



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105218213 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 06

(21) 申请号 201510508992. 3

(22) 申请日 2015. 08. 18

(71) 申请人 大连理工大学

地址 116024 辽宁省大连市高新园区凌工路
2号

(72) 发明人 徐永平 王佳宁 续彦龙 龚改林
王丽丽 李晓宇

(74) 专利代理机构 大连格智知识产权代理有限
公司 21238

代理人 刘晓琴

(51) Int. Cl.

C05G 3/00(2006. 01)

C05G 3/04(2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页

(54) 发明名称

具有防控土传植物病害功能的生物有机肥及其制备方法

(57) 摘要

具有防控土传植物病害功能的生物有机肥的制备方法,包括堆肥发酵的步骤,所述堆肥原料中接种地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、热球状尿素芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌四种拮抗菌的混合菌液;堆肥发酵结束后,向发酵产物中添加聚 γ 谷氨酸。本发明所制备得到的生物有机肥对植物土传真菌疾病具有显著的防控效果。本发明产品的生产工艺简单,原料来源广泛,生产成本低,适合大规模生产具有防控土传植物病害功能的生物有机肥。

1. 具有防控土传植物病害功能的生物有机肥的制备方法,包括堆肥发酵的步骤,其特征在于,堆肥原料中接种地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、热球状尿素芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌四种拮抗菌的混合菌液;堆肥发酵结束后,向堆肥发酵产物中添加聚 γ 谷氨酸。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的混合菌液通过以下方法制备:以预培养基分别活化培养四种拮抗菌,获得菌体浓度均为 $10^8 \sim 10^9 \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的预培养物;然后按等体积比例混合所得的四种拮抗菌的预培养物;

所述的预培养基以蒸馏水配制,含氯化钠 $10.0 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、胰蛋白胨 $10.0 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和酵母粉 $5.0 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,经 121°C 灭菌 20 分钟所得。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述的堆肥原料中混合菌液的接种比例为 $0.01 \sim 0.05 \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

4. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,还包括向堆肥发酵产物中按照 $0.08 \sim 0.12 \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的比例添加混合菌液的步骤。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的聚 γ 谷氨酸预配为 $200 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的聚 γ 谷氨酸溶液,添加量为 $0.03 \sim 0.05 \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的堆肥原料是动物粪便与植物残体按质量比 $3 \sim 4.5:1 \sim 1.5$ 的混合物,含水率为 $55 \sim 65\%$ 。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,包括如下步骤:

(1) 制备堆肥原料:将动物粪便与植物残体粉碎后,按质量比 $3 \sim 4.5:1 \sim 1.5$ 的混合,控制混合物含水率为 $55 \sim 65\%$,得堆肥原料;

(2) 制备混合菌液:以预培养基对地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、热球状尿素芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌进行活化培养,分别获得菌体浓度均为 $10^8 \sim 10^9 \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的预培养物;然后按等体积比例混合所得的四种拮抗菌的预培养物;

所述的预培养基以蒸馏水配制,含氯化钠 $10.0 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、胰蛋白胨 $10.0 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和酵母粉 $5.0 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,经 121°C 灭菌 20 分钟所得;

(3) 堆肥发酵:在堆肥容器中分层放置步骤 (1) 制备的堆肥原料,并均匀泼洒步骤 (2) 制备的混合菌液,充分混合后进行好氧发酵;随发酵进行,堆体温度上升,当堆体温度达到 45°C 时即进入高温期,每五天翻堆一次并补充水分;堆体温度达到 60°C 以上并维持 5-7 天;随后温度开始缓慢下降,当堆料温度接近室温时结束发酵;

(4) 向步骤 (3) 所得的堆肥发酵产物中按照 $0.03 \sim 0.05 \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的比例加入浓度为 $200 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的聚 γ 谷氨酸水溶液,并按照 $0.1 \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的比例加入步骤 (2) 制备的混合菌液,充分混匀后阴干至含水量为 $15 \sim 30\%$,得具有防控土传植物病害功能的生物有机肥。

8. 权利要求 1 ~ 7 任一权利要求所述的方法制备的具有防控土传植物病害功能的生物有机肥。

9. 防控土传植物病害的方法,其特征在于是使用权利要求 8 所述的具有防控土传植物病害功能的生物有机肥。

具有防控土传植物病害功能的生物有机肥及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种具有防控土传植物病害功能的生物有机肥及其制备方法,属于农业生物技术领域。

背景技术

[0002] 随着我国养殖业与种植业分离,没有足够的农田来消纳规模化、集约化养殖业所产生大量的养殖业废弃物,对生态环境造成严重影响。而农田的化学肥料施用量逐年递增,对作物产量的贡献瓶颈日益凸显。

[0003] 我国农业生产施肥特点为偏施化肥,化学肥料的大量长期施用使得农作物品质降低,引起土壤板结、有机质下降、土壤及作物根系微生态结构被破坏,更是导致了土传植物病害泛滥的。常见的土传植物病害有小麦和水稻的纹枯病、玉米的丝黑穗病和大豆疫病以及瓜豆的枯萎病和灰霉病等。当前的病害防控主要依靠化学防控,但是长期施用化学药剂亦会造成药剂残留和环境污染等问题;在农业常规管理中,植物病菌可在土壤中存在数年之久,病害爆发时轮作手段大受局限,嫁接等方式更是大大提高了防控成本。因此,结合抗病品种的选育及具备拮抗功能的有益菌的生物防控等防控方法将是未来土传植物病害的防控趋势。

[0004] 生物有机肥的使用能够改良土壤、提高作物品质并能通过增强作物抗病性、利用微生物多样性抑制病原菌等防控控制土传植物病害,而且可以为拮抗菌提供营养,通过拮抗菌自身及其代谢产物对病原菌的抑制达到很好的防治效果。其中,许多芽孢杆菌产生的枯草菌素、多粘菌素、制霉菌素、短杆菌肽等活性物质对多种致病菌有明显的抑制作用。生物有机肥与拮抗菌的综合利用是植物病害防控的可持续手段。

发明内容

[0005] 本发明的目的之一,首先在于提供一种具有防控土传植物病害功能的生物有机肥的制备方法。所述方法包括堆肥发酵的步骤,堆肥原料中接种地衣芽孢杆菌 (ABTNL-1, *Bacillus lincheniformis*)、枯草芽孢杆菌 (ABTNL-2, *Bacillus subtilis*)、热球状尿素芽孢杆菌 (ABTNL-3, *Ureibacillus thermosphaericus*) 和苏云金芽孢杆菌 (ABTNL-4, *Bacillus thuringiensis*) 四种拮抗菌的混合菌液;堆肥发酵结束后,向堆肥发酵产物中添加聚 γ 谷氨酸。

[0006] 本发明的另一目的,在于提供由上述本发明的方法所制备的具有防控土传植物病害功能的生物有机肥。通过本发明的上述方法所制备的有机肥其有效活菌数 $>5 \times 10^8 \text{CFU g}^{-1}$,有机质含量 $>45\%$,含水率为 $15 \sim 30\%$ 。

[0007] 再一方面,本发明旨在提供一种防控土传植物病害的方法,所述方法是使用上文所述的本发明的具有防控土传植物病害功能的生物有机肥。

[0008] 本发明所述的生物有机肥的制备方法选配四种拮抗菌参与堆肥发酵过程,这些菌能够对土传植物病原菌有竞争营养拮抗作用、并且在发酵过程中能产生多种对土传植物病

原菌有明显的抑制作用的代谢产物,所制备的生物有机肥对小麦纹枯病、甜瓜灰霉病、玉米丝黑穗病、大豆疫病、黄瓜枯萎病等多种土传植物病原菌有明显的抑制作用,可用于防控植物病害,减少农药施用,促进生物原料的可持续利用。同时,本发明所制备的生物有机肥可提高土壤肥力,有利于土壤形成团粒结构从而改良土壤性状,促进植物种子萌发及生长,增强植物抗逆能力,改善产品品质,使产品达到绿色或有机标准。

具体实施方式

[0009] 如无特殊说明,本发明中所涉及的生物材料样品包括:

[0010] ABTNL-1:地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*), CGMCC NO. 10037。

[0011] ABTNL-2:枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), CGMCC NO. 10038。

[0012] ABTNL-3:热球状尿素芽孢杆菌 (*Ureibacillus thermosphaericus*), CGMCC NO. 10039。

[0013] ABTNL-4:苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*), CGMCC NO. 10036。

[0014] 本发明首先提供一种具有防控土传植物病害功能的生物有机肥的制备方法。所述方法包括堆肥发酵的步骤,堆肥原料中接种四种拮抗菌的混合菌液;堆肥发酵结束后,向堆肥发酵产物中添加聚 γ 谷氨酸。

[0015] 所述的四种拮抗菌分别是:地衣芽孢杆菌 (ABTNL-1, *Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌 (ABTNL-2, *Bacillus subtilis*)、热球状尿素芽孢杆菌 (ABTNL-3, *Ureibacillus thermosphaericus*) 和苏云金芽孢杆菌 (ABTNL-4, *Bacillus thuringiensis*)。

[0016] 具体实施方式中,所述的混合菌液通过以下方法制备:以预培养基分别活化培养四种拮抗菌,获得菌体浓度均为 $10^8 \sim 10^9 \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的预培养物;然后按等体积比例混合所得的四种拮抗菌的预培养物;所述的预培养基以蒸馏水配制,含氯化钠 $10.0 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、胰蛋白酶 $10.0 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和酵母粉 $5.0 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 经 121°C 灭菌 20 分钟所得。

[0017] 上述生物有机肥的制备方法中,所述堆肥原料中混合菌液的接种比例为 $0.01 \sim 0.05 \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ (每公斤堆肥原料中所接种的混合菌液的体积)。其中,尤其优选 $0.03 \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

[0018] 优选的具体实施方式中,所述的生物有机肥的制备方法中还包括向堆肥发酵产物中按照 $0.08 \sim 0.12 \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的比例添加混合菌液的步骤。

[0019] 上述生物有机肥的制备方法中,所述的聚 γ 谷氨酸优选以蒸馏水预配为 $200 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的聚 γ 谷氨酸溶液,添加量为 $0.03 \sim 0.05 \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ (每公斤发酵产物中所添加的聚 γ 谷氨酸-蒸馏水溶液的体积)。

[0020] 另一具体实施方式中,本发明优选堆肥原料是动物粪便与植物残体按质量比 $3 \sim 4.5:1 \sim 1.5$ 的混合物,含水率为 $55 \sim 65\%$ 。尤为优选地,所述动物粪便选自猪粪、鸡粪、牛粪或其混合物,含水率为 $70 \sim 80\%$ (质量比率);植物残体选自枯草、树枝、秸秆或其混合物,含水率为 $5 \sim 10\%$ (质量比率)。

[0021] 再一具体的实施方式中,所述的堆肥发酵的条件控制包括:

[0022] 在堆肥容器中分层放置堆肥原料,并均匀泼洒混合菌液后充分混合后进行好氧发酵;随发酵进行,堆体温度上升,当堆体温度达到 45°C 时即进入高温期,每五天翻堆一次并补充水分;堆体温度达到 60°C 以上并维持 5-7 天;随后温度开始缓慢下降,当堆料温度接近

室温时结束发酵。

[0023] 更为具体的实施方式中,本发明所述的生物有机肥的制备方法包括如下步骤:

[0024] (1) 制备堆肥原料:将动物粪便与植物残体粉碎后,按质量比 3 ~ 4.5:1 ~ 1.5 的混合,控制混合物含水率为 55 ~ 65%,得堆肥原料;

[0025] 其中动物粪便优选含水率为 70 ~ 80%的猪粪、鸡粪、牛粪或其混合物;植物残体优选含水率为 5 ~ 10%的枯草、树枝、秸秆或其混合物;两类原料粉碎后优选过 1 目网筛。

[0026] (2) 制备混合菌液:以预培养基对地衣芽孢杆菌 (ABTNL-1, *Bacillus lincheniformis*)、枯草芽孢杆菌 (ABTNL-2, *Bacillus subtilis*)、热球状尿素芽孢杆菌 (ABTNL-3, *Ureibacillus thermosphaericus*) 和苏云金芽孢杆菌 (ABTNL-4, *Bacillus thuringiensis*) 进行活化培养,分别获得菌体浓度均为 $10^8 \sim 10^9$ CFU · ml⁻¹ 的预培养物;然后按等体积比例混合所得的四种拮抗菌的预培养物;

[0027] 所述的预培养基以蒸馏水配制,含氯化钠 10.0g · L⁻¹、胰蛋白胨 10.0g · L⁻¹和酵母粉 5.0g · L⁻¹,经 121℃ 灭菌 20 分钟所得;

[0028] (3) 堆肥发酵:在堆肥容器中分层放置步骤 (1) 制备的堆肥原料,并均匀泼洒步骤 (2) 制备的混合菌液,充分混合后进行好氧发酵;发酵开始,每天早晚测一次温度,堆体温度随时间推移而上升,当堆体温度达到 45℃ 时即进入高温期,堆体每五天翻一次堆并补充水分。温度达到 60℃ 以上并维持 5-7 天,随后温度开始缓慢下降。当堆料温度接近室温时停止翻堆,得到腐熟的堆肥发酵产物;

[0029] (4) 向步骤 (3) 所得的堆肥发酵产物中按照 0.03 ~ 0.05L · kg⁻¹ 的比例加入浓度为 200mg · L⁻¹ 的聚 γ 谷氨酸水溶液,充分混匀后阴干至含水量为 15 ~ 30%,得具有防控土传植物病害功能的生物有机肥。

[0030] 本发明另一方面提供防控土传植物病害的方法,该方法是使用上述任一方法所制备的具有防控土传植物病害功能的生物有机肥。

[0031] 上述防控土传植物病害的方法的优选实施方式中,所述的生物有机肥施用量为 8 ~ 12t · hm²。

[0032] 另一方面,作为优选的,上述的土传植物病害尤其是真菌性病原菌所引起的病害。更为优选的是针对小麦纹枯病真菌、玉米丝黑穗病菌、大豆疫病菌、黄瓜枯萎病菌等真菌性病原菌所引起的病害。

[0033] 本发明进一步提供如下实施例,对本发明的生物有机肥料、其制备方法和应用做进一步说明。

[0034] 实施例 1

[0035] 制备具有防控土传植物病害功能的生物有机肥 I,包括如下步骤:

[0036] 1、堆料的准备

[0037] 将猪粪、鸡粪或牛粪等动物粪便与枯草、树枝或秸秆等植物残体粉碎后,过 1 目网筛,然后按动物粪便:植物残体质量比 4:1 混合,调整堆肥原料含水率为 60%,保存备用。所选用的动物粪便和植物残体含水量分别是 75%和 5% (质量百分比)。

[0038] 2、混合菌液与聚 γ 谷氨酸溶液的制备:

[0039] 用液体培养基分别培养拮抗菌地衣芽孢杆菌 ABTNL-1、枯草芽孢杆菌 ABTNL-2、热球状尿素芽孢杆菌 ABTNL-3 和苏云金芽孢杆菌 ABTNL-4,培养至每种拮抗菌液中菌体浓度

均为 $10^8 \sim 10^9 \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$, 四种培养物等体积比例混合, 制得混合菌液; 其中液体培养基配为氯化钠 10.0g、胰蛋白胨 10.0g、酵母粉 5.0g 溶解于 1L 蒸馏水中, 经 121°C , 20 分钟灭菌后使用。

[0040] 另以蒸馏水为溶剂制备浓度为 $200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的聚 γ 谷氨酸溶液。

[0041] 3、堆肥的建立与条件控制

[0042] 在堆肥容器中分层放置物料, 将步骤 2 中制备的混合菌液以 $0.03\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的比例添加到堆肥原料中并充分混合, 然后进行微生物好氧发酵。每天早晚测一次温度, 堆体温度随时间推移而上升, 当堆体温度达到 45°C 时即进入高温期, 堆体每五天翻一次堆并补充水分。温度达到 60°C 以上并维持 5-7 天, 随后温度开始缓慢下降。当堆料温度接近室温时停止翻堆。此时得到的堆肥无异味、不招引蚊虫。其种子发芽率 $>80\%$ 、虫卵含量为 0% 时, 将堆肥物保存备用。

[0043] 4、具有防控土传植物病害功能的生物有机肥的制备

[0044] 向步骤 3 所得堆肥发酵物中按照 $0.04\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的比例添加步骤 2 制备的聚 γ 谷氨酸溶液, 充分混匀后阴干至含水量为 30% , 且有效活菌数 $>5 \times 10^8 \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$, 有机质含量 $>45\%$ 。将产品粉碎后过筛, 制成粉料, 可根据商业需要进行造粒, 制得具有防控土传植物病害功能的生物有机肥 I。

[0045] 实施例 2

[0046] 制备具有防控土传植物病害功能的生物有机肥 II, 包括如下步骤:

[0047] 1、堆料的准备

[0048] 同实施例 1 步骤 1。

[0049] 2、混合菌液与聚 γ 谷氨酸溶液的制备:

[0050] 用液体培养基分别培养拮抗菌地衣芽孢杆菌 ABTNL-1、枯草芽孢杆菌 ABTNL-2、热球状尿素芽孢杆菌 ABTNL-3 和苏云金芽孢杆菌 ABTNL-4, 培养至每种拮抗菌液中菌体浓度均为 $10^8 \sim 10^9 \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$, 四种培养物等体积比例混合, 制得混合菌液; 其中液体培养基配为氯化钠 10.0g、胰蛋白胨 10.0g、酵母粉 5.0g 溶解于 1L 蒸馏水中, 经 121°C , 20 分钟灭菌后使用。

[0051] 另以蒸馏水为溶剂制备浓度为 $200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的聚 γ 谷氨酸溶液。

[0052] 3、堆肥的建立与条件控制

[0053] 在堆肥容器中分层放置物料, 将步骤 2 中制备的混合菌液以 $0.03\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的比例添加到堆肥原料中并充分混合, 然后进行微生物好氧发酵。每天早晚测一次温度, 堆体温度随时间推移而上升, 当堆体温度达到 45°C 时即进入高温期, 堆体每五天翻一次堆并补充水分。温度达到 60°C 以上并维持 5-7 天, 随后温度开始缓慢下降。当堆料温度接近室温时停止翻堆。此时得到的堆肥无异味、不招引蚊虫。其种子发芽率 $>80\%$ 、虫卵含量为 0% 时, 将堆肥发酵产物保存备用。

[0054] 4、具有防控土传植物病害功能的生物有机肥的制备

[0055] 向步骤 3 所得堆肥发酵产物中按照 $0.04\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的比例添加步骤 2 制备的聚 γ 谷氨酸溶液, 并按照 $0.1\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的比例加入步骤 2 制备的混合菌液, 充分混匀后阴干至含水量为 30% , 且有效活菌数 $>5 \times 10^8 \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$, 有机质含量 $>45\%$ 。将产品粉碎后过筛, 制成粉料, 可根据商业需要进行造粒, 制得具有防控土传植物病害功能的生物有机肥 II。

[0056] 对比例 3(基于实施例 2,缺少地衣芽孢杆菌 ABTNL-1)

[0057] 制备具有防控土传植物病害功能的生物有机肥 III,包括如下步骤:

[0058] 1、堆料的准备

[0059] 同实施例 1 步骤 1。

[0060] 2、混合菌液与聚 γ 谷氨酸溶液的制备:

[0061] 用液体培养基分别培养拮抗菌枯草芽孢杆菌 ABTNL-2、热球状尿素芽孢杆菌 ABTNL-3 和苏云金芽孢杆菌 ABTNL-4,培养至每种拮抗菌液中菌体浓度均为 $10^8 \sim 10^9 \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$,三种培养物等体积比例混合,制得混合菌液;其中液体培养基配为氯化钠 10.0g、胰蛋白胨 10.0g、酵母粉 5.0g 溶解于 1L 蒸馏水中,经 121°C ,20 分钟灭菌后使用。

[0062] 另以蒸馏水为溶剂制备浓度为 $200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的聚 γ 谷氨酸溶液。

[0063] 3、堆肥的建立与条件控制

[0064] 在堆肥容器中分层放置物料,将步骤 2 中制备的混合菌液以 $0.03\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的比例添加到堆肥原料中并充分混合,然后进行微生物好氧发酵。每天早晚测一次温度,堆体温度随时间推移而上升,当堆体温度达到 45°C 时即进入高温期,堆体每五天翻一次堆并补充水分。温度达到 60°C 以上并维持 5-7 天,随后温度开始缓慢下降。当堆料温度接近室温时停止翻堆。此时得到的堆肥无异味、不招引蚊虫。其种子发芽率 $>80\%$ 、虫卵含量为 0% 时,将堆肥发酵产物保存备用。

[0065] 4、具有防控土传植物病害功能的生物有机肥的制备

[0066] 向步骤 3 所得堆肥发酵产物中按照 $0.04\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的比例添加步骤 2 制备的聚 γ 谷氨酸溶液,并按照 $0.1\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的比例加入步骤 2 制备的混合菌液,充分混匀后阴干至含水量为 30% ,且有效活菌数 $>5 \times 10^8 \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$,有机质含量 $>45\%$ 。将产品粉碎后过筛,制成粉料,可根据商业需要进行造粒,制得具有防控土传植物病害功能的生物有机肥 III。

[0067] 对比例 4(基于实施例 2,缺少枯草芽孢杆菌 ABTNL-2)

[0068] 制备具有防控土传植物病害功能的生物有机肥 IV,包括如下步骤:

[0069] 1、堆料的准备

[0070] 同实施例 1 步骤 1。

[0071] 2、混合菌液与聚 γ 谷氨酸溶液的制备:

[0072] 用液体培养基分别培养拮抗菌地衣芽孢杆菌 ABTNL-1、热球状尿素芽孢杆菌 ABTNL-3 和苏云金芽孢杆菌 ABTNL-4,培养至每种拮抗菌液中菌体浓度均为 $10^8 \sim 10^9 \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$,三种培养物等体积比例混合,制得混合菌液;其中液体培养基配为氯化钠 10.0g、胰蛋白胨 10.0g、酵母粉 5.0g 溶解于 1L 蒸馏水中,经 121°C ,20 分钟灭菌后使用。

[0073] 另以蒸馏水为溶剂制备浓度为 $200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的聚 γ 谷氨酸溶液。

[0074] 3、堆肥的建立与条件控制

[0075] 在堆肥容器中分层放置物料,将步骤 2 中制备的混合菌液以 $0.03\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的比例添加到堆肥原料中并充分混合,进行微生物好氧发酵。每天早晚测一次温度,堆体温度随时间推移而上升,当堆体温度达到 45°C 时即进入高温期,堆体每五天翻一次堆并补充水分。温度达到 60°C 以上并维持 5-7 天,随后温度开始缓慢下降。当堆料温度接近室温时停止翻堆。此时得到的堆肥无异味、不招引蚊虫。其种子发芽率 $>80\%$ 、虫卵含量为 0% 时,将堆肥发酵产物保存备用。

[0076] 4、具有防控土传植物病害功能的生物有机肥的制备

[0077] 向步骤 3 所得堆肥发酵产物中按照 $0.04\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的比例添加步骤 2 制备的聚 γ 谷氨酸溶液, 并按照 $0.1\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的比例加入步骤 2 制备的混合菌液, 充分混匀后阴干至含水量为 30%, 且有效活菌数 $>5\times 10^8\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$, 有机质含量 $>45\%$ 。将产品粉碎后过筛, 制成粉料, 可根据商业需要进行造粒, 制得具有防控土传植物病害功能的生物有机肥 IV。

[0078] 对比例 5 (基于实施例 2, 缺少热球状尿素芽孢杆菌 ABTNL-3)

[0079] 制备具有防控土传植物病害功能的生物有机肥 V, 包括如下步骤:

[0080] 1、堆料的准备

[0081] 同实施例 1 步骤 1。

[0082] 2、混合菌液与聚 γ 谷氨酸溶液的制备:

[0083] 用液体培养基分别培养拮抗菌地衣芽孢杆菌 ABTNL-1、枯草芽孢杆菌 ABTNL-2 和苏云金芽孢杆菌 ABTNL-4, 培养至每种拮抗菌液中菌体浓度均为 $10^8\sim 10^9\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$, 三种培养物等体积比例混合, 制得混合菌液; 其中液体培养基配为氯化钠 10.0g、胰蛋白胨 10.0g、酵母粉 5.0g 溶解于 1L 蒸馏水中, 经 121°C , 20 分钟灭菌后使用。

[0084] 另以蒸馏水为溶剂制备浓度为 $200\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的聚 γ 谷氨酸溶液。

[0085] 3、堆肥的建立与条件控制

[0086] 在堆肥容器中分层放置物料, 将步骤 2 中制备的混合菌液以 $0.03\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的比例添加到堆肥原料中并充分混合, 进行微生物好氧发酵。每天早晚测一次温度, 堆体温度随时间推移而上升, 当堆体温度达到 45°C 时即进入高温期, 堆体每五天翻一次堆并补充水分。温度达到 60°C 以上并维持 5-7 天, 随后温度开始缓慢下降。当堆料温度接近室温时停止翻堆。此时得到的堆肥无异味、不招引蚊虫。其种子发芽率 $>80\%$ 、虫卵含量为 0% 时, 将堆肥发酵产物保存备用。

[0087] 4、具有防控土传植物病害功能的生物有机肥的制备

[0088] 向步骤 3 所得堆肥发酵产物中按照 $0.04\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的比例添加步骤 2 制备的聚 γ 谷氨酸溶液, 并按照 $0.1\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的比例加入步骤 2 制备的混合菌液, 充分混匀后阴干至含水量为 20%, 且有效活菌数 $>5\times 10^8\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$, 有机质含量 $>45\%$ 。将产品粉碎后过筛, 制成粉料, 可根据商业需要进行造粒, 制得具有防控土传植物病害功能的生物有机肥 V。

[0089] 对比例 6 (基于实施例 2, 缺少苏云金芽孢杆菌 ABTNL-4)

[0090] 制备具有防控土传植物病害功能的生物有机肥 VI, 包括如下步骤:

[0091] 1、堆料的准备

[0092] 同实施例 1 步骤 1。

[0093] 2、混合菌液与聚 γ 谷氨酸溶液的制备:

[0094] 用液体培养基分别培养拮抗菌地衣芽孢杆菌 ABTNL-1、枯草芽孢杆菌 ABTNL-2 和热球状尿素芽孢杆菌 ABTNL-3, 培养至每种拮抗菌液中菌体浓度均为 $10^8\sim 10^9\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$, 三种培养物等体积比例混合, 制得混合菌液; 其中液体培养基配为氯化钠 10.0g、胰蛋白胨 10.0g、酵母粉 5.0g 溶解于 1L 蒸馏水中, 经 121°C , 20 分钟灭菌后使用。

[0095] 另以蒸馏水为溶剂制备浓度为 $200\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的聚 γ 谷氨酸溶液。

[0096] 3、堆肥的建立与条件控制

[0097] 在堆肥容器中分层放置物料, 将步骤 2 中制备的混合菌液以 $0.03\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的比例添

加到堆肥原料中并充分混合,进行微生物好氧发酵。每天早晚测一次温度,堆体温度随时间推移而上升,当堆体温度达到 45℃ 时即进入高温期,堆体每五天翻一次堆并补充水分。温度达到 55℃ 以上并维持 5-7 天,随后温度开始缓慢下降。当堆料温度接近室温时停止翻堆。此时得到的堆肥无异味、不招引蚊虫。其种子发芽率 >80%、虫卵含量为 0% 时,将堆肥发酵产物保存备用。

[0098] 4、具有防控土传植物病害功能的生物有机肥的制备

[0099] 向步骤 3 所得堆肥发酵产物中按照 0.04L·kg⁻¹ 的比例添加步骤 2 制备的聚 γ 谷氨酸溶液,并按照 0.1L·kg⁻¹ 的比例加入步骤 2 制备的混合菌液,充分混匀后阴干至含水量为 20%,且有效活菌数 >5×10⁸CFU·g⁻¹,有机质含量 >45%。将产品粉碎后过筛,制成粉料,可根据商业需要进行造粒,制得具有防控土传植物病害功能的生物有机肥 VI。

[0100] 实施例 7. 肥料效果试验:

[0101] 试验分 A、B、C、D、E、F 和 G 共 7 个小组分别进行小麦、甜瓜、玉米、大豆和黄瓜的种植试验,每组 100 株作物,并设置三个重复。A 组施用实施例 1 制备的生物有机肥 I;B 组施用实施例 2 制备的生物有机肥 II;C、D、E 和 F 组分别使用对比实施例例 3、4、5 和 6 制备的生物有机肥 III、IV、V、VI;G 组为对照组,土壤不施肥(施用等量土壤)。

[0102] 土壤和种子的准备:

[0103] 将经 8 目不锈钢筛网筛选的细密土壤 121℃ 灭菌 20min 以除去其中影响种子生长的各种微生物后保存备用。

[0104] 选取籽粒饱满、形状完整的小麦、玉米、甜瓜、大豆和黄瓜种子各 300 粒,用高锰酸钾溶液(0.05%)消毒 30min 后用水反复冲洗干净后保存备用,并在 37℃ 条件下催发 24h。

[0105] 种植试验:在种植槽中加入均匀混入生物有机肥的土壤(生物有机肥肥以 10t·hm² 的剂量施用)后播种,并用一定量的土壤埋没种子。以上操作完成后在恒温培养箱中培养,每日进行常规的浇水管理,15~20 天时,作物处于幼苗期。分别对小麦、玉米、大豆和黄瓜幼苗的种植土壤接种足量的特定土传致病菌,其中小麦为纹枯病真菌、玉米为丝黑穗病菌、大豆为疫病菌、黄瓜为枯萎病菌。四种病害均为以上作物主要真菌性病害。接种病菌后,5~10 天内基本的基本管理不变,观察记录患病株数并计算比例。

[0106] 统计各组植物的患病状况,以 G 组为对照(防病率为记为 0) 计算各组患病率与防病率,结果如表 1 所示。

[0107] 由表 1 中的结果可知,经过施用实施例 1 和实施例 2 制备的生物有机肥 A 组和 B 组相较于不施肥的对照组,小麦、大豆、玉米和黄瓜患病株数明显偏少,对小麦纹枯病、大豆疫病、玉米丝黑穗病和黄瓜枯萎病的防控率达到 85% 以上,而缺少其中任何一种拮抗菌时,其对土传植物病害的防控效果大大降低。这表明本发明制备的生物有机肥对土传植物真菌性病害具有有效的防控效果,这是由于其中存在大量特有的枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌和弯曲芽孢杆菌及其代谢产物对土传植物病菌的拮抗和抑制作用。综上所述,本发明制备的生物有机肥的施用对常见土传植物真菌性病害有显著的防控效果,可应用于农业生产实践中。

[0108] 表 1 本发明的生物有机肥对土传植物疾病的防控效果试验结果

[0109]

组别	小麦			大豆			玉米			黄瓜		
	有效株数	患病率%	防病率%	有效株数	患病率%	防病率%	有效株数	患病率%	防病率%	有效株数	患病率%	防病率%
A	279	3.1	88.0	285	5.3	92.5	282	4.2	89.3	277	10.8	87.4
B	284	1.8	90.7	292	2.7	95.1	293	2.0	91.5	290	5.5	92.7
C	275	52.0	39.1	283	61.9	35.9	290	62.1	31.4	278	65.1	33.1
D	277	53.9	37.2	284	64.1	33.7	288	64.9	28.6	285	68.1	30.1
E	280	46.1	45.0	288	55.9	41.2	285	57.9	35.6	274	70.1	28.1
F	276	47.9	43.2	279	68.1	29.7	290	60.0	33.5	280	53.9	44.3
G	270	91.1	0	276	97.8	0	276	93.5	0	275	98.2	0

[0110] 以上所述, 仅为本发明较佳的具体实施方式, 但本发明的保护范围并不局限于此, 任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内, 根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变, 都应涵盖在本发明的保护范围之内。