



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101914445 A

(43) 申请公布日 2010.12.15

(21) 申请号 201010231422.1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010.07.20

C12N 1/00 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

C12N 1/20 (2006.01)

CGMCC No. 3768 2010.04.26

A01N 63/02 (2006.01)

CGMCC No. 3770 2010.04.26

A01P 21/00 (2006.01)

CGMCC No. 3769 2010.04.26

A23K 1/16 (2006.01)

C02F 3/34 (2006.01)

(71) 申请人 兰州市南北两山环境绿化工程指挥部

C05F 11/08 (2006.01)

C12R 1/11 (2006.01)

地址 730046 甘肃省兰州市城关区北滨河中路112号

C12R 1/07 (2006.01)

C12R 1/065 (2006.01)

(72) 发明人 钟芳 孙荣高 秦伟志 李春杰 柴青

(74) 专利代理机构 兰州振华专利代理有限责任公司 62102

代理人 张真

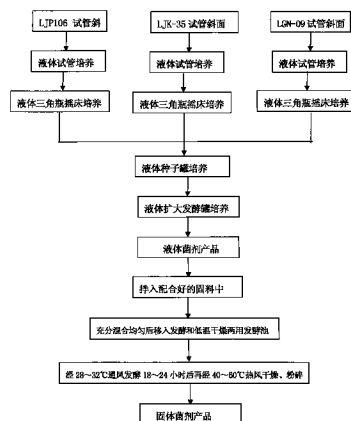
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

土著益生微生物固体菌剂及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明主要涉及微生物的发酵方法,尤其涉及利用食品行业产生的废液废渣制备巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌三菌组合的固体菌剂的方法和应用。一种土著益生微生物固体菌剂,其主要特点在于由巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌、圆褐固氮菌和固体培养基组成,其三种菌株的重量百分比为巨大芽孢杆菌为55~65%、胶冻样芽孢杆菌为30~35%、圆褐固氮菌5~10%,所述的巨大芽孢杆菌的保藏号为CGMCC 3770;所述的胶冻样芽孢杆菌的保藏号为CGMCC 3769;所述的圆褐固氮菌的保藏号为CGMCC 3768。所述的微生物固体菌剂用于农作物和植物生长剂或畜禽饲料添加剂。本发明的优点是用食品行业产生的废液、废渣为原料,生产过程无“三废”污染,生产工艺简单,操作方便,节省人力,节省能源,其固体菌剂,可作为微生物肥料。



CN 101914445 A

1. 一种土著益生微生物固体菌剂,其特征在于由巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、胶冻样芽孢杆菌 (*Bacillus mucilaginosus*)、圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*) 和固体培养基组成,其三种菌株的重量百分比为巨大芽孢杆菌为 55~65%、胶冻样芽孢杆菌为 30~35%、圆褐固氮菌 5~10%,所述的巨大芽孢杆菌的保藏号为 CGMCC No. 3770;所述的胶冻样芽孢杆菌的保藏号为 CGMCC No. 3769;所述的圆褐固氮菌的保藏号为 CGMCC No. 3768。

2. 如权利要求 1 所述的土著益生微生物固体菌剂,其特征在于:所述的固体培养基包括有重量百分比为以干料计 50-80%的糟渣,15-30%的玉米芯粉,8-12%的麸皮,0.5-0.8%的玉米面,0.1-3%的尿素,0.2-4%的硫酸铵,再加入新鲜豆腐废水或粉丝废水或玉米淀粉废水或洋芋淀粉废水使其含水重量百分比为 45-65%,用 1%的石灰水调 pH 7.0-7.5。

3. 一种土著益生微生物固体菌剂的制备方法,其特征在于包括有如下步骤:

A. 土著益生巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌琼脂斜面培养基的制备及菌种的培养:

a. 琼脂斜面培养基的制备:麦芽汁 0.5-2%、葡萄糖 0.5-2%、蛋白胨 0.2-0.6%、琼脂粉 1-3%、无菌水 80-120ml,加热溶解后,用 1%的氢氧化钠调 pH 值至 pH7.0-7.5,经 110-114°C,30-35 分钟蒸汽灭菌,然后在无菌条件下分装于 15×1.5cm 的干燥灭菌的试管摆成斜面待凝固后备用;

b. 菌种的培养:分别取巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌的母种琼脂斜面菌,在无菌条件下,转种于上述制备的琼脂斜面培养基上,经 28-32°C、24-48 小时培养,即得琼脂斜面菌种,为巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌的一级菌种;

B. 土著益生圆褐固氮菌琼脂斜面培养基的制备及菌种的培养:

a. 琼脂斜面培养基的制备:磷酸二氢钾 0.01-0.03%,硫酸镁 0.01-0.03%,氯化钠 0.01-0.03%,碳酸钙 0.4-0.6%,甘露醇 0.8-1.2%,硫酸钙 0.08-0.12%,琼脂 1.8-2.2%,水 80-120 毫升,加热溶解,用 1%的氢氧化钠调 pH 值 6.8-7.0,经 110-114°C,30-35 分钟蒸汽灭菌,然后在无菌条件下,分装于 15×1.5cm 干燥灭菌的试管摆成斜面待凝固后备用;

b. 土著益生圆褐固氮菌菌种的培养:取土著益生圆褐固氮菌的母种琼脂斜面菌,在无菌条件下转种于上述制备的琼脂斜面培养基上,经 28-32°C,48-32h,即得土著益生圆褐固氮菌琼脂斜面菌种,为一级菌种;

C 土著益生巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌、圆褐固氮菌液体培养基的制备及液体菌种的培养:

a. 液体培养基的制备:在 1 升新鲜豆腐废水或粉丝废水或玉米淀粉废水或洋芋淀粉废水中加入硫酸铵 1-2g,磷酸 0.5-1ml,用 1%的石灰水调 pH 7.0-7.5,分装于 500ml 三角烧瓶中,分装量为瓶子容量的 1/4,然后经 110-112°C,30-35 分钟高压灭菌,冷却后备用;

b. 分别取巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌的一级菌种,在无菌条件下,接种于液体培养液中,经 28-32°C、24-48 小时培养,其培养液为二级菌种;

c. 分别取巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌的二级菌种再扩大培养,上摇床振荡培养,经振幅 100~120r/min、温度 28~32°C、18~24 小时培养,其菌液为三级菌种;

d. 分别将重量百分比为巨大芽孢杆菌为 55~65%、胶冻样芽孢杆菌为 30~35%、圆

褐固氮菌 5~10%三级菌种再扩大培养,三种菌在同一个发酵罐,经 28-32℃、18-24 小时的通气搅拌发酵培养,其菌液为巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌混合菌剂,或为四级菌种继续逐级扩大培养,用此菌剂作为制备固体菌剂的菌种;

D. 固体菌剂的培养:

将含水比为 60-80%新鲜的豆腐渣或粉丝渣或玉米淀粉渣或洋芋淀粉,加入经 0.5-1.2% H_2SO_4 处理的玉米芯粉和麸皮、玉米面,其中玉米芯粉、麸皮、玉米面的重量比为 2~4 : 1~3 : 0.5~1,并加入相对于干料的 0.2-4%的硫酸铵,相对于干料的 0.1-3%的尿素,均匀搅拌,使其含水量达到 45-65%,用 1%的石灰水调 pH7.0-7.5,然后加入相对于干料总量为 8-12%巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌混合菌液,充分搅拌混合均匀后,在发酵和干燥两用发酵池中经温度 28~32℃通风搅拌发酵 18~24 小时后,再经 40~60℃通热风干燥,制成巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌固体菌剂。

4. 如权利要求 1 所述的土著益生微生物固体菌剂的应用,其特征在于:所述的微生物固体菌剂应用于农作物和植物生长剂或畜禽饲料添加剂。

土著益生微生物固体菌剂及其制备方法和应用

技术领域：

[0001] 本发明主要涉及微生物的发酵方法,尤其涉及利用食品行业产生的废液废渣制备巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌三菌组合的固体菌剂的方法和应用。

背景技术：

[0002] 传统的微生物菌剂的制备方法,所用原料是葡萄糖、蛋白胨、糖蜜、牛肉膏、维生素,无机盐和水配制成液体培养基,从试管斜面菌种上刮取菌苔接种在液体培养基中,经好氧或厌氧培养制备成液体菌剂或将液体菌种接种在由玉米粉、麸皮、豆面、籽饼、豆粕和米糠等原料组成的固料培养基上,发酵制备成固体菌剂。其缺点是:所用原料成本高,生产工艺复杂,不能节约能源。

[0003] 混合菌剂传统做法,是将各种不同的菌种(好氧和厌氧)在各自不同的生长环境中培养菌种,然后从每个菌种的培养物中刮取菌苔制取每个菌的液体菌悬液,再转种于各自的液体培养液经通气或厌氧发酵培养后离心制取活性细胞菌,将沉淀物喷雾干燥制成粉剂,制成多菌的混合。其缺点是:制备工艺复杂,发酵周期长,成本高,应用受到限制。

发明内容：

[0004] 本发明的目的在于避免现有微生物固体菌剂生产技术不足之处而提供一种土著益生微生物固体菌剂及其制备方法和应用。

[0005] 使用巨大芽孢杆菌与胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌科学配伍,以新鲜豆腐或粉丝或玉米或洋芋淀粉产生的废渣及农业秸秆为原料,添加少量无机盐,培养料不灭菌,三种菌在同一条件下制备巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌固体菌剂的制备方法。该方法是利用食品行业产生的废渣为原料,生产过程无“三废”污染,生产工艺简单,操作方便,节省人力,节省能源,其固体菌剂,即可用于有机废水净化剂,又可作为微生物肥料和微生物饲料添加剂。

[0006] 本发明的目的可以通过采用以下技术方案实现:一种土著益生微生物固体菌剂,其主要特点在于由巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、胶冻样芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)、圆褐固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)和固体培养基组成,其三种菌株的重量百分比为巨大芽孢杆菌为55~65%、胶冻样芽孢杆菌为30~35%、圆褐固氮菌5~10%,所述的巨大芽孢杆菌的保藏号为CGMCC 3770;所述的胶冻样芽孢杆菌的保藏号为CGMCC 3769;所述的圆褐固氮菌的保藏号为CGMCC 3768。

[0007] 所述的土著益生微生物固体菌剂,所述的固体培养基包括有重量百分比为以干料计50~80%的糟渣,15~30%的玉米芯粉,8~12%的麸皮,0.5~0.8%的玉米面,0.1~3%的尿素,0.2~4%的硫酸铵,再加入新鲜豆腐废水或粉丝废水或玉米淀粉废水或洋芋淀粉废水使其含水重量百分比为45~65%,用1%的石灰水调pH 7.0~7.5。

[0008] 一种土著益生微生物固体菌剂的制备方法,其主要特点在于包括有如下步骤:

[0009] A. 土著益生巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌琼脂斜面培养基的制备及菌种的培

养：

[0010] a. 琼脂斜面培养基的制备：麦芽汁 0.5-2%、葡萄糖 0.5-2%、蛋白胨 0.2-0.6%、琼脂粉 1-3%、无菌水 80-120ml，加热溶解后，用 1% 的氢氧化钠调 pH 值至 pH7.0-7.5，经 110-114℃，30-35 分钟蒸汽灭菌，然后在无菌条件下分装于 15×1.5cm 的干燥灭菌的试管摆成斜面待凝固后备用；

[0011] b. 菌种的培养：分别取巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌的母种琼脂斜面菌，在无菌条件下，转种于上述制备的琼脂斜面培养基上，经 28-32℃、24-48 小时培养，即得琼脂斜面菌种，为巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌的一级菌种；

[0012] B. 土著益生圆褐固氮菌琼脂斜面培养基的制备及菌种的培养：

[0013] a. 琼脂斜面培养基的制备：磷酸二氢钾 0.01-0.03%，硫酸镁 0.01-0.03%，氯化钠 0.01-0.03%，碳酸钙 0.4-0.6%，甘露醇 0.8-1.2%，硫酸钙 0.08-0.12%，琼脂 1.8-2.2%，水 80-120 毫升，加热溶解，用 1% 的氢氧化钠调 pH 值 6.8-7.0，经 110-114℃，30-35 分钟蒸汽灭菌，然后在无菌条件下，分装于 15×1.5cm 干燥灭菌的试管摆成斜面待凝固后备用；

[0014] b. 土著益生圆褐固氮菌菌种的培养：取土著益生圆褐固氮菌的母种琼脂斜面菌，在无菌条件下转种于上述制备的琼脂斜面培养基上，经 28-32℃，48-32h，即得土著益生圆褐固氮菌琼脂斜面菌种，为一级菌种；

[0015] C 土著益生巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌、圆褐固氮菌液体培养基的制备及液体菌种的培养：

[0016] a. 液体培养基的制备：在 1 升新鲜豆腐废水或粉丝废水或玉米淀粉废水或洋芋淀粉废水中加入硫酸铵 1-2g，磷酸 0.5-1ml，用 1% 的石灰水调 pH 7.0-7.5，分装于 500ml 三角烧瓶中，分装量为瓶子容量的 1/4，然后经 110-112℃，30-35 分钟高压灭菌，冷却后备用；

[0017] b. 分别取巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌的一级菌种，在无菌条件下，接种于液体培养液中，经 28-32℃、24-48 小时培养，其培养液为二级菌种；

[0018] c. 分别取巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌的二级菌种再扩大培养，上摇床振荡培养，经振幅 100 ~ 120r/min、温度 28 ~ 32℃、18 ~ 24 小时培养，其菌液为三级菌种；

[0019] d. 分别将重量百分比为巨大芽孢杆菌为 55 ~ 65%、胶冻样芽孢杆菌为 30 ~ 35%、圆褐固氮菌 5 ~ 10% 三级菌种再扩大培养，三种菌在同一个发酵罐，经 28-32℃、18-24 小时的通气搅拌发酵培养，其菌液为巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌混合菌剂，或为四级菌种继续逐级扩大培养，用此菌剂作为制备固体菌剂的菌种；

[0020] D. 固体菌剂的培养：

[0021] 将含水比为 60-80% 新鲜的豆腐渣或粉丝渣或玉米淀粉渣或洋芋淀粉，加入经 0.5-1.2% H_2SO_4 处理的玉米芯粉和麸皮、玉米面，其中玉米芯粉、麸皮、玉米面的重量比为 2 ~ 4 : 1 ~ 3 : 0.5 ~ 1，并加入相对于干料的 0.2-4% 的硫酸铵，相对于干料的 0.1-3% 的尿素，均匀搅拌，使其含水量达到 45-65%，用 1% 的石灰水调 pH 7.0-7.5，然后加入相对于干料总量为 8-12% 巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌混合菌液，充分搅拌均匀后，在发酵和干燥两用发酵池中经温度 28 ~ 32℃ 通风搅拌发酵 18 ~ 24 小时后，再经 40 ~ 60℃ 通热风干燥，制成巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌固体菌剂。

[0022] 所述的土著益生微生物固体菌剂的应用,所述的微生物固体菌剂应用于农作物和植物生长剂或畜禽饲料添加剂。

[0023] 土著益生巨大芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌、圆褐固氮菌是在暗灰钙土、淡灰钙土、红粘土和盐碱土四种不同土壤类型多种植物根区的 0-10cm、10-20cm、20-30cm 深层土壤中的 266 个样品分离培养所得的 3868 株,经筛选优育后,经紫外线和亚硝基胍 (NTG) 诱变和反复驯化培养又经生物化学、形态学鉴定获得优良菌株;2010 年 04 月 26 日,在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址是:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,保藏的土著益生巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megterium*) (LJP106) 菌种保藏号为 CGMCC 3770 土著益生胶冻样芽孢杆菌 (*Bacillus mucilaginosus*) (LJK-35) 菌种保藏号为 CGMCC 3769;土著益生圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*) (LGN-09) 菌种保藏号为 CGMCC 3768;三种菌能在同一条件下,同一发酵时间,完成各自的生长功能,起到菌种间的互补作用。圆褐固氮菌可利用空气中的氮转化成微生物生长所用的氮素、巨大芽孢杆菌和胶冻样芽孢杆菌能将有机物中生物难以利用的磷元素、钾元素转化成易吸收的营养元素、由于多菌的协同作用,明显提高了对有机废水的利用率和菌细胞数量的增加,从而产生大量的被植物和动物吸收利用的生物活性酶,生物激素和有益的生长因子。这一生物代谢过程即降解了废水中的有机物,又以废水为液体培养基制备了巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌组合的微生物菌剂。

[0024] 本发明的有益效果:本发明利用食品行业产生的废液、废渣为原料,生产过程无“三废”污染,生产工艺简单,操作方便,节省人力,节省能源,其固体菌剂,即可用于有机废水净化剂,又可作为微生物肥料和微生物饲料。

[0025] 本发明固体菌剂制备方法的特点在于其使用液态培养基,优点是:一方面是液体培养基是利用食品、饮料行业生产的废液,添加少量无机盐,调整 pH 值,因为这些废液营养丰富,适于菌种的快速生长繁殖。二是新鲜浆水或废水可以不灭菌,添加无机盐调整 pH 值后,可直接接入菌种进行液体发酵培养。这样节省了设备和能源,三是液体培养菌种,菌细胞繁殖快,菌液细胞浓度高,加入固体原料的菌量大可抵抗杂菌污染。

附图说明:

[0026] 图 1:本发明固体菌剂的制备流程图。

具体实施方式

[0027] 下面结合实施例对本发明作进一步的详细说明:

[0028] 实施例 1:一种土著益生微生物固体菌剂,其由巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、胶冻样芽孢杆菌 (*Bacillus mucilaginosus*)、圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*) 和固体培养基组成,其三种菌株的重量百分比为巨大芽孢杆菌为 55~65%、胶冻样芽孢杆菌为 30~35%、圆褐固氮菌 5~10%,所述的巨大芽孢杆菌的保藏号为 CGMCC 3770;所述的胶冻样芽孢杆菌的保藏号为 CGMCC 3769;所述的圆褐固氮菌的保藏号为 CGMCC 3768。

[0029] 所述的固体培养基包括有重量百分比为以干料计 50-80%的糟渣,15-30%的玉米芯粉,8-12%的麸皮,0.5-0.8%的玉米面,0.1-3%的尿素,0.2-4%的硫酸铵,再加入新鲜

豆腐废水或粉丝废水或玉米淀粉废水或洋芋淀粉废水使其含水重量百分比为 45-65%，用 1% 的石灰水调 pH 7.0-7.5。

[0030] 实施例 2：见图 1，一种土著益生微生物固体菌剂的制备方法，包括有如下步骤：

[0031] A. 土著益生巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌琼脂斜面培养基的制备及菌种的培养：

[0032] a. 琼脂斜面培养基的制备：麦芽汁 0.5-2%、葡萄糖 0.5-2%、蛋白胨 0.2-0.6%、琼脂粉 1-3%、无菌水 80-120ml，加热溶解后，用 1% 的氢氧化钠调 pH 值至 pH7.0-7.5，经 110-114℃，30-35 分钟蒸汽灭菌，然后在无菌条件下分装于 15×1.5cm 的干燥灭菌的试管摆成斜面待凝固后备用；

[0033] b. 菌种的培养：分别取巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌的母种琼脂斜面菌，在无菌条件下，转种于上述制备的琼脂斜面培养基上，经 28-32℃、24-48 小时培养，即得琼脂斜面菌种，为巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌的一级菌种；

[0034] B. 土著益生圆褐固氮菌琼脂斜面培养基的制备及菌种的培养：

[0035] a. 琼脂斜面培养基的制备：磷酸二氢钾 0.01-0.03%，硫酸镁 0.01-0.03%，氯化钠 0.01-0.03%，碳酸钙 0.4-0.6%，甘露醇 0.8-1.2%，硫酸钙 0.08-0.12%，琼脂 1.8-2.2%，水 80-120 毫升，加热溶解，用 1% 的氢氧化钠调 pH 值 6.8-7.0，经 110-114℃，30-35 分钟蒸汽灭菌，然后在无菌条件下，分装于 15×1.5cm 干燥灭菌的试管摆成斜面待凝固后备用；

[0036] b. 土著益生圆褐固氮菌菌种的培养：取土著益生圆褐固氮菌的母种琼脂斜面菌，在无菌条件下转种于上述制备的琼脂斜面培养基上，经 28-32℃，48-32h，即得琼脂斜面菌种，为一级菌种；

[0037] C 土著益生巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌、圆褐固氮菌液体培养基的制备及液体菌种的培养：

[0038] (1) 试管液体菌种的培养：取新鲜豆腐废水经煮沸 10 分钟自然沉淀取上清液 100ml，加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g， H_3PO_4 0.05ml，充分溶解后调节 pH 值 7.0-7.5，分装于 15×1.5cm 的干燥试管中，经 112℃，30 分钟高压灭菌，冷却至 32℃，分别接种巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌一级菌种于试管液体培养基中，经 28 ~ 32℃ 培养 24 ~ 48 小时，即为试管液体菌种（二级菌种）。

[0039] (2) 三角烧瓶液体菌种的培养：取新鲜豆腐废水经煮沸 10 分钟自然沉淀取上清液 1000ml，加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g， H_3PO_4 0.5ml，充分溶解后调节 pH 值 7.0-7.5，分装于 500ml 三角烧瓶中，分装量为瓶子总量的 1/4，然后经 112℃，30 分钟高压灭菌，冷却至 32℃，将试管液体菌种接种在液体三角烧瓶培养基中，经 28 ~ 32℃ 培养 24 ~ 48 小时，即为液体三角烧瓶菌种（三级菌种）。

[0040] (3) 液体扩大培养生产菌种：取新鲜豆腐废水经煮沸 10 分钟自然沉淀取上清液 10000ml，加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10g， H_3PO_4 5ml，充分溶解后调节 pH 值 7.0-7.5，分装于 500ml 三角烧瓶中，分装量为瓶子总量的 1/4，然后经 112℃，30 分钟高压灭菌，冷却至 32℃，将三级菌种接种在液体三角烧瓶培养基中，上摇床振荡培养，振幅为 100 ~ 120r/min，经温度 28 ~ 32℃ 培养 18 ~ 24 小时发酵培养，其培养液为四级菌种。

[0041] (4) 取四级菌种再扩大培养，上发酵罐，所用新鲜豆腐废水不灭菌，将重量百分比

为 55% 的巨大芽孢杆菌、35% 的胶冻样芽孢杆菌和 10% 的圆褐固氮菌三菌培养液接入后，经 28 ~ 32℃ 培养 18 ~ 24 小时，通气搅拌发酵培养，其发酵液即为巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌液体菌剂，活细胞数为 $1.0 \sim 2.0 \times 10^{10}$ 个 /ml；

[0042] (5) 根据需要可逐级扩大产量。

[0043] D. 固体菌剂的培养：

[0044] 取含水分 65% 的新鲜豆腐渣 2000kg，加入经 0.5% H_2SO_4 处理的玉米芯粉和麸皮、玉米面，其中玉米芯粉、麸皮、玉米面的重量比为 2 : 1 : 0.5，并加入相对于干物质硫酸铵为 4%、尿素 3%，充分混合后调固体发酵含水分 45%，用 1% 的石灰水调节 pH 值 7.0-7.5，然后加入相对于干料总量为 10% 的液体菌剂，充分搅拌混合均匀后，在发酵和低温干燥两用发酵池中经温度 28 ~ 32℃ 通风搅拌发酵 18 ~ 24 小时后，再经 40 ~ 60℃ 通热风干燥，制成巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌固体菌剂。该巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌固体菌剂活细胞数为 1.1×10^{10} 个 / 克。

[0045] 实施例 3：见图 1，一种土著益生微生物固体菌剂的制备方法，包括有如下步骤：

[0046] A. 土著益生巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌琼脂斜面培养基的一级菌种制备及菌种的培养：同实施例 2。

[0047] B. 所述土著益生圆褐固氮菌一级菌种制备及菌种的培养：同实施例 2。

[0048] C 土著益生巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌、圆褐固氮菌液体培养基的制备及液体菌种的培养：

[0049] (1) 试管液体菌种的培养，取新鲜粉丝废水 100ml，加入 $(NH_4)_2SO_4$ 0.1g， H_3PO_4 0.05ml，充分溶解后调节 pH 值 7.0-7.5，分装于 15×1.2cm 的干燥试管中，经 112℃，30 分钟高压灭菌，冷却至 32℃，分别接种巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌于试管液体培养基中，经 28 ~ 32℃ 培养 24 ~ 48 小时，即为试管液体菌种（二级菌种）。

[0050] (2) 三角烧瓶液体菌种的培养：取新鲜粉丝废水 1000ml，加入 $(NH_4)_2SO_4$ 1g， H_3PO_4 0.5ml，充分溶解后调节 pH 值 7.0-7.5，分装于 500ml 三角烧瓶中，分装量为瓶子总量的 1/4，然后经 112℃，30 分钟高压灭菌，冷却至 32℃，将试管液体菌种接种在液体三角烧瓶培养基中，经 28 ~ 32℃ 培养 24 ~ 48 小时，即为液体三角烧瓶菌种（三级菌种）。

[0051] (3) 液体扩大培养生产菌种：取新鲜粉丝废水 10000ml，加入 $(NH_4)_2SO_4$ 10g， H_3PO_4 5ml，充分溶解后调节 pH 值 7.0-7.5，分装于 500ml 三角烧瓶中，分装量为瓶子总量的 1/4，然后经 112℃，30 分钟高压灭菌，冷却至 32℃，将二级菌种接种在液体三角烧瓶培养基中，上摇床振荡培养，振幅为 100 ~ 120r/min，经温度 28 ~ 32℃ 培养 18 ~ 24 小时发酵培养，其培养液为四级菌种。

[0052] (4) 取四级菌种再扩大培养，上发酵罐，所用新鲜粉丝废水不灭菌，将重量百分比为 65% 的巨大芽孢杆菌、30% 的胶冻样芽孢杆菌和 5% 的圆褐固氮菌三菌培养液接入后，经 28 ~ 32℃ 培养 18 ~ 24 小时，通气搅拌发酵培养，其成熟的发酵液即为巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌液体菌剂。活细胞数为 $0.8 \sim 1.8 \times 10^{10}$ 个 /ml；

[0053] (5) 根据需要可逐级扩大产量；

[0054] D. 固体菌剂的培养：取含水分 70% 的新鲜蚕豆粉丝渣 2000kg，加入经 0.75% H_2SO_4 处理的玉米芯粉和麸皮、玉米面，其中玉米芯粉、麸皮、玉米面的重量比为 3 : 2 : 1，并加入相对于干物质硫酸铵为 3%、尿素 2%，调固体发酵含水分 50%，充分混合均匀后用

1%的石灰水调节 pH 值 7.0-7.5, 然后加入相对于干料总量为 11%的液体菌剂, 充分搅拌均匀后, 在发酵和低温干燥两用发酵池中经温度 28 ~ 32℃通风搅拌发酵 18 ~ 24 小时后, 再经 40 ~ 60℃通热风干燥, 制成巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌固体菌剂, 该巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌固体菌剂活细胞数为 1.0×10^{10} 个/克。

[0055] 实施例 4: 见图 1, 一种土著益生微生物固体菌剂的制备方法, 包括有如下步骤:

[0056] A. 土著益生巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌琼脂斜面培养基的一级菌种制备及菌种的培养: 同实施例 2。

[0057] B. 所述土著益生圆褐固氮菌一级菌种制备及菌种的培养: 同实施例 2。

[0058] C 土著益生巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌、圆褐固氮菌液体培养基的制备及液体菌种的培养:

[0059] (1) 试管液体菌种的培养, 取新鲜玉米淀粉废水, 经煮沸 10 分钟自然沉淀取上清液 100ml, 加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g, H_3PO_4 0.05ml, 充分溶解后调节 pH 值 7.0-7.5, 分装于 $15 \times 1.2\text{cm}$ 的干燥试管中, 经 112℃, 30 分钟高压灭菌, 冷却至 32℃, 分别接种巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌于试管液体培养基中, 经 28 ~ 32℃培养 24 ~ 48 小时, 即为试管液体菌种 (二级菌种)

[0060] (2) 三角烧瓶液体菌种的培养: 取新鲜玉米淀粉废水, 经煮沸 10 分钟自然沉淀取上清液 1000ml, 加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g, H_3PO_4 0.5ml, 充分溶解后调节 pH 值 7.0-7.5, 分装于 500ml 三角烧瓶中, 分装量为瓶子总量的 1/4, 然后经 112℃, 30 分钟高压灭菌, 冷却至 32℃, 将试管液体菌种接种在液体三角烧瓶培养基中, 经 28 ~ 32℃培养 24 ~ 48 小时, 即为液体三角烧瓶菌种 (三级菌种)

[0061] (3) 液体扩大培养生产菌种:

[0062] 取新鲜玉米淀粉废水, 经煮沸 10 分钟自然沉淀取上清液 10000ml, 加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10g, H_3PO_4 5ml, 充分溶解后调节 pH 值 7.0-7.5, 分装于 500ml 三角烧瓶中, 分装量为瓶子总量的 1/4, 然后经 112℃, 30 分钟高压灭菌, 冷却至 32℃, 将二级菌种接种在液体三角烧瓶培养基中, 上摇床振荡培养, 振幅为 100 ~ 120r/min, 经温度 28 ~ 32℃培养 18 ~ 24 小时发酵培养, 其培养液为四级菌种。

[0063] (4) 取四级菌种再扩大培养, 上发酵罐, 所用新鲜粉丝废水不灭菌, 将重量百分比为 60%的巨大芽孢杆菌、32%的胶冻样芽孢杆菌和 8%的圆褐固氮菌三菌培养液接入后, 经 28 ~ 32℃培养 18 ~ 24 小时, 通气搅拌发酵培养, 其成熟的发酵液即为巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌液体菌剂, 活细胞数为 $1.2 \sim 2.2 \times 10^{10}$ 个/ml;

[0064] (5) 根据需要可逐级扩大产量。

[0065] D. 固体菌剂的培养: 取含水分 75%的新鲜玉米淀粉渣 2000kg, 加入经 1% H_2SO_4 处理的玉米芯粉和麸皮、玉米面, 其中玉米芯粉、麸皮、玉米面的重量比为 4 : 3 : 1, 并加入相对于干物质硫酸铵为 4%、尿素 2%, 调固体发酵含水分 55%, 充分混合均匀后用 1%的石灰水调节 pH 值 7.0-7.5, 然后加入相对于干料总量为 12%的液体菌剂, 充分搅拌均匀后, 在发酵和低温干燥两用发酵池中经温度 28 ~ 32℃通风搅拌发酵 18 ~ 24 小时后, 再经 40 ~ 60℃通热风干燥, 制成巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌固体菌剂, 该巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌固体菌剂活细胞数为 1.2×10^{10} 个/克。

[0066] 实施例 5: 见图 1, 一种土著益生微生物固体菌剂的制备方法, 包括有如下步骤:

[0067] A. 土著益生巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌琼脂斜面培养基的一级菌种制备及菌种的培养:同实施例 2。

[0068] B. 所述土著益生圆褐固氮菌一级菌种制备及菌种的培养:同实施例 2。

[0069] C 土著益生巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌、圆褐固氮菌液体培养基的制备及液体菌种的培养:

[0070] (1) 试管液体菌种的培养,取新鲜洋芋淀粉废水,经煮沸 10 分钟自然沉淀取上清液 100ml,加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g, H_3PO_4 0.05ml,充分溶解后调节 pH 值 7.0-7.5,分装于 $15 \times 1.2\text{cm}$ 的干燥试管中,经 112°C ,30 分钟高压灭菌,冷却至 32°C ,分别接种巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌于试管液体培养基中,经 $28 \sim 32^\circ\text{C}$ 培养 24 ~ 48 小时,即为试管液体菌种(二级菌种)。

[0071] (2) 三角烧瓶液体菌种的培养:取新鲜洋芋淀粉废水,经煮沸 10 分钟自然沉淀取上清液 1000ml,加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g, H_3PO_4 0.5ml,充分溶解后调节 pH 值 7.0-7.5,分装于 500ml 三角烧瓶中,分装量为瓶子总量的 1/4,然后经 112°C ,30 分钟高压灭菌,冷却至 32°C ,将试管液体菌种接种在液体三角烧瓶培养基中,经 $28 \sim 32^\circ\text{C}$ 培养 24 ~ 48 小时,即为液体三角烧瓶菌种(三级菌种)

[0072] (3) 液体扩大培养生产菌种:取新鲜洋芋淀粉废水,经煮沸 10 分钟自然沉淀取上清液 10000ml,加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10g, H_3PO_4 5ml,充分溶解后调节 pH 值 7.0-7.5,分装于 500ml 三角烧瓶中,分装量为瓶子总量的 1/4,然后经 112°C ,30 分钟高压灭菌,冷却至 32°C ,将三级菌种接种在液体三角烧瓶培养基中,上摇床振荡培养,振幅为 $100 \sim 120\text{r}/\text{min}$,经温度 $28 \sim 32^\circ\text{C}$ 培养 18 ~ 24 小时发酵培养,其培养液为四级菌种。

[0073] (4) 取四级菌种再扩大培养,上发酵罐,所用新鲜粉丝废水不灭菌,将重量百分比为 60% 的巨大芽孢杆菌、35% 的胶冻样芽孢杆菌和 5% 的圆褐固氮菌三菌培养液接入后,经 $28 \sim 32^\circ\text{C}$ 培养 18 ~ 24 小时,通气搅拌发酵培养,其成熟的发酵液即为巨大芽孢杆菌、胶冻样芽孢杆菌和圆褐固氮菌液体菌剂,活细胞数为 $1.2 \sim 2.2 \times 10^{10}$ 个/ml;

[0074] (5) 根据需要可逐级扩大产量。

[0075] D. 固体菌剂的培养:取含水分 60% 的新鲜洋芋渣 2000kg,加入经 1.2% H_2SO_4 处理的玉米芯粉和麸皮、玉米面,其中玉米芯粉、麸皮、玉米面的重量比为 4:3:1,并加入相对于干物质硫酸铵为 4%、尿素 3%,调固体发酵含水分 50%,充分混合均匀后用 1% 的石灰水调节 pH 值 7.0-7.5,然后加入相对于干料总量为 12% 的液体菌剂,充分搅拌混合均匀后,在发酵和低温干燥两用发酵池中经温度 $28 \sim 32^\circ\text{C}$ 通风搅拌发酵 18 ~ 24 小时后,再经 $40 \sim 60^\circ\text{C}$ 通热风干燥,制成固体菌剂,该固体菌剂活细胞数为 1.3×10^{10} 个/克。

[0076] 实施例 6:所述的土著益生微生物固体菌剂的应用,所述的微生物固体菌剂应用于农作物和植物生长剂或畜禽饲料添加剂。

[0077] 本发明固体菌剂在以灰钙土和盐碱土为试验土壤的试验效果:

[0078] 用苜蓿种籽做盆栽试验,经三次重复其结果见表 1、表 2、表 3、表 4 和表 5:

[0079] 表 1

[0080]

项目	试验处理
试验组	生长期施用本发明菌剂
对照组	生长期不施用菌剂

[0081] 表 2 灰钙土盆栽生长期观察

[0082]

项目	出苗时间 (d)	出苗率 (%)	三叶期 (d)	苗高 (cm)
试验组	3	94	18	6.2
对照组	4	84	21	4.5

[0083] 试验组与对照组不论出苗时间、出苗率、三叶期、苗高均有显著提高。

[0084] 表 3 盐碱土盆栽生长期观察

[0085]

项目	出苗时间 (d)	出苗率 (%)	三叶期 (d)	苗高 (cm)
试验组	4	66	20	3.2
对照组	6	20	25	2.5

[0086] 试验组与对照组不论出苗时间、出苗率、三叶期、苗高均有显著提高。

[0087] 表 4 灰钙土盆栽苜蓿根系观察

[0088]

项目	根系长度 (cm)	根系数 (根)	体积 (cm ³)	鲜重 (Kg)
试验组	7.9	7	0.00002	0.01314
对照组	4.8	4	0.00001	0.00726

[0089] 试验组与对照组不论根系长度、根系数、体积、鲜重均有显著差异。

[0090] 表 5 盐碱土盆栽苜蓿根系观察

[0091]

项目	根系长度 (cm)	根系数 (根)	体积 (cm ³)	鲜重 (Kg)
试验组	4.2	7	0.000008	0.00811
对照组	3.2	4	0.000006	0.00521

[0092] 试验组与对照组不论根系长度、根系数、体积、鲜重均有显著差异。

[0093] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,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、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

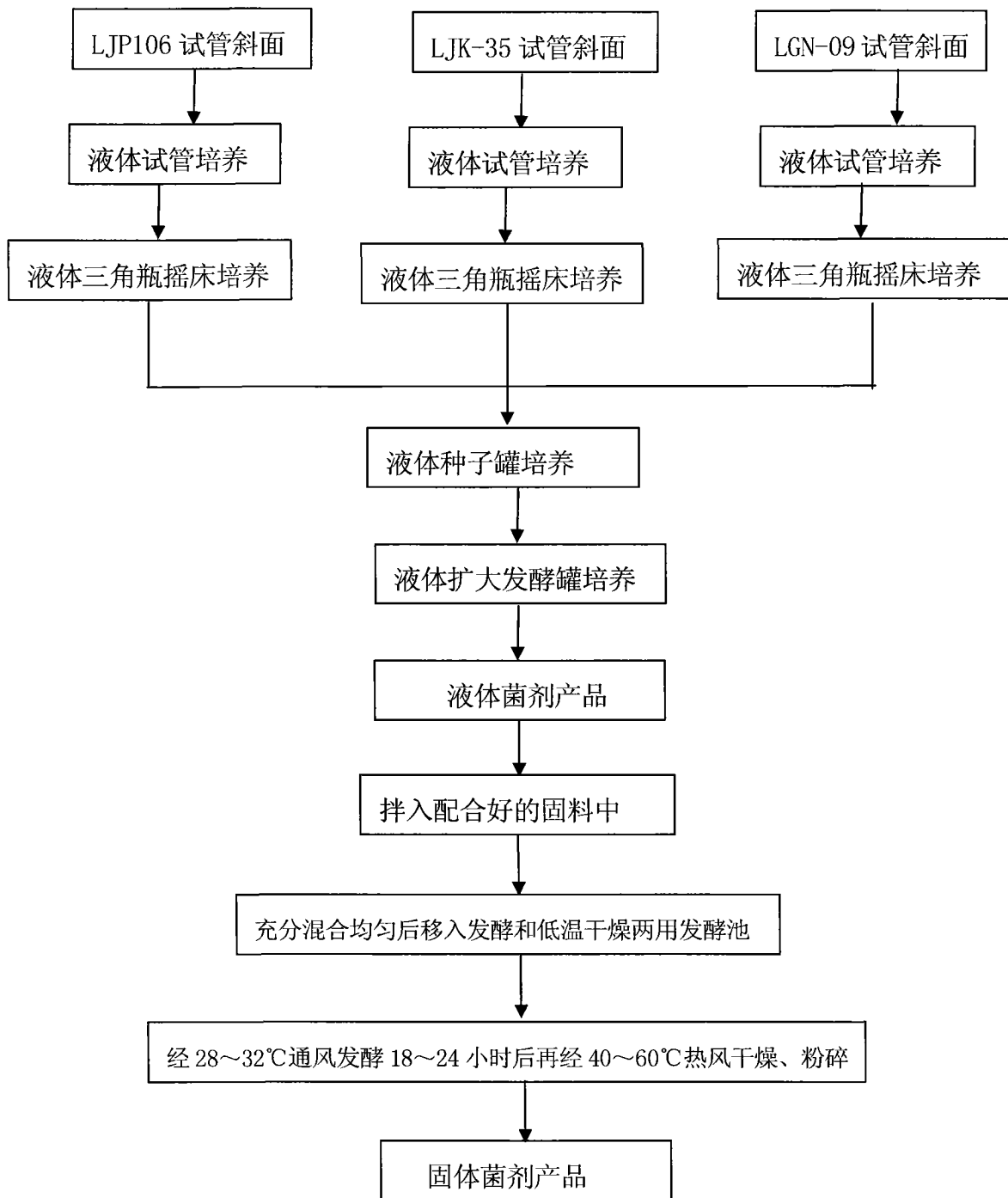


图 1