物质刺激植物生长。据报道胶质芽孢杆菌对多种作物有增产、改善品质、提高作物抗逆能力等作用。同时在纯培养中还发现硅酸盐细菌可以产生多种氨基酸、肽类化合物,以及生长素、赤霉素等生理活性物质,对棉花枯萎病、烟草灰霉病、小麦赤霉病等植物病原菌有明显抑制作用,在一定程度上可以减轻某些植物病害特别是一些土传病害的发生。解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),有机质分解能力强,代谢产物丰富,产生多种对植物病原真菌有抑制作用的物质,同时对腐败菌及病原菌的抑制力比较高,繁殖速度快,形成聚麸胺酸,构成土壤保护膜,保湿性强。

[0005] 目前市场上出售的复合微生物菌肥越来越多,但多数菌肥效果较为单一,售价高昂,且大部分液态菌肥保质期短,菌体易失活。本发明所述的液态复合生物菌肥,采用低成本的生产方式生产,选用功能菌株使产品集抗虫、解磷、解钾、解有机质从而达到作物增产的效果于一体,并且添加了功能盐类,可作为微量元素为植物提供营养,亦可使产品达到高渗透压的体系,有助于提高芽孢的得率、稳定性,改善皮层结构,并增加其热抵抗力。同时,添加了食品用防腐剂,抑制体系中菌体的生长活动,达到更长的保质期。

[0006] 海藻中所特有的海藻多糖、藻朊酸、高度不饱和脂肪酸和多种天然植物生长调节剂,具有很高的生物活性,可刺激植物体内非特异性活性因子的产生,调节内源激素平衡。海藻中含有天然植物生长调节剂如:生长素、细胞分裂素类物质和赤霉素等,具有很高的生物活性,各种物质的比例与陆生植物中各激素比例相近。海藻中的海藻酸可以降低水的表

面张力,在植物表面形成一层薄膜,增大接触面积,使水溶性物质比较容易透过茎叶表面细胞膜进入植物细胞,使植物最有效地吸收海藻提取液中的营养成分,因此如果海藻液体肥和杀虫剂、杀菌剂以及化学肥料混合使用,效果更佳,可降低喷洒费用,对农药和化学肥料具有增效作用。海藻可直接使土壤或通过植物使土壤增加有机质,激活土壤中的各种有益微生物,这些生物可在植物—微生物代谢物循环中起着催化剂的作用,使土壤的生物效力增加。植物和土壤微生物的代谢物可为植物提供更多的养分。海藻可与植物—土壤生态系统和谐地起作用。它含有的天然化合物如藻朊酸钠是天然土壤调理剂,能促进土壤团粒结构的形成,改善土壤内部孔隙空间,协调土壤中固、液、气三者比例,恢复由于土壤负担过重和化学污染而失去的天然胶质平衡,增加土壤生物活力,促进速效养分的释放,有利于根系生长,提高作物的抗逆性。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种具有抗虫、解磷、解钾、解有机质、抗虫害效果且保质期长的液态复合生物菌肥及其生产方法。

[0008] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0009] 所述液态复合生物菌肥的组成包括微生物菌体、复合营养素、菌体保护剂和添加剂;其重量份数组成为,微生物菌体 2-5,复合营养素 80-130,菌体保护剂 10-30,添加剂 0.5-3.0,其中微生物菌体是以发酵液离心后的沉淀湿重计。

[0010] 所述微生物菌体的组成包括:苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),其中总活菌数达  $5 \times 10^8$ - $5 \times 10^9$  个/mL。

[0011] 优选的,微生物菌体中四种菌活菌数比例如下:苏云金芽孢杆菌:巨大芽孢杆菌:胶质芽孢杆菌:解淀粉芽孢杆菌=1-2:2-3:2-3:1-2。

[0012] 所述复合营养素的重量份数组成为:

[0013] 磷酸二氢钾 50-150,

[0014] EDTA-Ca 25-30,

[0015] EDTA-Mg 或 EDTA-Mg 与  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  二者混合物 50-80,

[0016] EDTA-Zn 或 EDTA-Zn 与  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  或二者混合物 0.15-0.18,

[0017] EDTA-Mn 或 EDTA-Mn 与  $MnSO_4 \cdot H_2O$  或二者混合物 0.3-0.5,

[0018] EDTA-Fe 0.1-0.3,

[0019] EDTA-Cu 0.06-0.08,

[0020] 硼酸 0.1-0.3,

[0021] 腐植酸 5-15,

[0022] 大豆蛋白 20-100,

[0023] 复合氨基酸 50,

[0024] 海藻粉 20-100;

[0025] 所述复合氨基酸的重量份数组成为:丙氨酸 6.0-6.5,精氨酸 6.5-6.8,天冬氨酸 6.8-7.2,胱氨酸 2.2-2.5,甘氨酸 3.2-3.5,组氨酸 2.2-2.5,赖氨酸 6.4-6.5,蛋氨酸 3.0-3.2,苯丙氨酸 5-5.5,脯氨酸 4-4.2,丝氨酸 8.4-8.5,苏氨酸 4.8-5.0,色氨酸 1.5-1.8,

酪氨酸 4.2-4.5, 缬氨酸 7.4-7.5 ;

[0026] 所述菌体保护剂为细胞固定化载体中的一种或几种, 包括但不限于硅藻土、高岭土、滑石粉等 ;

[0027] 所述添加剂为有机酸中的一种或几种, 包括但不限于苹果酸、柠檬酸、乳酸等。

[0028] 所述液态复合生物菌肥的生产方法如下 :

[0029] (1) 菌种活化及种子液制备

[0030] 将苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌菌株分别进行活化并培养制得种子液 ;

[0031] (2) 发酵培养

[0032] 将培养好的苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌的种子液分别以 8%-10% 的接种量接种至 5L 发酵罐, 发酵培养基均为 3 号培养基, 37℃~40℃, 转速 300rpm, 通风比 1:1, 发酵 15-18h 后收集发酵液 ;

[0033] 将培养好的胶质芽孢杆菌的种子液以 8%-10% 的接种量接种至 5L 发酵罐, 发酵培养基为 4 号培养基, 37℃~40℃, 转速 400rpm, 通风比 1:1, 发酵 15-18h 后收集发酵液 ;

[0034] 所述 3 号培养基组成 : 以质量百分比计, 1.0%-1.2% 葡萄糖, 0.5%-0.6%  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0.3%-0.5%  $KH_2PO_4$ , 0.1%-0.2% 尿素, 0.4%-0.6% 酵母粉, 0.35%-0.45%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 其余为水, pH7.0-7.2 ;

[0035] 所述 4 号培养基 : 以质量百分比计, 1% 蔗糖, 0.5%  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0.5% 酵母粉, 0.02%  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 0.4%  $CaCO_3$ , 0.2%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 其余为水, pH7.0 ;

[0036] (3) 菌体收集与固定

[0037] 将步骤(2)收集的四种发酵液混合, 4℃, 3000rpm-5000rpm, 8min-10min 离心, 弃去上清, 收集菌体, 菌体用混合发酵液总体积 1/5-1/10 的无菌水重新悬浮, 加入混合发酵液 5%-15% (W/V) 的菌体保护剂, 在磁力搅拌器上进行吸附 30min-40min, 或手动搅匀, 静置 10-15min ;

[0038] (4) 复合营养素与添加剂的加入

[0039] 在步骤(3)收集并固定后得到的菌液中添加复合营养素与添加剂, 定容至离心前的混合发酵液体积。

[0040] (5) 灌装

[0041] 将步骤(4)所得含菌体、营养素、菌体保护剂与添加剂的液态复合生物菌肥加入经紫外消毒的塑料瓶中, 贴产品标签, 即得本发明所述液态复合生物肥料。

[0042] 本发明所述液态复合生物菌肥可用作生物农药, 可直接应用于植物表面喷施, 或施用于浸种、灌根等。

[0043] 施用方法 : 将本发明所述液态复合生物菌肥稀释 200-300 倍, 静置 30min, 再搅匀, 直接喷施于种植物叶面 ; 或者将本发明所述液态复合生物菌肥稀释 150-250 倍后直接用于浸种 ; 也可将本发明所述液态复合生物菌肥稀释 100-200 倍后用于灌根, 每亩地施加复合生物菌肥 200mL-400mL。

[0044] 有益效果 :

[0045] (1) 本发明采用苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌作为复合微生物肥料的生产菌株, 配以优化的生产工艺, 使得终产品中所含各功能菌活菌

数均达  $10^8$  个 /mL 以上,是普通市售产品菌浓的 10-15 倍,具有高效性;菌株可达到抗虫、解磷钾、分解有机质、调节土壤 pH 等综合功能。

[0046] (2) 本发明菌肥同时复配以有机-无机复合功能营养素,为提高土壤肥力,改善作物生长环境、改良土壤与促进植物生长起到了积极作用;复配的营养盐造成高渗体系,并添加有机酸与食品防腐剂等添加剂,安全无毒,降低体系 pH 环境,加强微生物的休眠状态,共同达到抑制菌体的生命活动、延长保质期的效果;本发明所述的液态复合生物菌肥可在室温避光的条件下保藏至少 6 个月。

[0047] (2) 本发明中菌肥复配以有机-无机复合功能营养素,添加螯合态的微量元素,起到元素间相互协调、依赖和制约的作用。由于加入的螯合盐结构的特殊性,使复配离子内电荷趋于中性,在土壤中避免了阳离子交换而可以快速到达作物根系表面,更容易被根系吸收,喷施在叶面上具有较好的流动性,容易被气孔吸收,在无需光合作用的情况下可直接参与机体的蛋白合成,其肥效大于单独添加无机盐或等量的无机氮肥。据报道,螯合态微肥的肥效是无机微肥的 2~5 倍。

[0048] (3) 本发明菌肥添加有机酸,安全无毒,降低体系 pH 环境,加强微生物的休眠状态,共同达到抑制菌体的生命活动、延长保质期的效果;本发明所述的液态复合生物菌肥可在室温避光的条件下保藏至少 6 个月。

[0049] (4) 本发明采用廉价的原料作为菌体液态发酵的培养基,采用高效的发酵方法,降低了生产成本,提供了一种高效廉价的制备生物菌肥的方法;本发明优化的培养基具有快速生孢作用,使菌体在培养 12-15h 就可达到 90% 的芽孢生成率。

[0050] (4) 本发明所提供的复合生物菌肥,在吊兰、小白菜、香菜等植物的种植实验中发现,施肥组在叶长、根长、株高、鲜重、产量等方面均明显优于空白对照组,同时可抗虫害,调节碱性土壤的 pH;

[0051] (5) 本发明菌肥所含四种生产菌株均为芽孢类细菌,生长繁殖能力旺盛,对环境的适应性强,易于在土壤内定殖,本发明采用的发酵工艺及培养基使微生物发酵达终点时芽孢形成率均达 90%-95%。

[0052] (6) 本发明添加了菌体保护剂如硅藻土、高岭土等,使菌体在储存期间在该物质中处于休眠状态,保护细胞更好地耐受菌肥体系的高渗透压。待其被使用时,菌体保护剂可以很快被溶解,使菌体快速溶出恢复活力,不像白云石或碳酸钙等结构致密物质需要较长时间才能使菌体脱离溶出。

[0053] (7) 本发明所添加的海藻粉中含有吲哚乙酸、植物生长激动素、海藻酚等有机物质,配合功能菌与营养素后用于种植业中可以起到更优的抗旱、抗盐碱渗透、耐寒、杀菌和促生长作用。

### 具体实施方式

[0054] 下面通过具体的实施方案叙述本发明。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物料成分和用量进行的各种改变或改动也属于本发明的保护范围。



[0055] 实施例 1

[0056] (1) 培养基的配制

[0057] 1 号培养基：以质量百分比计，0.8%-1.2% 蛋白胨，0.5%-1% 酵母粉，0.3%-1.0%NaCl，其余为水，pH7.2-7.4。

[0058] 2 号培养基：以质量百分比计，1%-2% 甘露醇或蔗糖，0.1%-0.12%  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，0.18%-0.25%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ，0.5%-0.6%  $\text{CaCO}_3$ ，0.15%-0.2%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，0.2%-0.25% NaCl，1.4%-2% 琼脂，其余为水。

[0059] 3 号培养基：以质量百分比计，1.0%-1.2% 葡萄糖，0.5%-0.6%  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ，0.3%-0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，0.1%-0.2% 尿素，0.4%-0.6% 酵母粉，0.35%-0.45%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，其余为水，pH7.0-7.2。

[0060] 4 号培养基：以质量百分比计，1% 蔗糖，0.5%  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ，0.5% 酵母粉，0.02%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，0.4%  $\text{CaCO}_3$ ，0.2%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，其余为水，pH7.0。

[0061] (2) 斜面活化

[0062] 将苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌接种于 1 号平板培养基活化培养，将胶质芽孢杆菌划线接种于 2 号培养基活化培养。

[0063] (3) 种子液制备

[0064] 挑取苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌活化的菌落，分别接种于 3 号培养基，制备种子液；挑取胶质芽孢杆菌活化的菌落，接种于 4 号培养基，制备种子液。

[0065] (4) 发酵培养

[0066] 将培养好的四菌的种子液分别以 10% 的接种量接种至各自 5L 发酵罐，装液量 3L。苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌，3 号培养基，40℃，转速 300rpm，通风比 1:1；胶质芽孢杆菌，4 号培养基，40℃，转速 400rpm，通风比 1:1；均发酵 15-18h 后收集发酵液。

[0067] 发酵结束后，经检测，各发酵液菌浓度均达到  $10^8$  个 /mL 以上。

[0068] (5) 将步骤(4) 收集的四种发酵液混合，4℃，5000rpm，8min 离心，弃去上清，收集菌体，菌体用总发酵液 1/10 (V/V) 的无菌水重新悬浮，加入总发酵液 5% (W/V) 的滑石粉，在磁力搅拌器上进行吸附 40min，静置 15min；

[0069] (6) 复合营养素与添加剂的加入

[0070] 在(5) 收集并固定得到的菌液中添加复合营养素与添加剂，定容至离心前的混合发酵液体积。

[0071] 复合营养素的重量份数组成为：磷酸二氢钾 100，EDTA-Ca25，EDTA-Mg80，EDTA-Zn0.18，EDTA-Mn0.3，EDTA-Fe0.1，EDTA-Cu0.08，硼酸 0.3，腐植酸 15，大豆蛋白 100，复合氨基酸 50，海藻粉 20。

[0072] 复合氨基酸的重量份数组成为：丙氨酸 6.5，精氨酸 6.8，天冬氨酸 6.8，胱氨酸 2.5，甘氨酸 3.2，组氨酸 2.2，赖氨酸 6.5，蛋氨酸 3.2，苯丙氨酸 5.5，脯氨酸 4，丝氨酸 8.5，苏氨酸 4.8，色氨酸 1.8，酪氨酸 4.5，缬氨酸 7.5。

[0073] 所述添加剂为苹果酸。

[0074] (8) 灌装

[0075] 将上述混匀液体加入经紫外消毒的塑料瓶中，铝箔封口再加盖塑料盖，贴产品标

签,即得本发明所述液态复合微生物肥料。

[0076] 本实施例所述液态复合生物菌肥的组成包括;重量份数组成为,微生物菌体 2,复合营养素 80,菌体保护剂 20,添加剂 0.5,其中微生物菌体是以发酵液离心后的沉淀湿重计。

[0077] 实施例 2

[0078] (1) 培养基的配制

[0079] 1 号培养基:以质量百分比计,1% 蛋白胨,0.5% 酵母粉,0.3%NaCl,其余为水,pH7.2;

[0080] 2 号培养基:以质量百分比计,1% 甘露醇,0.1%  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,0.2%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,0.5% $\text{CaCO}_3$ ,0.2%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,0.2% NaCl,1.4% 琼脂,其余为水;

[0081] 3 号培养基:以质量百分比计,1.0% 葡萄糖,0.6% $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,0.3% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.15% 尿素,0.5% 酵母粉,0.4%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,其余为水,pH7.2

[0082] 4 号培养基:以质量百分比计,1% 蔗糖,0.5% $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,0.5% 酵母粉,0.02%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,0.4%  $\text{CaCO}_3$ ,0.25%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,其余为水,pH7.0,

[0083] (2) 斜面活化

[0084] 将 4℃ 保存的各菌菌株活化,后将苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌分别划线接种于 1 号平板培养基上,30℃ -37℃ 培养 1d;将胶质芽孢杆菌划线接种于 2 号培养基,25℃ -30℃ 培养 1-2d。

[0085] (3) 种子液制备

[0086] 挑取苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌活化的菌落,分别接种于 3 号培养基,37℃,200rpm,培养 16h;

[0087] 挑取胶质芽孢杆菌活化的菌落,接种于 4 号培养基,37℃,200rpm,培养 16h;此时四菌的菌浓菌均达  $10^8$  个/mL。

[0088] (4) 发酵培养

[0089] 将培养好的四菌的种子液分别以 10% 的接种量接种至各自 5L 发酵罐,装液量 3L。苏云金芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌,3 号培养基,37℃,转速 300rpm,通风比 1:1;胶质芽孢杆菌,4 号培养基,37℃,转速 400rpm,通风比 1:1;均发酵 15-18h 后收集发酵液。

[0090] 发酵结束后,经检测,各发酵液菌浓度为:巨大芽孢杆菌  $8 \times 10^8$  个/mL,苏云金芽孢杆菌  $1 \times 10^9$  个/mL,解淀粉芽孢杆菌  $5 \times 10^8$  个/mL,胶质芽孢杆菌  $6 \times 10^8$  个/mL,各菌芽胞生成率均达 95%。

[0091] (5) 菌体收集与固定

[0092] 将步骤(3)收集的四种发酵液以体积比 3:2:3:4 混合,4℃,4000rpm,10min 离心,弃去上清,收集菌体,菌体用总发酵液 1/5 (V/V)的无菌水重新悬浮,加入总发酵液 10% (W/V)的硅藻土,在磁力搅拌器上进行吸附 30min,静置 10min;

[0093] (6) 复合营养素与添加剂的加入

[0094] 在(5)收集并固定得到的菌液中添加复合营养素与添加剂,定容至离心前的混合发酵液体积。

[0095] 所述复合营养素的重量份数组成为:磷酸二氢钾 150,EDTA-Ca28, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ +EDT

A-Mg60, EDTA-Zn+ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. 16, EDTA-Mn+MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O. 4, EDTA-Fe0. 2, EDTA-Cu0. 07, 硼酸 0. 13, 腐植酸 10, 大豆蛋白 40, 复合氨基酸 50, 海藻粉 50。

[0096] 其中复合氨基酸的组成为:质量份数为, 丙氨酸 6. 1, 精氨酸 6. 6, 天冬氨酸 7. 0, 胱氨酸 2. 3, 甘氨酸 3. 5, 组氨酸 2. 4, 赖氨酸 6. 4, 蛋氨酸 3. 1, 苯丙氨酸 5. 0, 脯氨酸 4. 2, 丝氨酸 8. 4, 苏氨酸 5. 0, 色氨酸 1. 6, 酪氨酸 4. 3, 缬氨酸 7. 4。

[0097] 所述添加剂为苹果酸和柠檬酸 1:2 体积混合。

[0098] (8) 灌装

[0099] 将上述混匀液体加入经紫外消毒的塑料瓶中, 铝箔封口再加盖塑料盖, 贴产品标签, 即得本发明所述液态复合微生物肥料。

[0100] 本实施例所述液态复合生物菌肥的组成包括;重量份数组成为, 微生物菌体 5, 复合营养素 110, 菌体保护剂 30, 添加剂 3. 0, 其中微生物菌体是以发酵液离心后的沉淀湿重计。

[0101] 本发明所述液态复合生物菌肥总活菌数为  $6.9 \times 10^8$  个 /mL, pH4. 0, 离子强度 80ms/cm。

[0102] 将制备所得的液态复合生物菌肥于不高于 30℃ 的室温静置、避光保藏, 定期测定产品总活菌数, 产品总活菌数在 3 个月之内未有明显下降, 6 个月内未大幅下降, 保藏至 12 个月时, 依旧复合国家标准所要求的不低于  $0.5 \times 10^8$  个 /mL。

[0103] 表 1 液态复合生物菌肥不同贮藏时间的总活菌数

[0104]

时间(月)	1	2	3	6	12
总活菌数(个/mL)	$6.9 \times 10^8$	$7.0 \times 10^8$	$6.7 \times 10^8$	$6.2 \times 10^8$	$4.4 \times 10^8$

[0105] 上述菌种购买自:苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*):广东省微生物菌种保藏中心(广州市先烈中路 100 号省微生物所实验楼五楼, 邮编 510070), 编号 GIM1. 151; 巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megatherium*):中国普通微生物菌种保藏管理中心(北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 邮编 100101), 编号 CGMCC1. 223; 解淀粉芽孢杆菌:中国工业微生物菌种保藏管理中心(北京市朝阳区酒仙桥中路 24 号院 6 号楼, 邮编 100015), 编号 CICC23845; 胶质芽孢杆菌 (*Bacillus mucilaginosu*):中国工业微生物菌种保藏管理中心, 编号 CICC23575。

[0106] 实施例 3

[0107] 按照实施例 2 中(1)-(4)所述方法制备实施例 2 中所述四种菌的发酵液, 将收集的四种发酵液等体积混合, 4℃, 3000rpm, 8min 离心, 弃去上清, 收集菌体, 菌体用总发酵液 1/8 (V/V) 的无菌水重新悬浮, 加入总发酵液 15% (m/V) 的高岭土, 在磁力搅拌器上进行吸附 30min, 静置 10min; 加入复合营养素与添加剂, 定容至离心前的混合发酵液体积。按实施例 1 中(8)所述方法灌装保藏, 同时, 以未添加菌体保护剂与添加剂的产品为对照。定期测定其总活菌数。

[0108] 所述复合营养素的重量份数组成为:磷酸二氢钾 50, EDTA-Ca30, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O+EDTA-Mg50, EDTA-Zn0. 15, EDTA-Mn+MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O. 5, EDTA-Fe0. 3, EDTA-Cu0. 06, 硼酸 0. 2, 腐植酸 5, 大豆蛋白 20, 复合氨基酸 50, 海藻粉 100。

[0109] 其中复合氨基酸组成同实施例 2。

[0110] 所述添加剂组成为乳酸和柠檬酸 1:1 体积混合。

[0111] 本实施例所述液态复合生物菌肥的组成包括；重量份数组成为，微生物菌体 3，复合营养素 130，菌体保护剂 20，添加剂 1.5，其中微生物菌体是以发酵液离心后的沉淀湿重计。

[0112] 表 2 液态菌肥在不同时期的总活菌数(个/mL)

[0113]

时间(月)	1	2	3	6
本发明	$7.5 \times 10^8$	$7.2 \times 10^8$	$6.0 \times 10^8$	$5.7 \times 10^8$
对照	$5 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$1.8 \times 10^7$	$0.9 \times 10^7$

[0114] 本发明添加了菌体保护剂与添加剂后，在 6 个月内保持菌数没有大幅减少，且菌体活力强，符合国标 NY/T798—2004 要求的 3 个月内总活菌数不低于 0.5 亿/mL。

[0115] 实施例 4

[0116] 按照实施例 2 所述方法制备液态复合生物菌肥，将此菌肥稀释 200 倍，取稀释后的肥液 200mL 施入装有 300g 土壤、装于 12×10cm 的花盆(盆底打孔)中，待肥液浸透土壤后，将长势相当的吊兰植株幼体(无根，4 片叶，叶长 6cm，平均株高 6cm，鲜重 1g)插于土中培养，每日浇水，每 7d 追肥一次，同时设置空白对照组，当实验组施肥时对照组施加等量自来水。定期观察两组植株长势，测定土壤 pH，45d 时观察植株，测量株高、叶长、根长、鲜重等参数，均比空白对照显示出明显优势：施肥植株的根系发达，叶长有明显增长，新生叶片也多于空白对照，鲜重增率达 400%。同时，施肥后的土质疏松，土壤 pH 比未施肥的土壤 pH 有明显降低，这是由于菌体在生长过程中分泌了酸类物质至土壤中，这对中国北方的盐碱性土壤的 pH 具有很好的调节作用。

[0117] 表 3 吊兰种植 45d 时的植株参数

[0118]

	空白	施肥
根数	1	4
根长(mm)	10	81、65、60、55
平均根长(mm)	10	65.25
叶片数	4	6
叶长(mm)	95 105 55 10	53、25、135、72、230、280
平均叶长(mm)	66.25	132.5
鲜重(g)	1.27	5.51
株高(cm)	8	11

[0119] 表 4 施肥土壤 pH 与未施肥土壤 pH 比较

	对照	施肥
[0120] 土壤 pH (1d)	8.63	8.63
土壤 pH (8d)	8.51	8.00
土壤 pH (20d)	8.72	7.86

[0121] 实施例 4

[0122] 按照实施例 2 所述方法制备液态复合生物菌肥,将产品稀释 250 倍,喷施于白菜、小白菜、甘蓝、青花菜的叶片表面,每隔 7 天喷施一次,可明显降低鳞翅目害虫危害,如小菜蛾。

[0123] 实施例 5

[0124] 按照实施例 3 所述方法制备液态复合生物菌肥,将产品施于番茄、辣椒、茄子、黄瓜等作物,稀释 150 倍灌根,每亩原肥液 200mL,此后每隔 7d 追施一次,稀释 250 倍,种植周期结束后,各作物产量均可提高 30% 以上。