



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106167771 B

(45)授权公告日 2020.01.17

(21)申请号 201610336831.5

(22)申请日 2016.05.20

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106167771 A

(43)申请公布日 2016.11.30

(83)生物保藏信息  
CCTCC 2015751 2015.12.15

(73)专利权人 东莞市保得生物工程有限公司  
地址 523000 广东省东莞市常平镇黄泥塘  
工业大道一号东莞市保得生物工程有  
限公司

(72)发明人 张学贤 林敏 杨国平 孙旭生  
王亚君 杨盼盼 尹坤 沈世华  
谭志远 燕永亮

(74)专利代理机构 东莞市华南专利商标事务所  
有限公司 44215

代理人 詹晓云

(51)Int.Cl.  
C12N 1/20(2006.01)  
C12R 1/11(2006.01)

(56)对比文件  
CN 102747018 A,2012.10.24,  
CN 101914468 A,2010.12.15,  
刘晓璐.烟草根际固氮菌的筛选、鉴定及优  
化培养.《中国烟草学报》.2015,(第01期),全文.

审查员 孙谦

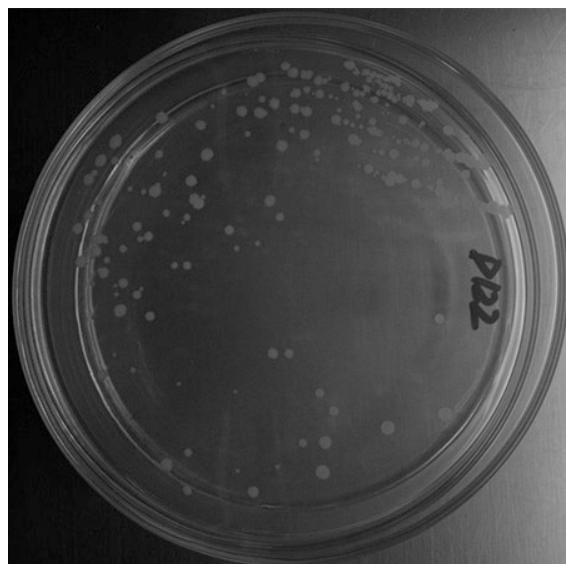
权利要求书1页 说明书9页  
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种巨大芽孢杆菌D122及其菌剂和菌剂制  
备方法

(57)摘要

本发明涉及微生物菌剂技术领域,具体涉及  
一种巨大芽孢杆菌D122及其菌剂和菌剂制备方  
法,所述巨大芽孢杆菌D122保藏于中国典型培养  
物保藏中心,保藏号为CCTCCM 2015751。所述菌  
剂制备方法,包括以下步骤:(1)分离、筛选;(2)  
纯化、保存;(3)培养基培养;(4)D122菌剂制备,  
得到巨大芽孢杆菌D122菌剂。该巨大芽孢杆菌  
D122,其具有固氮酶活性和分泌生长素吲哚乙酸  
的功能。



1. 一种巨大芽孢杆菌D122,其特征在于:所述巨大芽孢杆菌D122保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为CCTCCM 2015751。

2. 根据权利要求1所述的一种巨大芽孢杆菌D122,其特征在于:所述巨大芽孢杆菌D122具有序列表NO.1的DNA序列。

3. 根据权利要求1所述的一种巨大芽孢杆菌D122,其特征在于:所述巨大芽孢杆菌D122的固氮酶活性为500-600nmol/(mL·h),其在生长代谢过程中可以产生吲哚乙酸,吲哚乙酸的分泌量为100-200mg/L。

## 一种巨大芽孢杆菌D122及其菌剂和菌剂制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物菌剂技术领域,具体涉及一种巨大芽孢杆菌D122及其菌剂和菌剂制备方法。

### 背景技术

[0002] 农业生产长期依赖化学肥料,不仅大量浪费不可再生资源,还导致土质变差、农产品品质下降和环境污染等问题,极大影响了人类的健康生存。

[0003] 巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)是一种解磷促钾固氮细菌,能够很好的降解土壤中不能被植物利用的磷、钾,提高土壤肥力,同时固定空气中的氮气,促进作物增产。但是,我国微生物肥料行业生产的产品表现出很多问题,例如有效活菌数低,杂菌率较高,有效期不长等,严重影响了农民使用的积极性和市场的开拓。国内对巨大芽孢杆菌在微生物肥料上的研究主要集中在菌株选育、解磷效果、发酵条件优化及与解钾菌相互作用等方面,而对巨大芽孢杆菌菌剂保护剂的研究却不多见。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是针对现有技术中的上述不足,提供一种巨大芽孢杆菌D122,其具有固氮酶活性和分泌生长素吲哚乙酸的功能。

[0005] 本发明的另一目的是针对现有技术中的上述不足,提供一种巨大芽孢杆菌D122菌剂,具有较高的固氮酶活性且能分泌生长素,农业应用范围广,经济效益高。

[0006] 本发明的另一目的是针对现有技术中的上述不足,提供一种巨大芽孢杆菌D122菌剂制备方法,工艺简单成熟,可规模化生产。

[0007] 本发明的目的通过以下技术方案实现。

[0008] 一种巨大芽孢杆菌D122,所述巨大芽孢杆菌D122 *Bacillus megaterium* D122保藏于中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Collection),地址为中国武汉大学,分类命名为巨大芽孢杆菌D122 *Bacillus megaterium* D122,保藏日期为2015年12月15日,保藏编号为CCTCC NO: M2015751。

[0009] 所述巨大芽孢杆菌D122具有序列NO.1的DNA序列。

[0010] 所述巨大芽孢杆菌D122的固氮酶活性为500-600 nmol/(mL·h),其在生长代谢过程中可以产生吲哚乙酸,吲哚乙酸的分泌量为100-200 mg/L。

[0011] 固氮酶活性测定

[0012] 1、试验方法

[0013] 采用乙炔还原法对各菌株的固氮酶活性进行测定。将保存的各菌株用VM-Ethanol固体培养基活化,用接种环挑取1环菌体于1.5mL的无菌离心管中,用无菌水稀释,按相同接种量接入装有5 mL半固体培养基的10 mL试管中,用反口橡胶塞密封。37℃培养24 h后,注入1/10体积的10%乙炔气体,继续培养24 h,从试管中抽取0.5 mL气体注入气相色谱仪(北京天普分析仪器厂SP-2100)中,测定乙炔、乙烯的含量。按下列公式计算固氮酶活性大小

(北京农业大学微生物专业编,1986):

$$[0014] \quad C = (h_x \times c \times V) / (24.9 \times h_s \times t) \quad (2.1)$$

[0015] 其中,  $h_x$  为样品峰面积值;  $h_s$  为标准  $C_2H_4$  峰面积值;  $c$  为标准  $C_2H_4$  浓度 (nmol/mL);

[0016]  $V$  为培养容器体积 (mL);  $t$  为样品培养时间 (h);  $C$  为产生的  $C_2H_4$  浓度 [nmol/(mL·h)]。

[0017] 2、试验结果

[0018] 结合公式 (2.1) 和固氮酶活性测定图4得知,固氮酶活性为500–600 nmol/(mL·h)。由此可以说明,巨大芽孢杆菌D122在代谢过程中可以产生特定的固氮酶,可以自生固定大气中的氮气。

[0019] 生长素定性含量测定

[0020] (1)挑取菌株分别接种 ( $OD_{600}=1.0, 0.5$  mL菌悬液)到盛有50mL King液体培养基的250mL三角瓶中,每组3个重复。

[0021] (2)接种完毕后,将三角瓶置于摇床上,28℃,125rpm,培养3d,待测。

[0022] (3)将上述在King液体培养基上生长3d的菌悬液50μL置于透明离心管中,同时加50μL比色液。

[0023] (4)设阳性对照和阴性对照,阳性对照中加入50μL浓度为10mg/L的植物生长激素 (IAA),同时加50μL比色液。阴性对照中加50μL King液体培养基,同时加50μL比色液。

[0024] (5)将阳性对照液、阴性对照液和测定液置于白陶瓷板并置于室温下15min,观察其颜色变化,颜色变红者为阳性,表示能够分泌IAA,且颜色越深表示分泌IAA的能力越强;若不变色则为阴性,表示该菌株不能分泌IAA,由此作为判断依据进行判断分析。

[0025] 培养基及试剂配方为:King培养基 (1L):蛋白胨20g,  $K_2HPO_4$  1.725g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5g,丙三醇 15mL,色氨酸0.1g,蒸馏水1000mL。

[0026] 生长素定量测定

[0027] 参照 Riberio 等的方法略加改动。菌株D122接种到含有1 g/L色氨酸的LB液体培养基中,30℃,180 r/min,振荡培养 48 h。将培养液10000 r/min离心 5 min,取100 mL上清液加到 96孔板中,与 100mL Salkowski's 试剂(1 mL 0.5 mol/L  $FeCl_3$ 和 49 mL 35%高氯酸)混匀,室温静置 30 min,在波长 530 nm下用酶标仪测定吸光度。用不同浓度的IAA标准品制作标准曲线,测定结果见表1。

[0028] 表1 菌株D122 IAA测定结果

菌株	D141	D52	D87	D122
IAA浓度 (mg/L)	485.68	364.20	294.16	158.36

[0029] 从表1和图5可以看出,巨大芽孢杆菌D122的生长素浓度为158.36 mg/L,因此,可以判断巨大草芽孢杆菌D122在生长代谢过程中可以产生IAA,具有促进作物生长的功能。

[0030] 一种巨大芽孢杆菌D122的菌剂制备方法,包括以下步骤:

[0031] (1)分离、筛选

[0032] 选取含有巨大芽孢杆菌D122的固氮菌菌落的土样,经分离筛选培养基培养得到固氮菌菌落;

[0033] (2)纯化、保存

[0034] 在纯化保存培养基上将分离、筛选获得的固氮菌菌落进行划线纯化,培养分离得

到巨大芽孢杆菌D122单菌落,保存该单菌落备用;巨大芽孢杆菌D122单菌落如图1所示。

[0035] 具体地,在纯化保存培养基上将分离、筛选获得的菌落进行划线纯化,30℃恒温培养36-48小时分离得到巨大芽孢杆菌D122单菌落,将平板上出现的单菌落保存在试管中,30℃恒温培养36-48小时,置于2-5℃冰箱中保存,优选地置于4℃冰箱中保存。

[0036] (3)培养基培养

[0037] 将活化好的巨大芽孢杆菌D122斜面接种于灭菌的液体培养基中,振荡培养,得到微生物液体发酵液;

[0038] (4)D122菌剂制备

[0039] 以氯化钠、乙酸钠和水的混合液作为液体保护剂,加入到已培养好的液体发酵液中混匀,放置24h测定初始菌数为2.0-4.0亿/mL,得到巨大芽孢杆菌D122液体菌剂。

[0040] 液体保护剂的筛选实验

[0041] 在实验基础上,选择蔗糖、氯化钠、糖蜜、乙酸钠作为液体保护剂的筛选对象。按一定比例加入到已培养好的液体发酵液中混匀,调水分,放置24h测定初始菌数。阴凉处放置30d,再次测定活菌数,以未添加保护剂的处理为对照(CK)。设7个处理,每处理3次重复,见表2。

[0042] 表2 保护剂的筛选(单位:占发酵液体积比/%)

	蔗糖	氯化钠	糖蜜	乙酸钠
处理1	10	7		
处理2	10		3	
处理3	10			1.5
处理4		7	3	
处理5		7		1.5
处理6			3	1.5
CK	0	0	0	0

[0043] 添加保护剂对微生物菌剂有效活菌数及保存期的影响:将选定的保护剂按一定比例加入到已制备的菌剂D122中,密封室温保存。放置24h测定初始菌数,每隔1-2个月测活菌数,同时以未加保护剂的处理为对照(CK)。

[0044] 菌剂保护剂筛选结果:根据添加不同的保护剂对微生物菌剂有效活菌数及保存期的影响结果,确定最佳菌剂保护剂配方为7%氯化钠+1.5%乙酸钠。

[0045] 所述步骤(4)中氯化钠的质量浓度为6-8%,乙酸钠的质量浓度为1-2%。

[0046] 所述步骤(1)分离、筛选的具体方法为:选取土样,加入含吐温80的无菌水,震荡,静置,取上清液离心,弃上清液,保留沉淀物,加入含吐温80的无菌水悬浮,离心,去沉淀,将上清液离心,弃上清液,保留沉淀物,将沉淀物用磷酸缓冲液悬浮,得到样品液;取上述样品液与磷酸缓冲液悬浮混合,得到稀释菌悬液;将稀释的菌悬液水浴加热,自然冷却后吸取涂布于无氮培养基,培养获得固氮菌菌落。

[0047] 更具体地,分离、筛选的方法为:

[0048] 从广东省东莞市常平镇黄泥塘农场采取500 g 土样,加入3 L含0.01%吐温80的无菌水,震荡10min,静置半个小时,取上清液于20℃下4820rpm离心20min。弃上清液,保留沉淀物,加入30-50 mL含0.01%吐温80的无菌水悬浮,液体于20℃下5000 rpm离心5s,去沉淀,

将上清液倒入一个干无菌离心管中于20℃下6000 rpm离心10min,弃上清液,保留沉淀物,将沉淀物用10 mL的pH 7.0磷酸缓冲液悬浮,得到样品液;取1 mL上述样品液与9 mL磷酸缓冲液悬浮混合,即为10倍稀释菌悬液。将稀释的菌悬液置于75℃水浴加热15 min,自然冷却后吸取100μL涂布于无氮培养基,30℃培养36-48小时获得含巨大芽孢杆菌D122菌的固氮菌菌落。

[0049] 所述步骤(1)中,分离筛选培养基由以下质量的原料制成:CaCO<sub>3</sub> 1.0-1.4g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6-1.2g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0-2.0g, NaCl 0.1-0.4g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001-0.005g, NaMO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.05-0.1g, 蔗糖5-10g, 琼脂18-20g, 蒸馏水1000ml, 该分离筛选培养基的pH为7.1-7.4。本发明的分离筛选培养基属于改良无氮培养基。

[0050] 所述纯化保存的具体方法为:在纯化保存培养基上将分离、筛选获得的菌落进行划线纯化,30℃恒温培养36-48小时分离得到枯草芽孢杆菌D122单菌落。将平板上出现的单菌落保存在试管中,30℃恒温培养36-48小时,置于4℃冰箱中保存。巨大芽孢杆菌D122保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号码为:CCTCCM 2015751。

[0051] (2)纯化保存培养基的配方为:牛肉膏3.0 g,蛋白胨10.0 g,氯化钠5.0 g,琼脂18.0 g,蒸馏水1000ml,纯化保存培养基的pH为7.0-7.4。

[0052] 所述步骤(3)培养基培养中,培养基由以下质量的原料制成:CaCO<sub>3</sub> 1.0-1.4g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6-1.2g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0-2.0g, NaCl 0.1-0.4g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001-0.005g, NaMO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.05-0.1g, 蔗糖5-10g, 琼脂18-20g, 蒸馏水1000ml, 培养基的pH为7.1-7.4。

[0053] 所述步骤(2)和步骤(3)之间还包括有以下步骤:

[0054] (S1)革兰氏染色:将纯化后的单菌落进行革兰氏染色,筛选得到阳性菌;

[0055] (S2)芽孢染色:将阳性菌进行芽孢染色,筛选得到含有芽孢的革兰氏阳性菌单菌落。

[0056] 芽孢染色及其革兰氏染色

[0057] 革兰氏染色和芽孢染色是两种细菌鉴定的常规方法,染色可以缩小鉴定范围。未经染色的细菌与周围环境折光率差别甚小,在显微镜下极难观察。革兰氏染色后细菌与环境形成鲜明对比,可以清楚地观察到细菌的形态、排列及某些菌种属于革兰氏阳性(G<sup>+</sup>)或者革兰氏阴性菌(G<sup>-</sup>),用以分类鉴定。革兰氏阴性菌普遍存在安全隐患,在农业微生物应用过程中直接高温灭菌后舍弃结构特征。芽孢染色将菌体内的芽孢进行染色,可以直观观察芽孢的大小、位置、形状等特点,进一步缩小其鉴定范围。芽孢杆菌具有保质期长,易于存放的特点,在农业微生物产品具有广泛的应用基础。

[0058] 1、革兰氏染色

[0059] (1)涂片:在无菌操作台中,取一块载玻片,在火焰灯上方略烤,去除玻片上的杂质。在载玻片中央滴一滴无菌水,挑取单个菌落于水滴中,用灼烧过的接种环涂抹均匀。将样品载玻片在火灯上方来回过3次,以固定细胞。

[0060] (2)初染:滴加2-5滴草酸铵结晶紫染液,染1min,倾去染液,流水冲洗至无紫色。

[0061] (3)媒染:先用新配的碘液(碘 1.0g、碘化钾 2.0g、蒸馏水 300.0mL)冲去残水,再用碘液覆盖涂面1min,后水洗。

[0062] (4)脱色:除去残水后,滴加95%酒精进行脱色约15-20秒后,立即用流水冲洗。

[0063] (5)复染:滴加1滴番红染色液,染3-5min,水洗后用吸水纸吸干。

[0064] (6) 镜检:将载玻片置于光学显微镜下观察染色结果。

[0065] 2、芽孢染色

[0066] 在无菌操作台中,取一块载玻片,在火焰灯上方略烤,去除玻片上的杂质。在载玻片中央滴一滴无菌水,挑取单个菌落水滴中,用灼烧过的接种环涂抹均匀。将样品载玻片在火灯上方来回过3次,以固定细胞。在涂布菌体的区域滴加1-2滴石碳酸碱性复红染液,染色3min。用蒸馏水冲洗掉染液,风干后,将载玻片置于光学显微镜下观察。

[0067] 如图2和图3所示,通过革兰氏染色和芽孢染色结果可以看出,巨大芽孢杆菌D122为革兰氏阳性菌,杆状,含有芽孢。

[0068] 一种巨大芽孢杆菌D122的菌剂,由所述的一种巨大芽孢杆菌D122的菌剂制备方法制备而成。

[0069] 本发明的有益效果:

[0070] (1) 本发明以巨大芽孢杆菌D122为出发菌株,对其固氮酶活性以及分泌生长素能力进行测定,发现菌株D122具有高效的固氮酶活性和分泌IAA能力。所述巨大芽孢杆菌D122的固氮酶活性为500-600 nmol/(mL·h),其在生长代谢过程中可以产生吲哚乙酸,吲哚乙酸的分泌量为100-200mg/L。

[0071] (2) 为了提高巨大芽孢杆菌D122菌剂的芽孢存活率,本发明加入了特定保护剂,降低芽孢在加工及储藏过程中的死亡率,有效地降低产品的成本,提高经济效益,为以后微生物肥料的生产提供指导。

[0072] (3) 本发明所涉及巨大芽孢杆菌D122菌剂制备方法中添加一定比例的保护剂,能使菌种存活率维持在较高的水平,能够有效延长微生物肥料产品的贮存稳定性及产品的货架寿命。

## 附图说明

[0073] 利用附图对发明作进一步说明,但附图中的实施例不构成对本发明的任何限制,对于本领域的普通技术人员,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据以下附图获得其它的附图。

[0074] 图1为分离得到的巨大芽孢杆菌D122单菌落在显微镜下放大10×100倍的菌落图。

[0075] 图2为巨大芽孢杆菌D122革兰氏染色结果图。

[0076] 图3为巨大芽孢杆菌D122芽孢染色结果图。

[0077] 图4为巨大芽孢杆菌D122固氮酶活性测定结果图。

[0078] 图5为巨大芽孢杆菌D122 IAA比色效果图。

## 具体实施方式

[0079] 结合以下实施例对本发明作进一步描述。

[0080] 实施例1

[0081] 本实施例的一种巨大芽孢杆菌D122,所述巨大芽孢杆菌D122保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为CCTCCM 2015751。所述巨大芽孢杆菌D122具有序列表NO.1的DNA序列。

[0082] 所述巨大芽孢杆菌D122的固氮酶活性为500 nmol/(mL·h),其在生长代谢过程中

可以产生吡啶乙酸,吡啶乙酸的分泌量为100mg/L。

[0083] 一种巨大芽孢杆菌D122的菌剂制备方法,包括以下步骤:

[0084] (1)分离、筛选

[0085] 选取含有巨大芽孢杆菌D122的固氮菌菌落的土样,经分离筛选培养基培养得到固氮菌菌落;

[0086] (2)纯化、保存

[0087] 在纯化保存培养基上将分离、筛选获得的固氮菌菌落进行纯化,培养分离得到巨大芽孢杆菌D122单菌落,保存该单菌落备用;

[0088] (3)培养基培养

[0089] 将活化好的巨大芽孢杆菌D122斜面接种于灭菌的液体培养基中,振荡培养,得到微生物液体发酵液;

[0090] (4)D122菌剂制备

[0091] 以氯化钠、乙酸钠和水的混合液作为液体保护剂,按一定比例加入到已培养好的液体发酵液中混匀,放置,测定初始菌数为2.0亿/mL,得到巨大芽孢杆菌D122菌剂。

[0092] 所述步骤(4)中氯化钠的质量浓度为6%,乙酸钠的质量浓度为1%。

[0093] 所述步骤(1)分离、筛选的具体方法为:选取土样,加入含吐温80的无菌水,震荡,静置,取上清液离心,弃上清液,保留沉淀物,加入含吐温80的无菌水悬浮,离心,去沉淀,将上清液离心,弃上清液,保留沉淀物,将沉淀物用磷酸缓冲液悬浮,得到样品液;取上述样品液与磷酸缓冲液悬浮混合,得到稀释菌悬液;将稀释的菌悬液水浴加热,自然冷却后吸取涂布于无氮培养基,培养获得固氮菌菌落。

[0094] 所述步骤(1)中,分离筛选培养基由以下质量的原料制成:CaCO<sub>3</sub> 1.0g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g, NaCl 0.1g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001g, NaM<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.05g, 蔗糖5g, 琼脂18g, 蒸馏水1000ml, 分离筛选培养基的pH为 7.1。

[0095] 一种巨大芽孢杆菌D122的菌剂,由所述的一种巨大芽孢杆菌D122的菌剂制备方法制备而成。

[0096] 实施例2

[0097] 本实施例与实施例1的不同之处在于,本实施例的所述步骤(2)和步骤(3)之间还包括有以下步骤:

[0098] (S1)革兰氏染色:将纯化后的单菌落进行革兰氏染色,筛选得到阳性菌;

[0099] (S2)芽孢染色:将阳性菌进行芽孢染色,筛选得到含有芽孢的革兰氏阳性菌单菌落。

[0100] 具体地,革兰氏染色方法为:

[0101] (1)涂片:在无菌操作台中,取一块载玻片,在火焰灯上方略烤,去除玻片上的杂质。在载玻片中央滴一滴无菌水,挑取单个菌落于水滴中,用灼烧过的接种环涂抹均匀。将样品载玻片在火灯上方来回过3次,以固定细胞。

[0102] (2)初染:滴加2-5滴草酸铵结晶紫染液,染1min,倾去染液,流水冲洗至无紫色。

[0103] (3)媒染:先用新配的碘液(碘 1.0g、碘化钾 2.0g、蒸馏水 300.0mL)冲去残水,再用碘液覆盖涂面1min,后水洗。

[0104] (4)脱色:除去残水后,滴加95%酒精进行脱色约15-20秒后,立即用流水冲洗。



[0105] (5)复染:滴加1滴番红染色液,染3-5min,水洗后用吸水纸吸干。

[0106] (6)镜检:将载玻片置于光学显微镜下观察染色结果。

[0107] 具体地,芽孢染色方法为:

[0108] 在无菌操作台中,取一块载玻片,在火焰灯上方略烤,去除玻片上的杂质。在载玻片中央滴一滴无菌水,挑取单个菌落水滴中,用灼烧过的接种环涂抹均匀。将样品载玻片在火灯上方来回过3次,以固定细胞。在涂布菌体的区域滴加1-2滴石碳酸碱性复红染液,染色3min。

[0109] 本实施例的其余内容与实施例1相同,这里不再赘述。

[0110] 实施例3

[0111] 本实施例与实施例1或2的不同之处在于,本实施例的所述巨大芽孢杆菌D122的固氮酶活性为520 nmol/(mL·h),其在生长代谢过程中可以产生吡啶乙酸,吡啶乙酸的分泌量为120mg/L。

[0112] 所述巨大芽孢杆菌D122菌剂,测定初始菌数为2.5亿/mL。

[0113] 所述步骤(4)中氯化钠的质量浓度为6.5%,乙酸钠的质量浓度为1.5%。

[0114] 所述步骤(1)中,分离筛选培养基由以下质量的原料制成:CaCO<sub>3</sub> 1.2g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.8g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5g, NaCl 0.2g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.002g, NaMO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.06g, 蔗糖6g, 琼脂18g, 蒸馏水1000ml, 分离筛选培养基的pH为7.2。

[0115] 本实施例的其余内容与实施例1或2相同,这里不再赘述。

[0116] 实施例4

[0117] 本实施例与实施例1或2的不同之处在于,本实施例的所述巨大芽孢杆菌D122的固氮酶活性为550 nmol/(mL·h),其在生长代谢过程中可以产生吡啶乙酸,吡啶乙酸的分泌量为150mg/L。

[0118] 所述巨大芽孢杆菌D122菌剂,测定初始菌数为3亿/mL。

[0119] 所述步骤(4)中氯化钠的质量浓度为7%,乙酸钠的质量浓度为1.5%。

[0120] 所述步骤(1)中,分离筛选培养基由以下质量的原料制成:CaCO<sub>3</sub> 1.3g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.8g, NaCl 0.3g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.004g, NaMO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.09g, 蔗糖8g, 琼脂19g, 蒸馏水1000ml, 分离筛选培养基的pH为7.3。

[0121] 本实施例的其余内容与实施例1或2相同,这里不再赘述。

[0122] 实施例5

[0123] 本实施例与实施例1或2的不同之处在于,本实施例的所述巨大芽孢杆菌D122的固氮酶活性为580 nmol/(mL·h),其在生长代谢过程中可以产生吡啶乙酸,吡啶乙酸的分泌量为180mg/L。

[0124] 所述巨大芽孢杆菌D122菌剂,测定初始菌数为4.0亿/mL。

[0125] 所述步骤(4)中氯化钠的质量浓度为7.5%,乙酸钠的质量浓度为1.5%。

[0126] 所述步骤(1)中,分离筛选培养基由以下质量的原料制成:CaCO<sub>3</sub> 1.4g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.2g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0g, NaCl 0.4g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005g, NaMO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1g, 蔗糖10g, 琼脂20g, 蒸馏水1000ml, 分离筛选培养基的pH为7.4。

[0127] 本实施例的其余内容与实施例1或2相同,这里不再赘述。

[0128] 本发明的巨大芽孢杆菌D122的16SrDNA序列菌种鉴定

[0129] 细菌的个体微小,形态简单,传统方法鉴定细菌常根据它们在生理生化上的不同反应作为分类鉴定的主要依据。20世纪70年代后期以来,国际上通用的“正式的”或“官方的”细菌分类方法是以《伯杰氏鉴定细菌学手册》为依据。在生理生化鉴定中,通常会出现一个或者几个生理指标不符合该菌种所具有的独特性质,难以明确对该菌株进行鉴定。目前,细菌鉴定的方法通常将菌株的生理生化指标与分子生物学特性相结合,得出较为可靠地结论。其中DNA序列分析的16S rRNA基因进化发育系统已经成为目前国际上细菌多相分类鉴定常用的技术手段(Kim et al,2004;Prap et al,1997)。

[0130] 核糖体16S rDNA基因序列全长约1550bp,是由交替的保守区和可变区组成。利用保守区域设计的通用引物,可以扩增出所有细菌的16S rDNA片段。16S rDNA序列分析技术的基本原理是从微生物样本中提取16S rDNA片段,通过克隆、测序或酶切、探针杂交获得16S rDNA的序列信息,再与16S rDNA数据库的序列数据或者其他数据进行比较,确定其在进化树中的位置,从而鉴定样本中可能存在的微生物种类。利用16S rDNA片段保守区域设计的通用引物,不会对非细菌的DNA互补,而细菌的16S rDNA可变区的差异可以用来区分不同的菌。因此通过对某菌株16S rDNA序列测定来获得最终鉴定证明的做法是被普遍认可的。

[0131] 1、方法:

[0132] (1)PCR反应体系(25  $\mu$ L):

[0133] 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 $\mu$ L

[0134] dNTP(2.5mM) m 2.0 $\mu$ L

[0135] 引物 27F(10 $\mu$ M) 0.5 $\mu$ L

[0136] 引物 1492R(10 $\mu$ M) 0.5 $\mu$ L

[0137] DNA模板 100ng

[0138] Taq 酶(5U/ $\mu$ L) 0.5 $\mu$ L

[0139] ddH<sub>2</sub>O 19 $\mu$ L

[0140] (2)PCR 反应条件 :95 $^{\circ}$ C预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C延伸 10 min。使用ABI 3730 xl DNA分析仪(应用生物系统公司) 进行DNA测序。

[0141] 2、测序结果

[0142] tcgagcgaac tgattagaag cttgcttcta tgacgttagc ggcggacggg tgagtaacac

[0143] gtgggcaacc tgcctgtaag actgggataa cttcgggaaa ccgaagctaa taccggatag

[0144] gatcttctcc ttcattggag atgattgaaa gatggtttcg gctatcactt acagatgggc

[0145] ccgcggtgca ttagctagtt ggtgaggtaa cggctcacca aggcaacgat gcatagccga

[0146] cctgagaggg tgatcggcca cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca

[0147] gcagtaggga atcttccgca atggacgaaa gtctgacgga gcaacgccgc gtgagtgatg

[0148] aaggctttcg ggtcgtaaaa ctctgttggt agggagaac aagtacgaga gtaactgctc

[0149] gtaccttgac ggtacctaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca gcccggttaa

[0150] tacgtaggtg gcaagcgtta tccggaatta ttgggcgtaa agcgcgcgca ggcggtttct

[0151] taagtctgat gtgaaagccc acggctcaac cgtggagggt cattggaaac tggggaactt

[0152] gagtgcagaa gagaaaagcg gaattccacg tgtagcgggtg aaatgcgtag agatgtggag

[0153] gaacaccagt ggcgaaggcg gctttttggt ctgtaactga cgctgaggcg cgaaagcgtg  
[0154] gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgag tgctaagtgt  
[0155] tagagggttt ccgcccttta gtgctgcagc taacgcatta agcactccgc ctggggagta  
[0156] cggtcgcaag actgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt  
[0157] ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt gacatcctct gacaactcta  
[0158] gagatagagc gttccccttc gggggacaga gtgacagggtg gtgcatgggt gtcgtcagct  
[0159] cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgc acccttgatc ttagttgcca  
[0160] gcatttagtt gggcactcta aggtgactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtggggatga  
[0161] cgtcaaatca tcatgccctt tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg gatggtacaa  
[0162] agggctgcaa gaccgcgagg tcaagccaat cccataaaac cattctcagt tcggattgta  
[0163] ggctgcaact cgcctacatg aagctggaat cgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg  
[0164] tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac cacgagagtt tgtaacaccc  
[0165] gaagtcggtg gagtaaccgt aag

### [0166] 3、同源性分析

[0167] 鉴定本细菌为*Bacillus megaterium*, 巨大芽孢杆菌。

[0168] 本发明由广东省引进创新创业团队项目资助研发, 制得的巨大芽孢杆菌D122及其菌剂具有广阔的市场前景, 经济效益高。

[0169] 最后应当说明的是, 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案, 而非对本发明保护范围的限制, 尽管参照较佳实施例对本发明作了详细地说明, 本领域的普通技术人员应当理解, 可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换, 而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

[0001]	<0001>		
[0002]		SEQUENCE LISTING	
[0003]	<110>	东莞市保得生物工程有限公司	
[0004]	<120>	一种巨大芽孢杆菌D122及其菌剂和菌剂制备方法	
[0005]	<130>	0	
[0006]	<160>	1	
[0007]	<170>	PatentIn version 3.3	
[0008]	<210>	1	
[0009]	<211>	1403	
[0010]	<212>	DNA	
[0011]	<213>	巨大芽孢杆菌 ( <i>Bacillus megaterium</i> ) D122的16s rDNA基因序列	
[0012]	<400>	1	
[0013]		tcgagcgaac tgattagaag cttgcttcta tgacgttagc ggcgacggg tgagtaacac	60
[0014]		gtgggcaacc tgccgtgaag actgggataa cttcgggaaa ccgaagctaa taccggatag	120
[0015]		gatcttctcc ttcattgggag atgattgaaa gatggtttcg gctatcactt acagatgggc	180
[0016]		ccgcggtgca ttagctagtt ggtgaggtaa cggctacca aggcaacgat gcatagccga	240
[0017]		cctgagaggg tgatcgcca cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca	300
[0018]		gcagtaggga atcttccgca atggacgaaa gtctgacgga gcaacgccgc gtgagtgatg	360
[0019]		aaggctttcg ggtcgtaaaa ctctgttggt agggaagaac aagtacgaga gtaactgctc	420
[0020]		gtaccttgac ggtacctaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa	480
[0021]		tacgtaggtg gcaagcggtta tccggaatta ttggcgtaa agcgcgcgca ggcggtttct	540
[0022]		taagtctgat gtgaaagccc acggctcaac cgtggagggt cattggaac tggggaactt	600
[0023]		gagtgcagaa gagaaaagcg gaattccacg tgtagcggtg aaatgcgtag agatgtggag	660
[0024]		gaacaccagt ggcaaggcg gctttttggt ctgtaactga cgctgaggcg cgaaagcgtg	720
[0025]		gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgag tgctaagtgt	780
[0026]		tagagggttt ccgcccttta gtgctgcagc taacgatta agcactccgc ctggggagta	840
[0027]		cggtcgcaag actgaaactc aaaggaattg acgggggcc gcacaagcgg tggagcatgt	900
[0028]		ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt gacatcctct gacaactcta	960
[0029]		gagatagagc gttccccttc gggggacaga gtgacaggtg gtgcatgggt gtcgtcagct	1020
[0030]		cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc aacgagcgca acccttgatc ttagttgcca	1080
[0031]		gcatttagtt gggcactcta aggtgactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtggggatga	1140
[0032]		cgtcaaatca tcatgccct tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg gatggtacaa	1200
[0033]		agggtgcaa gaccgcgagg tcaagccaat ccataaac cattctcagt tcggattgta	1260
[0034]		ggctgcaact cgcctacatg aagctggaat cgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg	1320
[0035]		tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac cacgagagtt tgtaacaccc	1380
[0036]		gaagtcggtg gagtaaccgt aag	1403

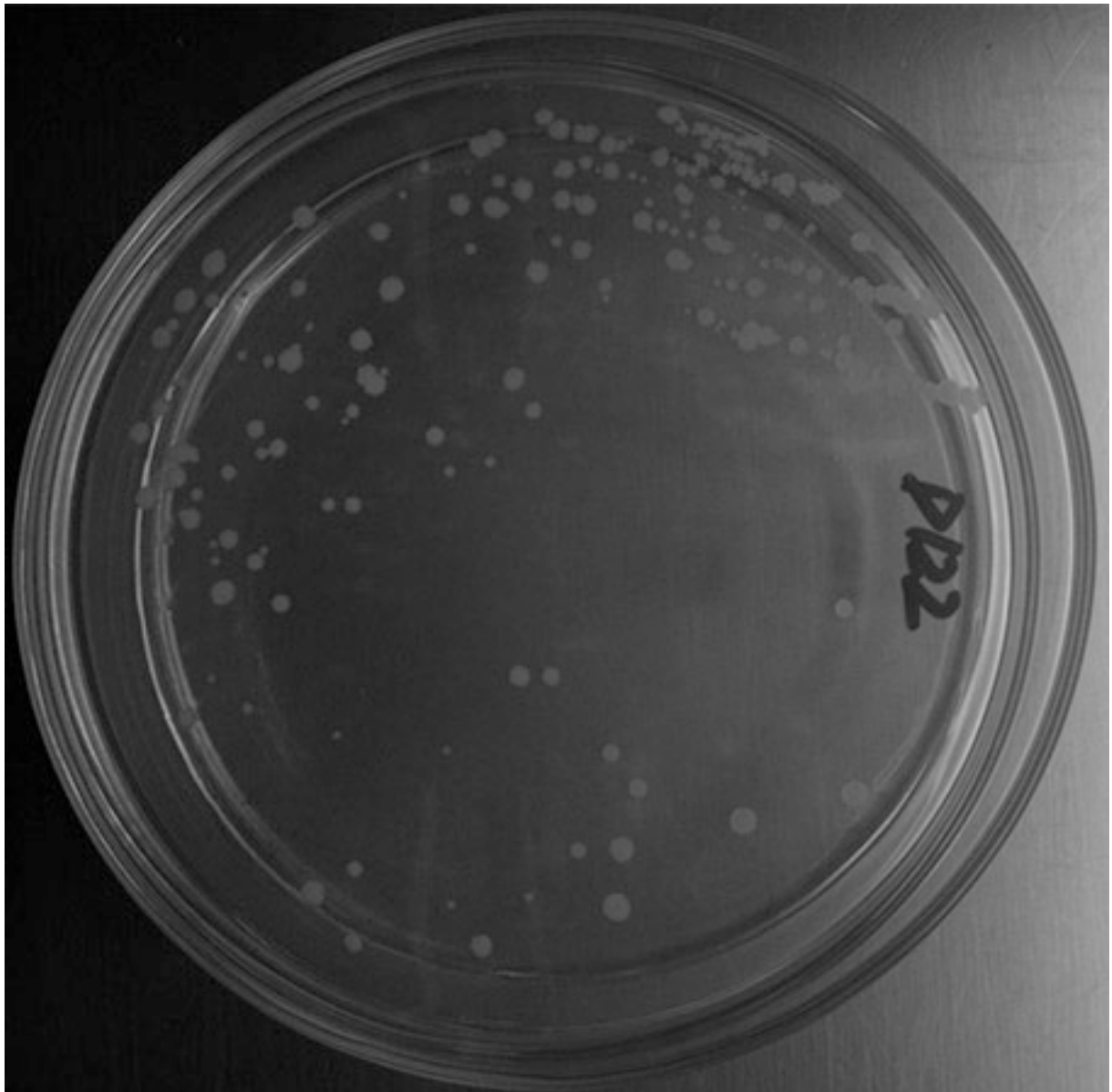


图1

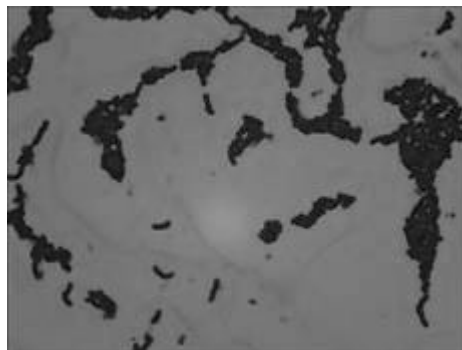


图2

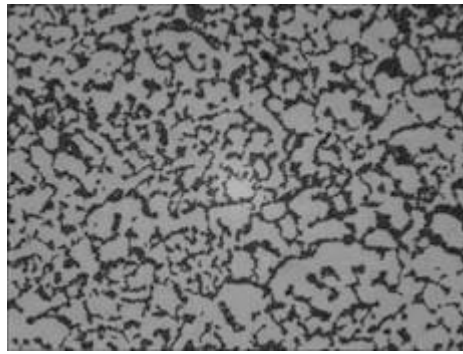


图3

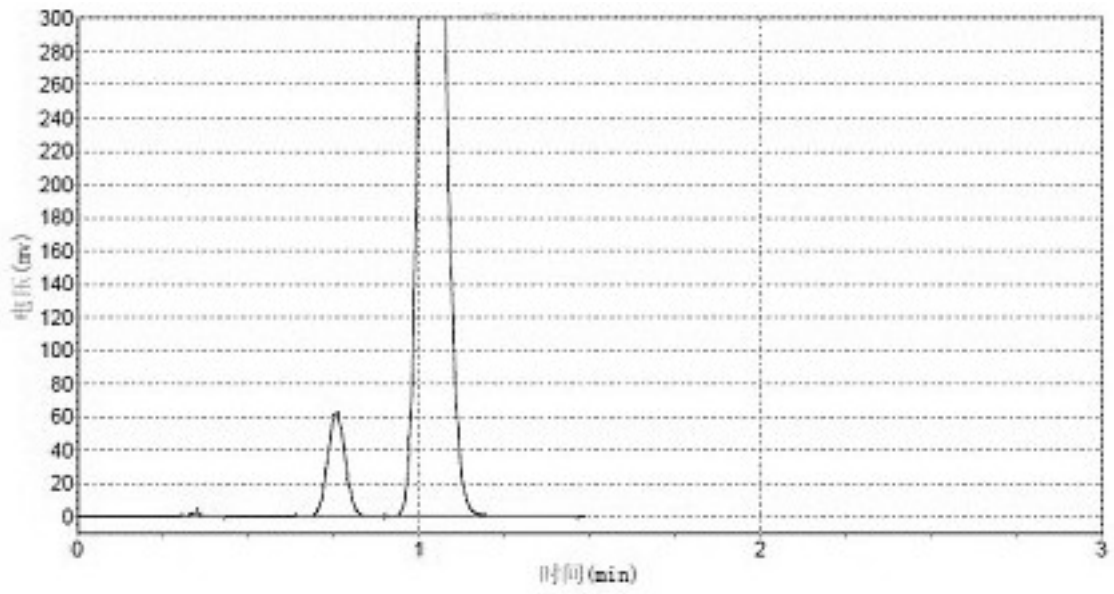


图4

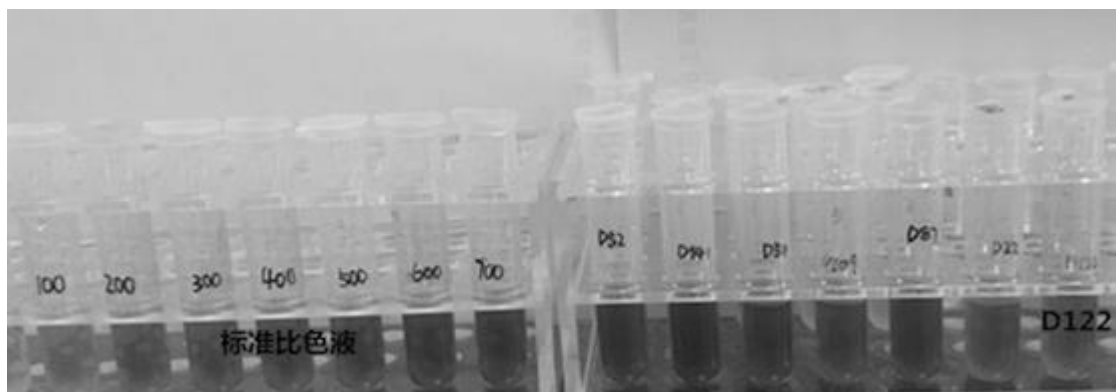


图5