



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103773717 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 07

(21) 申请号 201310743042. X

*C12R 1/665*(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 12. 30

*C12R 1/25*(2006. 01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC No7926 2013. 07. 15

CGMCC No7928 2013. 07. 15

(71) 申请人 中北大学

地址 030051 山西省太原市学院路 3#

(72) 发明人 郭建峰 梁栋 马忠平 张艳玲

(74) 专利代理机构 北京鼎佳达知识产权代理事

务所(普通合伙) 11348

代理人 王伟锋

(51) Int. Cl.

*C12N 1/20*(2006. 01)

*C12N 1/14*(2006. 01)

*C12R 1/07*(2006. 01)

*C12R 1/125*(2006. 01)

权利要求书3页 说明书7页

(54) 发明名称

一种高效微生物肥

(57) 摘要

本发明公开了一种高效微生物肥,属于农用肥料技术领域,所述高效微生物肥,重量份数组成为:胶质芽孢杆菌 2-5 份,解磷菌 1-3 份,枯草芽孢杆菌培养物 20-35,泡盛曲霉培养物 6-8 份,植物乳杆菌剂 10-15 份。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,有利于提高土壤肥力。本产品使用方法简单,每亩地使用量 0. 3-1 公斤,成本仅为 70-100 元/亩,拌种或生长期灌水前地表喷洒。

1. 一种高效微生物肥,其特征在于,重量份数组成为:胶质芽孢杆菌 2-5 份,解磷菌 1-3 份,枯草芽孢杆菌培养物 20-35 份,泡盛曲霉培养物 6-8 份,植物乳杆菌剂 10-15 份;所述枯草芽孢杆菌保藏号为 CGMCC No. 7926,所述植物乳杆菌保藏编号为 CGMCC No. 7928。

2. 根据权利要求 1 所述的一种高效微生物肥,其特征在于,所述枯草芽孢杆菌培养物的制备方法如下:

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;

(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;

(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;

(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;

(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;

(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。

培养基组成:葡萄糖 6%,酵母提取物 1%,蛋白胨 0.2%,CaCO<sub>3</sub>1%,pH6.8。

3. 根据权利要求 1 所述的一种高效微生物肥,其特征在于,所述植物乳杆菌剂的制备方法如下:

(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;

(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;

(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;

(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;

(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℃;

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。

4. 根据权利要求 1 所述的一种高效微生物肥,其特征在于,所述泡盛曲霉菌剂的制备方法如下:

斜面菌种活化培养:将泡盛曲霉斜面菌种转接到斜面培养基上,27℃培养3天;

固体一级种子培养:挑取泡盛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;

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;

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;

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;

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所述的一种高效微生物肥,其特征在于,重量份数组成为:胶质芽孢杆菌3份,解磷菌2份,枯草芽孢杆菌培养物30份,泡盛曲霉培养物6份,植物乳杆菌剂12份。

6. 根据权利要求1所述的一种高效微生物肥,其特征在于,重量份数组成为:胶质芽孢杆菌4份,解磷菌3份,枯草芽孢杆菌培养物29份,泡盛曲霉培养物7份,植物乳杆菌剂13份。

7. 如权利要求1-6所述高效微生物肥,其特征在于,所述高效微生物肥的制备方法如下:

按照比例将各种菌剂混合,或混合后制粒;

所述枯草芽孢杆菌培养物的制备方法如下:

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;

(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;

(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;

(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;

(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;

(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。

培养基组成:葡萄糖6%,酵母提取物1%,蛋白胨0.2%,CaCO<sub>3</sub>1%,pH6.8。

所述植物乳杆菌剂CGMCC No. 7928的制备方法如下:

(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 ;

(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 ;

(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 ;

(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 ;

(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℃。

所述泡盛曲霉菌剂的制备方法如下 :

斜面菌种活化培养 :将泡盛曲霉斜面菌种转接到斜面培养基上,27℃培养 3 天 ;

固体一级种子培养 :挑取泡盛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 ;

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 ;

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 ;

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 ;

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。

## 一种高效微生物肥

### 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,特别涉及一种高效微生物肥及其制备。

### 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] 多年以来,微生物肥料的多数加工方式只采用成品菌剂与填料混合,缺少发酵代谢产物,严重影响了微生物肥料产品的肥效,例如公布号为 CN103396252A 的专利申请,公开了一种含氨基酸的复合微生物肥料,其中添加的成品菌剂由枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌按照一定比例混合组成。

[0005] 而且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 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。

[0006] 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。

### 发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种高效微生物肥,重量份数组成为:胶质芽孢杆菌 2-5 份,解磷菌 1-3 份,枯草芽孢杆菌培养物 20-35 份,泡盛曲霉培养物 6-8 份,植物乳杆菌剂 10-15 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、干燥后获得枯草芽孢杆菌培养物。

[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 0.5:1,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℃。

[0010] 泡盛曲霉培养物制备:菌种培养,固体发酵培养:孢子液接种到米曲霉固态发酵培养料中,27-33℃培养至菌丝长满培养料,低温流化床干燥,粉碎干燥物。

[0011] 所述高效微生物肥制备方法如下:按照上述比例将各种菌剂混合,或混合后制粒。

[0012] 本发明采用的菌种如下:

[0013] 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) CGMCC No. 7926;

[0014] 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) CGMCC No. 7928;

[0015] 泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*) CGMCC3No. 6484;

[0016] 上述三种菌种的保藏单位是中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。地址:中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院生物研究所;邮编:100101。

[0017] 解磷菌为解磷巨大芽孢杆菌,解磷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] 本发明的肥料能够改良土壤,肥料中有益微生物能产生糖类物质与植物粘液,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。所以施用微生物肥料能改善土壤物理性状,有利于提高土壤肥力。

[0021] 本产品使用方法简单,每亩地使用量 0.3-1 公斤,成本仅为 70-100 元/亩,拌种或生长期灌水前地表喷洒。

[0022] 土壤生物酶的转化,在降低农业生产成本、减少化肥的使用、恢复土壤生态地力和有效提高农作物产量等方面均能起到显著的作用,充分发挥土壤的有机质效能。

## 具体实施方式

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 实施例 1

[0026] 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。

[0027] 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。

[0028] 所述菌株制备的耐高温  $\alpha$ -淀粉酶活力为 30000-35000u/ml ;适用温度范围为 105-115℃,最适反应温度 110℃,在 110℃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。

[0029] 所述菌株特点如下 :

[0030] 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。

[0031] 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 :

[0032] (1) 菌悬液的制备

[0033] 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℃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。

[0034] (2) 紫外线-氯化锂-硫酸二乙酯复合诱变

[0035] 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℃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。

[0036] (3) 高产菌种的初筛

[0037] 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。

[0038] (4) 摇瓶发酵复筛

[0039] 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。

[0040] (5) 酶活测定

[0041] 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,

[0042] 即为 1 个酶活力单位,以 U/mL 表示。

[0043] 经测定,菌株 Li-2013-02,为稳定的最高产菌株,且酶活达到 30000U/mL。

[0044] 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%。

[0045] 所述的种子培养基 :酵母粉 0.5%,蛋白胨 1%,可溶性淀粉 1%,NaCl1%。

[0046] 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%。

[0047] 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。

[0048] 所述耐高温的  $\alpha$ -淀粉酶,其酶学性质如下:

[0049] (1) 该酶温度适应范围较宽,最适作用温度在 100-110°C 之间,且在 110°C 以下保存的,温度稳定性较好,而 110°C 以上保存长时间温度稳定性较差。

[0050] (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。

[0051] (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。

[0052] 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(-),吡啉实验(+),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(+).

[0053] 本发明植物乳杆菌采用下述流程进行选育:

[0054] 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。

[0055] 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。

[0056] 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。

[0057] 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。

[0058] 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%。

[0059] 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。

[0060] 具体过程如下:

[0061] 培养基:

[0062] 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)。

[0063] 1. 硫酸二乙酯(DES)诱变选育

[0064] 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

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。

[0065] 2) 取 5mL 菌液, 5000rpm 离心 10min 收集菌体, 用生理盐水洗涤 2 次。

[0066] 3) 用 pH7.0 磷酸缓冲液稀释成 107 个 /mL 菌悬液。

[0067] 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)。

[0068] 5) 在 30℃摇床中 150rpm 反应 30min, 取 1mL 混合液, 加入 0.5mL 25%Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶液中 止反应。

[0069] 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皿中。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。

[0070] 2. 亚硝基胍诱变

[0071] 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。

[0072] 2) 取 5mL 菌液 5000rpm 离心 10min 收集菌体, 用生理盐水洗涤 2 次。

[0073] 3) 用 pH6.0 磷酸缓冲液稀释成 107 个 /mL 菌悬液。

[0074] 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。

[0075] 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。

[0076] 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皿中。在 40℃培养 2~3 天后挑取透明圈 / 菌落直径较大的菌株 150 支。

[0077] 3. 摇瓶复筛

[0078] 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。

[0079] 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。

[0080] 4. 遗传稳定性试验

[0081] 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。

[0082] 泡盛曲霉菌剂的制备方法:

[0083] 斜面菌种活化培养: 将泡盛曲霉斜面菌种转接到斜面培养基上, 27℃培养 3 天。

[0084] 固体一级种子培养: 挑取泡盛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。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 实施例 2

[0090] 一种高效微生物肥, 重量份数组成为: 胶质芽孢杆菌 3 份, 解磷菌 2 份, 枯草芽孢杆菌培养物 30 份, 泡盛曲霉培养物 6 份, 植物乳杆菌剂 12 份。

[0091] 枯草芽孢杆菌培养物的制备方法:

[0092] 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;

[0093] (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;

[0094] (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;

[0095] (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;

[0096] (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;

[0097] (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。

[0098] 培养基组成: 葡萄糖 6%, 酵母提取物 1%, 蛋白胨 0.2%, CaCO<sub>3</sub>1%, pH6.8。

[0099] 植物乳杆菌剂的制备方法:

[0100] (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;

[0101] (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;

[0102] (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;

[0103] (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;

[0104] (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℃。

[0105] 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%, $K_2HPO_4$ 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.005%, $CaCO_3$ 2%,琼脂 1.5%,pH6.8。

[0106] 实施例 3

[0107] 一种高效微生物肥,重量份数组成为:胶质芽孢杆菌 4 份,解磷菌 3 份,枯草芽孢杆菌培养物 29 份,泡盛曲霉培养物 7 份,植物乳杆菌剂 13 份。

[0108] 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、干燥后获得枯草芽孢杆菌培养物。

[0109] 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 0.5:1,载体组成为: $CaCO_3$ 25 份,糊精 12 份。流化床干燥,干燥温度 50℃。

[0110] 泡盛曲霉培养物制备:菌种培养,固体发酵培养:孢子液接种到米曲霉固态发酵培养料中,27-33℃培养至菌丝长满培养料,低温流化床干燥,粉碎干燥物。

[0111] 实施例 4

[0112] 产品效果实验

[0113] 试验地的选择与试验设计:试验于 2009 年 4 月 27 日—9 月 30 日在宁夏盐池县花马池镇八堡村进行。

[0114] 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 0.7 公斤,出苗 1 个月左右通过锄地松土方式使用发明产品 0.3 公斤,对照组使用常规肥料。

[0115] 发明产品使用玉米地玉米产量达到 630 公斤,对照组达到 510 公斤;该地块在第 2 年种植春小麦,春小麦产量达到了 420 公斤,比对照组单产提高了 22%。且试验田土壤结构良好,无大块和板结。