

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C02F 3/34

C12N 1/20



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 02134998.3

[45] 授权公告日 2005 年 1 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1186275C

[22] 申请日 2002.10.23 [21] 申请号 02134998.3

[71] 专利权人 广东省微生物研究所

地址 510070 广东省广州市先烈中路 100 号

[72] 发明人 施庆珊 李良秋 吴家俊 许虹

林小平 邱玉棠

审查员 欧 岚

[74] 专利代理机构 广州科粤专利代理有限责任公  
司

代理人 余炳和

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称 一种长效微生物净水剂及其生产方法

[57] 摘要

本发明提供一种长效微生物净水剂及其生产方法,所述的长效微生物净水剂为一种微生物发酵液,其中含有地衣形芽孢杆菌 AS1.813、巨大芽孢杆菌 ACCC10008、萤光假单胞杆菌 AS1.867、恶臭假单胞菌 AS1.1003、链杆菌 AB93179 和白地霉 AS2.1175,六种菌的总菌数达  $5.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上。其制备方法是以所述的六种菌为菌种,将所述的六种菌种分别在斜面、一级液体活化培养后,在种子罐进行混合活化培养,再接入大发酵罐中进行混合发酵培养,发酵期间适当流加补充营养液,使六种菌的总菌数达  $5.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上。该产品可用于养殖水体的水质净化,淡、海水养殖全过程均可使用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种长效微生物净水剂，为一种微生物发酵液，其特征在于其中含有地衣形芽孢杆菌 AS1.813、巨大芽孢杆菌 ACCC10008、萤光假单胞杆菌 AS1.867、恶臭假单胞菌 AS1.1003、链杆菌 AB93179 和白地霉 AS2.1175，六种菌的总菌数达  $5.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上。

2. 一种权利要求 1 所述的长效微生物净水剂的制备方法，其特征在于以地衣形芽孢杆菌 AS1.813、巨大芽孢杆菌 ACCC10008、萤光假单胞杆菌 AS1.867、恶臭假单胞菌 AS1.1003、链杆菌 AB93179 和白地霉 AS2.1175 为菌种，将所述的六种菌种分别在斜面、一级液体活化培养后，在种子罐进行混合活化培养，再接入大发酵罐中进行混合发酵培养，使六种菌的总菌数达  $5.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上。

3. 根据权利要求 2 所述的长效微生物净水剂的制备方法，其特征在于所述的六种菌种在种子罐活化培养的工艺中，每种菌的接种量相同。

4. 根据权利要求 2 所述的长效微生物净水剂的制备方法，其特征在于在大发酵罐进行发酵培养的工艺中，培养基成份按每升培养基所含克重 g/l 计算如下：葡萄糖 15~25，尿素 1~3，酵母粉 2~5，玉米浆 4~8，蛋白胨 8~12，酵母膏 8~12，pH7.0；并在发酵过程中采用连续流加高浓度的营养补充培养基，其组分的重量百分比为：葡萄糖 35~45，酵母膏 15~25，其余为水，pH7.0。

5. 根据权利要求 2、3 或 4 所述的长效微生物净水剂的制备方法，其特征在于具体发酵工艺过程为：

- a) 分别打开地衣形芽孢杆菌 AS1.813、巨大芽孢杆菌 ACCC10008、白地霉 AS2.1175、恶臭假单胞菌 AS1.1003、链杆菌 AB93179、萤光假单胞杆菌 AS1.867 六种菌种的冻干管，用常规方法挑选生长最快、菌落最大的单菌落，用接种针接种于保藏斜面上培养；
- b) 斜面菌种活化：将培养好的保藏斜面种分别划线于以上新配制的上述不同生产斜面上进行活化；
- c) 菌种的一级液体活化：将上述培养好的活化斜面用接种环分别接种一环于不同一级液体活化培养基中进行培养，使液体种的菌数达  $2.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上；
- d) 种子罐二级液体活化种培养：将上述分别培养好的六种一级液体活化种摇匀后在无菌条件下等量混合，然后按 1~5%接种量，接入种子罐二级液体活化培养基中，通气培养 8~10 小时，待菌数达  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上，停止培养；
- e) 大发酵罐中的培养：将上述培养好的二级液体活化种按 10~20%的接种量接入装有已消毒好培养基的发酵罐中进行培养，30~36℃，转速 180~250 r/m，风量为 20~30M<sup>3</sup> 空气/M<sup>3</sup> 培养基·小时，进行通气培养 6~8 小时，同时发酵 1~2 小时后开始流加，流加速度按 0.01~0.03M<sup>3</sup> 营养补充培养基/M<sup>3</sup> 发酵液·小时，发酵 4~5 小时后停止流加，待菌数达  $5.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上，停止发酵培养。

## 一种长效微生物净水剂及其生产方法

### 技术领域

本发明涉及一种用于水产养殖、环保的微生物净水剂及其生产方法。

### 背景技术

本发明所述的微生物净水剂属于 EM 的一种类型。EM 是 Effective Microorganisms 的英文缩写，即有效微生物菌群，它最先是日本比嘉照夫教授于 80 年代初发明创造的，当时是由 10 个属、80 多种微生物组成的一种复合微生物制剂。由于该产品是有益微生物的复合体，因此它不含任何化学有害物质、无毒副作用、不污染环境。EM 技术可用于提高农业、牧业、林业、水产业的生产能力，在治理环境、保护环境以及人类保健等方面，都有着巨大的、不可替代的作用和潜力，被誉为目前影响范围最大、应用领域最广、综合性最强的高新生物工程技术，具有显著的经济效益、生态效益、社会效益和广泛的应用前景。目前，EM 技术不仅在日本已经广泛推广应用，在美国、泰国、巴西、法国等 90 多个国家和地区也已向农林牧渔、环保、医疗、工业等领域纵深挺进。我国从 1991 年开始引进，目前已在广东、江西、四川、福建等省已进行了很多生产应用。EM 技术在养殖业上具备以下功能：①明显提高日增重；②对疫病有奇特的防治效果；③明显提高繁殖率；④消除畜禽粪便恶臭。EM 可以使粪便循环利用，将农、林、牧、渔等交织起来，形成自我净化、充分利用的高效综合环保链。同时环保方面也具有强大的功效：净化水质，使水循环利用，分解残留的农药。净化农村井水或池塘的水污染，以便饮用更健康的水，保证人类健康，减少病原性衍生物和不良藻类，增加生物相，减少污泥的产生，减少恶臭。

在具体进行 EM 生产时，根据产品的具体用途，进行微生物菌群的优化，同时具体的生产方法也多种多样，总的目标都是为了降低生产成本，生产方法尽可能简单，在尽可能短生产周期生产出高浓度的有效微生物菌群。现有的微生物净水剂生产工艺中，为了培养、生产的简便，通常采用单一、或两到三个菌种，在一定条件下进行发酵，由于采用的培养基通用性较差，使得具有不同生长特性的不同菌种生长程度差异较大，经常有某一菌种有一定程度的生长，而其它菌种较难生长；即使是单一菌种，由于培养基搭配和发酵工艺的不合理，其菌浓度也不高，发酵周期也相对偏长，因而使得微生物净水剂的使用效果不太显著，同时保质时间也较短，因而现有技术极大地限制了活菌微生物净水剂这类功能显著的产品的生产和推广应用。

本发明的目的是提供一种具有高浓度有效微生物菌群的长效微生物净水剂及其生产方法，以克服现有技术存在的不足和问题。

本发明所提供的长效微生物净水剂是由六种不同微生物通过大种量接种、发酵而制得的微生物发酵液，在该发酵液中含有地衣形芽孢杆菌 AS1.813、巨大芽孢杆菌 ACCC10008、荧光假单胞杆菌 AS1.867、恶臭假单胞菌 AS1.1003、链杆菌 AB93179 和白地霉 AS2.1175，六种菌的总菌数达  $5.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上。

所述的六种菌的具体资料是：1、地衣形芽孢杆菌 AS1.813(*Bacillus licheniformis*)，保藏于 CGMCC，中国普通微生物菌种保藏中心、；巨大芽孢杆菌 ACCC10008(*Bacillus megatherium de Bary*)保藏于 CGMCC，中国普通微生物菌种保藏中心；白地霉 AS2.1175(*Geotrichum candidum* Link)，保藏于 CGMCC，中国普通微生物菌种保藏中心；恶臭假单胞菌 AS1.1003(*Pseudomonas putida*)，保藏于 CGMCC，中国普通微生物菌种保藏中心；链杆菌 AB93179 (*Streptobacillus* sp.)，保藏于 CCTCC，中国典型培养物保藏中心；荧光假单胞杆菌 AS1.867 (*Pseudomonas fluorescens* Migula)，保藏于 CGMCC，中国普通微生物菌种保藏中心。

上述菌种在《中国菌种目录》(中国微生物菌种保藏管理委员会编著，1983年，轻工业出版社出版)和《中国典型培养物保藏中心培养物目录》(一九九八年九月武汉大学，主编：陶天申)中已公开记载，其中：地衣形芽孢杆菌 AS1.813(*Bacillus licheniformis*)、巨大芽孢杆菌 ACCC10008(*Bacillus megatherium de Bary*)、白地霉 AS2.1175(*Geotrichum candidum* Link)、恶臭假单胞菌 AS1.1003(*Pseudomonas putida*)、荧光假单胞杆菌 AS1.867 (*Pseudomonas fluorescens* Migula) 分别记载在《中国菌种目录》的 P55、P57、P293、P166、P165 等页面；链杆菌 AB93179 (*Streptobacillus* sp.) 记载在《中国典型培养物保藏中心培养物目录》的 P115 页面。

本发明的长效微生物净水剂采用以下方法生产制备：以地衣形芽孢杆菌 AS1.813、巨大芽孢杆菌 ACCC10008、荧光假单胞杆菌 AS1.867、恶臭假单胞菌 AS1.1003、链杆菌 AB93179 和白地霉 AS2.1175 为菌种，将所述的六种菌种分别在斜面、一级液体活化培养后，在种子罐进行混合活化培养，再接入大发酵罐中进行混合发酵培养，使六种菌的总菌数达  $5.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上。

所述的六种菌种在种子罐活化培养的工艺中，每种菌以相同的接种量接种。

在大发酵罐进行发酵培养的工艺中，最好采用成份如下的培养基(按每升培养基所含克重 g/l 计算)：葡萄糖 15~25，尿素 1~3，酵母粉 2~5，玉米浆 4~8，蛋白胨 8~12，酵母膏 8~12，pH7.0；并在发酵过程中采用连续流加高浓度的营养补充培养基，其组分为(重量百分比)：葡萄糖 35~45，酵母膏 15~25，其余为水，pH7.0。

本发明的具体发酵工艺过程为：

- a) 分别打开地衣形芽孢杆菌 AS1.813、巨大芽孢杆菌 ACCC10008、白地霉 AS2.1175、恶臭假单胞菌 AS1.1003、链杆菌 AB93179、荧光假单胞杆菌 AS1.867 六种菌种的冻干管，用常规方法挑选生长最快、菌落最大的单菌落，用接种针接种于保藏斜面上培养；
- b) 斜面菌种活化：将培养好的保藏斜面种分别划线于以上新配制的上述不同生产斜面上进行活化；
- c) 菌种的一级液体活化：将上述培养好的活化斜面用接种环分别接种一环于不同一级液体活化培养基中进行培养，使液体种的菌数达  $2.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上；
- d) 种子罐二级液体活化种培养：将上述分别培养好的六种一级液体活化种摇匀后在无菌条件下等量混合，然后按 1~5%接种量，接入种子罐二级液体活化培养基中，通气培养 8~10 小时，待菌数达  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上，停止培养；
- e) 大发酵罐中的培养：将上述培养好的二级液体活化种按 10~20%的接种量接入装有已消毒好培养基的发酵罐中进行培养，30~36℃，转速 180~250 r/m，风量为 20~30M<sup>3</sup> 空气/M<sup>3</sup> 培养基·小时，进行通气培养 6~8 小时，同时发酵 1~2 小时后开始流加，流加速度按 0.01~0.03M<sup>3</sup> 营养补充培养基/M<sup>3</sup> 发酵液·小时，发酵 4~5 小时后停止流加。待菌数达  $5.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上，停止发酵培养。

本发明通过六种不同微生物均大种量接种、发酵过程中适当流加灭好菌、溶解好的高浓度葡萄糖和酵母膏溶液，使发酵液中碳源和氮原营养相对恒定，同时，发酵全过程采用恒温、大风量工艺，从而使得六种菌均能均衡、快速生长，该生产方法发酵工艺简单、发酵周期短、发酵完毕主要发酵营养成分基本消耗完、发酵结束后每种菌的浓度菌达  $10^9$  cpu/ml 以上。该技术生产出的微生物净水剂产品由于具有以上特点如六种菌的浓度均较高、产品中残留的主要发酵营养成分少等，因而具有保质期长、使用效果显著及长效性等优点。该技术有效地克服了现有技术的不足。该产品在水产中用于养殖水体的水质净化，淡、海水养殖全过程均可使用。每亩（水深 1 米）首次施放 1 公斤，以后根据水质污染程度的轻重，每 20-30 天施放 0.5-1 公斤。可以长时间保持水质状况良好。环保方面，根据水质污染程度的轻重，施加不同的用量。

#### 具体实施方式

用 6M<sup>3</sup> 发酵罐生产长效微生物净水剂，工艺过程如下：

1. 活化斜面菌种：用接种针将保藏的菌种①地衣形芽孢杆菌 AS1.813(Bacillus licheniformis)、②巨大芽孢杆菌 ACCC10008(Bacillus megatherium de Bary)、③荧光假单胞杆菌 AS1.867 (Pseudomonas fluorescens Migula)、④恶臭假单胞菌

- AS1.1003(*Pseudomonas putida*)、⑤链杆菌 AB93179 (*Streptobacillus* sp.) 分别接种一环划线于以上新配制的上述生产斜面上, 生产斜面的化学组成如下(g/L): 葡萄糖 20, 尿素 4.0, 玉米浆 6, 蛋白胨 10, 酵母膏 10, 琼脂 20, pH7.0。每个种各接 3 支, 于 32℃ 培养 18 小时; 用接种针将保藏的菌种白地霉 AS2.1175 分别接种一环划线于以上新配制的上述生产斜面上, 接 3 支生产斜面, 生产斜面的化学组成如下(g/L): 6Bx<sup>0</sup> 麦芽汁 1000ml, 琼脂 20, pH 自然, 于 28℃ 培养 24 小时。
2. 菌种的一级液体活化: 将培养好的活化斜面用接种环分别接种一环于上述不同一级液体活化培养基中, 其中①~⑤号种一级液体活化培养基化学组成如下(g/L): 葡萄糖 20, 尿素 4.0, 玉米浆 6, 蛋白胨 10, 酵母膏 10, pH7.0。培养基装于 1000ml 三角瓶中, 三角瓶装量为 40ml, 每个种各接 18 瓶, 于 33℃ 往复式摇床振荡培养 15 小时, 摇床转速为 110r/m, 冲程为 75mm, 使液体种的菌数达  $2.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上; ⑥号种白地霉 AS2.1175 用接种环接两环于相对应的一级液体活化培养基中, 液体活化培养基装于 1000ml 三角瓶中, 三角瓶装量为 100ml, 接 7 瓶, 于 28℃ 往复式摇床振荡培养 24 小时, 摇床转速为 120r/m, 冲程为 75mm, 使液体种的菌浓度达  $2.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上。
  3. 二级液体活化种 (600L 种子罐) 的培养: 将上述分别培养好的六种一级液体活化种摇匀后在无菌条件下每个种取 670ml 等量混合, 然后接入二级液体活化培养基 (种子罐) 中, 二级液体活化种培养基的化学组成如下(g/L): 葡萄糖 20, 尿素 2, 酵母粉 5, 玉米浆 10, 蛋白胨 10, 酵母膏 10, pH7.0。600L 种子罐装 400L 培养基, 33℃, 转速 200r/m, 风量为  $2M^3$ /小时, 进行通气培养, 保持罐压 0.1Mpa; 从六小时开始, 通过镜检结合光密度 (OD) 检测菌浓度, 待菌数达  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上, 停止培养。
  4. 复合微生物制剂在大发酵罐中的培养: 将上述分别培养好的二级液体活化种 400L 接入装有  $4 M^3$  已消毒好培养基的发酵罐中进行培养, 发酵培养基组分 (g/L): 葡萄糖 20, 尿素 2, 酵母粉 3, 玉米浆 6, 蛋白胨 10, 酵母膏 10, pH7.0。34℃, 转速 220r/m, 风量为  $140M^3$  空气/小时, 进行通气培养 6-8 小时, 同时发酵 1.5 小时后开始流加, 流加速度按  $0.041M^3$  营养补充培养基/小时, 发酵 5 小时后停止流加, 保持罐压 0.1Mpa。从 4 小时开始, 待菌浓度达  $5.0 \times 10^9$  cfu/ml 以上, 停止发酵培养。
  5. 制成成品: 停止发酵培养后, 首先关小通风, 保持罐压 0.02Mpa, 转速从 220r/m 降为 100r/m, 开始放罐, 同时采用无菌操作、用 4 条软管直接、快速放入不同体积的包装罐中。