



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106754463 A

(43)申请公布日 2017. 05. 31

(21)申请号 201611001344.X

A01P 21/00(2006.01)

(22)申请日 2016.11.14

C05G 3/00(2006.01)

(83)生物保藏信息

C05F 17/00(2006.01)

CGMCC No. 12339 2016.04.11

C12R 1/01(2006.01)

(71)申请人 南京农业大学

地址 211225 江苏省南京市溧水区白马镇
国家农业科技园南京农业大学基地

(72)发明人 沈其荣 乔策策 李荣 张瑞福
王若斐 寻佳佳

(74)专利代理机构 南京天华专利代理有限责任
公司 32218

代理人 傅婷婷 徐冬涛

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A01N 63/00(2006.01)

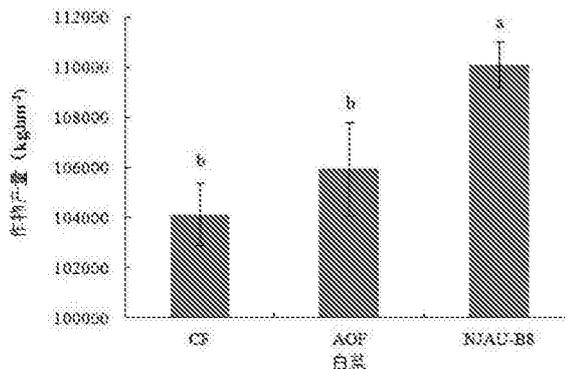
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一株具解磷能力伯克霍尔德菌属细菌NJAU-B8及其研制的微生物肥料

(57)摘要

本发明公开了一株具解磷能力伯克霍尔德菌属细菌NJAU-B8及其研制的微生物肥料,该菌株分离于大田玉米根际土壤,基于生理生化特性和16S rDNA分析被鉴定为伯克霍尔德属菌,其与唐菖蒲伯克霍尔德菌同源性达到99%。定性与定量分析结果表明,菌株NJAU-B8具有较强解无机磷能力;盆栽与大田试验结果表明,基于该菌株研制的生物菌肥和生物有机肥分别能够有效促进玉米盆栽生长和增加玉米、白菜和土豆的大田产量。



1. 一株伯克霍尔德菌 (*Burkholderia*) NJAU-B8, 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏日期为2016年4月11日, 保藏编号为CGMCC No.12339。

2. 权利要求1所述的伯克霍尔德菌NJAU-B8在解无机磷和/或促进植物生长与增产中的应用; 所述植物优选玉米、白菜和土豆。

3. 权利要求1所述的伯克霍尔德菌NJAU-B8在制备解无机磷、促进植物生长与增产的微生物菌剂或复合微生物肥料中的应用; 所述植物优选玉米、白菜和土豆。

4. 权利要求1所述的伯克霍尔德菌NJAU-B8制备的微生物菌剂。

5. 根据权利要求4所述的微生物菌剂, 其特征在于主要通过以下方法制备: 将保藏号为CGMCC No.12339的伯克霍尔德菌NJAU-B8接种到LB液体培养基中, 进行液体发酵生产, 发酵生产的条件为: pH 6.0~7.0, 发酵温度范围30~35℃, 搅拌速度为170r/min, 发酵时间为48h, 使发酵液中含菌量 $\geq 1 \times 10^{10}$ CFU/mL。

6. 根据权利要求5所述的微生物菌剂, 其特征在于得到发酵液后将其按照常规方法制备为常用剂型, 优选制备为粉剂、颗粒剂或悬浮剂。

7. 由权利要求1所述的伯克霍尔德菌NJAU-B8制备的复合微生物肥料。

8. 根据权利要求7所述的复合微生物肥料, 其特征在于主要通过以下方法制备: 由普通有机肥与氨基酸水解液按5:1 (kg:L) 混合得复合肥, 按复合肥:NJAU-B8发酵液质量体积比为20:1 (kg:L) 的比例向复合肥中添加NJAU-B8发酵液, 经过二次发酵, 得到生物有机肥, 添加化学养分至总氮N, 全磷 P_2O_5 和全钾 K_2O 养分分别为 $80g \cdot kg^{-1}$, $40g \cdot kg^{-1}$ 和 $30g \cdot kg^{-1}$ 制成复合微生物肥料, 其中有效活菌数 ≥ 0.5 亿个/g肥料。

9. 权利要求5或6所述的微生物菌剂在解无机磷和/或促进植物生长与增产中的应用; 所述植物优选玉米、白菜和土豆。

10. 根据权利要求9所述的应用, 其特征在于将权利要求5所述的发酵液直接加至植物根际, 或将权利要求5所述的发酵液6000~8000r/min离心8~10min后, 采用与发酵液体积相等的生理盐水重悬菌体制成菌悬液, 然后直接加至植物根际, 发酵液或菌悬液的灌菌量优选按菌液体积与土壤质量比为 $2.0 \sim 3.0 \times 10^7$ CFU/g土壤(干基)来施用, 进一步优选按照 2.5×10^7 CFU/g土壤(干基)来施用。

11. 权利要求7-8中任一项所述的复合微生物肥料在解无机磷和/或促进植物生长与增产中的应用。

12. 根据权利要求11所述的应用, 其特征施肥方式为复合微生物肥料施入量 $3000kg \cdot hm^{-2}$, 肥料分2次施用, 种苗前施入总养分的1/2作为基肥, 剩余的1/2养分于初果期追肥施用。

13. 根据权利要求11所述的应用, 其特征在于所述植物为玉米、白菜和土豆。

一株具解磷能力伯克霍尔德菌属细菌NJAU-B8及其研制的微生物肥料

技术领域

[0001] 本发明属于农业微生物领域,具体涉及一株具解磷能力伯克霍尔德菌属细菌NJAU-B8及其研制的微生物肥料。

背景技术

[0002] 磷是限制植物生长的主要营养元素之一,施入的磷肥当季作物利用率为5%~25%。大部分磷与土壤中的 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 结合,形成难溶性磷酸盐(Abd-Alla M H, 1994),因而大部分磷肥以难溶的无效态在土壤中积累。植物根际促生菌(Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR)指生存于植物根际、根表并能直接或间接地促进与调节植物生长的微生物(Ahmad et al, 2008),其中解磷菌能够将难溶性磷酸盐,如磷矿粉中的磷转化为水溶性态,从而供植物吸收利用(朱颖等, 2009)。该类细菌既能活化土壤中难溶性磷素,还可以通过影响植物根系分泌物的种类和数量,增加植物根系对周围K、Ca、Mg、Fe、Zn等营养元素的吸收,提高植物的抗逆性,使植物能够在酸性、缺磷等胁迫生境下生长。

[0003] 因此,有必要从自然条件下的植物根际筛选高效解磷菌株,并制成解磷微生物有机肥,以在提供营养的同时活化土壤中难溶性磷素,促进农作物对磷的吸收。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于针对生产实践中的实际问题 and 需求,提供一株具解磷功能,进而有效促进作物生长和增加作物产量的伯克霍尔德菌属细菌NJAU-B8。

[0005] 本发明的另一目的是提供该细菌制备的复合微生物肥料及其应用。

[0006] 本发明的又一目的是提供该细菌制备的微生物菌剂及其应用。

[0007] 本发明的目的可通过以下技术方案实现:

[0008] 一株用于促进作物生长的促生菌株NJAU-B8,菌株分离自吉林通化玉米大田根际土壤,分类命名为伯克霍尔德菌属细菌(*Burkholderia* sp.),保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏日期为2016年4月11日,保藏编号为CGMCC No.12339。

[0009] 菌株NJAU-B8在LB平板上的菌落较小,呈淡黄色,并能产生黄色色素,边缘平滑,具有一定的黏性,不易挑起。革兰氏染色阴性,菌体着色均匀。D-果糖、麦芽糖、阿拉伯糖、木糖、乳糖利用均呈阳性,发酵葡萄糖产酸不产气,7%NaCl生长。用NJAU-B8菌株的16S rDNA序列(登录号为KX421207)所构建发育树表明,菌株NJAU-B8与唐菖蒲伯克霍尔德菌*Burkholderia gladioli* (EU024168) 同源性达到99.1%。结合菌株的形态特征、理化特征并结合16SrDNA序列分析,将菌株NJAU-B8初步鉴定为伯克霍尔德菌属细菌。

[0010] 本发明所述伯克霍尔德菌属NJAU-B8在解无机磷或促进植物生长与增产中的应用。

[0011] 本发明所述伯克霍尔德菌属NJAU-B8在制备促进植物增产的微生物菌剂或复合微生物肥料中的应用。

[0012] 由本发明所述伯克霍尔德属菌NJAU-B8制备的微生物菌剂和/或复合微生物肥料。

[0013] 所述的微生物菌剂优选主要通过以下方法制备:将保藏号为CGMCC No.12339的伯克霍尔德菌属细菌NJAU-B8接种到LB液体培养基中,进行液体发酵生产,发酵生产的条件为:pH 7.0,发酵温度范围30~35℃,转速为170r/min,发酵时间为48h,使发酵液中含菌量 $\geq 1 \times 10^{10}$ CFU/mL。所用LB培养液配制方法为,以配制1L培养基为例:蛋白胨10g,酵母粉5g,NaCl 10g,琼脂20g,定容至1000mL,pH自然,121℃灭菌20min。

[0014] 所述的微生物菌剂进一步优选将得到的发酵液按照常规方法制备为其他微生物肥料常用剂型,优选制备为粉剂。

[0015] 本发明所述的微生物菌剂在解无机磷和促进作物生长与增产中的应用。

[0016] 所述的促进作物生长应用,优选将所述的发酵液6000~8000r/min离心8~10min后,采用与发酵液体积相等的生理盐水(浓度0.9%)重悬菌体制成菌悬液,然后直接加至植物根际。以降低成本为基准,菌悬液的灌菌量优选按菌液体积与土壤质量比为 $2.0 \sim 3.0 \times 10^7$ CFU/g土壤(干基)来施用,进一步优选按照 2.5×10^7 CFU/g土壤(干基)来施用。

[0017] 所述的复合微生物肥料优选主要通过以下方法制备:由普通有机肥与氨基酸水解液按5:1(w:v,kg:L)混合,按20:1(w:v,kg:L)添加NJAU-B8发酵液,经过二次发酵,得到生物有机肥,添加化学养分至总氮(N),全磷(P_2O_5)和全钾(K_2O)养分分别为 $80g \cdot kg^{-1}$, $40g \cdot kg^{-1}$ 和 $30g \cdot kg^{-1}$ 研制成复合微生物肥料,其有效活菌数 ≥ 0.5 亿个/g肥料。化肥选用尿素(N,46.6%)、过磷酸钙(P_2O_5 ,12.0%)、氯化钾(K_2O ,52.0%)。

[0018] 所述的氨基酸水解液优选通过以下方法制备而成:(1)在密闭容器中先将病死畜禽动物经自动化粉碎、所有固形物和液体自动转入密闭的水解罐后,在初始酸浓度c($1/2H_2SO_4$)为 $3 \sim 5mol \cdot L^{-1}$ 、80~100℃和1~2个大气压下水解2~5小时;(2)水解结束待水解罐内溶液冷却至80℃以下时,静置分层,收集中层的氨基酸溶液即为所述的氨基酸水解液。氨基酸水解液含氨基酸和各种肽类物质约10%(g/100ml)及以上。

[0019] 本发明所述的复合微生物肥料在解无机磷和/或促进植物生长与增产中的应用。

[0020] 所述的促进作物增产应用,田间试验连续种植3季作物:玉米、白菜和土豆轮作。每季生物有机肥均施入 $3000kg \cdot hm^{-2}$,肥料分2次施用,种苗前施入总养分的1/2作为基肥(包括所有的有机-无机复混肥或复合微生物肥料及相应养分的化肥),剩余的1/2养分于初果期追肥施用。

[0021] 有益效果:

[0022] 本发明主要利用分离筛选出的能够解无机磷和根际有效定殖的伯克霍尔德属菌NJAU-B8的施用,显著提高作物苗期的生长速度,促进作物对土壤中养分的吸收利用,从而促进作物生长。由其制成的复合微生物肥料,施用田间后,显著提高了田间不同作物的产量。本发明促生菌NJAU-B8在2季盆栽试验和3季田间试验中表现出了稳定的促生与增产能力。本发明微生物类肥料产品应用后促生与增产效果明显,适合大田作物产区大面积使用。

附图说明

[0023] 图1基于菌株NJAU-B8的16S rDNA基因序列采用邻接法建立的系统发育树

[0024] 图2第1季玉米盆栽效果图

[0025] 图3第2季玉米盆栽效果图

[0026] 图4第一季大田试验玉米产量

[0027] 注:图中不同字母在同一列表示不同的显著性差异(Duncan-test, $P < 0.05$),下同。

[0028] 图5第二季大田试验白菜产量

[0029] 图6第三季大田试验土豆产量

[0030] 生物材料保藏信息

[0031] 菌株NJAU-B8,分类命名为伯克霍尔德菌属细菌(*Bukhdderia* sp.),保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址为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,保藏日期为2016年4月11日,保藏编号为CGMCC No.12339。

具体实施方式

[0032] 实施例1、功能菌株的分离及鉴定

[0033] 将玉米根在自来水下轻轻冲洗2min,去掉根际表面黏着土。然后用无菌水冲洗干净,将根剪下,加入带玻璃珠并装有100mL无菌水的250mL锥形瓶中,25℃、170r/min振荡20min形成土壤悬液,分别吸取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释倍数的土壤悬液0.1mL,涂布于无机磷培养平板上,每个浓度3个重复,28℃培养5天后,在平板上挑选周围产生溶磷圈的菌落纯化5次以上,选取仍然有溶磷圈的菌落转至斜面培养,4℃保藏备用。

[0034] 将纯化后的菌种接种于改良的PVK培养基上,置于30℃培养箱培养7天以后,测量透明圈和菌落直径,并计算出透明圈和菌落直径的比值(D/d值)。

[0035] 选择透明圈直径较大或其与菌落直径比值较大菌株,接种到NBRIP培养基中,30℃、170r/min培养,48h取样测定培养液中有效磷浓度,7天后,测定培养液中有效磷和全磷含量,设不接菌对照,处理与对照均设3个重复。

[0036] 其中所用分离培养基(改良后的PVK培养基)配制方法为,以配制1L培养基为例:葡萄糖10g,硫酸铵0.5g,硫酸镁0.3g,氯化钠0.3g,氯化钾0.2g,硫酸铁0.03g,硫酸锰0.03g,磷酸三钙5g,蒸馏水1000mL,pH 6.5~7.0。115℃灭菌30min。

[0037] 所用筛选培养基采用国际植物研究所磷酸盐生长培养基(NBRIP)配制方法为,以配制1L培养基为例:葡萄糖10g,磷酸三钙5g,氯化镁5g,硫酸镁0.25g,氯化钾0.2g,硫酸铵0.1g,蒸馏水1000mL,pH 7.0。115℃灭菌30min。

[0038] 通过定性和定量筛选最终获得一株细菌命名为NJAU-B8,菌株NJAU-B8在LB平板上的菌落较小,呈淡黄色,并能产生黄色色素,边缘平滑,具有一定的黏性,不易挑起。革兰氏染色阴性,菌体着色均匀。D-果糖、麦芽糖、阿拉伯糖、木糖、乳糖利用均呈阳性,发酵葡萄糖产酸不产气,7%NaCl生长。用NJAU-B8菌株的16S rDNA序列(登录号为KX421207)所构建发育树表明,菌株NJAU-B8与唐菖蒲伯克霍尔德菌属细菌*Bukhdderia gladioli*(EU024168)同源性达到99.1%,分类学上与越南伯克霍尔德氏菌并非同一种,结合菌株的形态特征、理化特征和16S rDNA序列分析,将菌株NJAU-B8初步鉴定为伯克霍尔德菌属细菌。将其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.12339。

[0039] 实施例2、功能菌灌菌悬液的产生

[0040] 将菌株NJAU-B8接种至LB培养液中液体发酵生产,发酵生产的条件为:pH 7.0,发酵温度范围30~35℃,转速为170r/min,发酵时间为48h,使发酵液中含菌量 $\geq 1.0 \times 10^{10}$ CFU/mL;灌菌液为发酵液6000r/min离心8min后,采用等体积0.9%的生理盐水重悬菌体

获得菌悬液。

[0041] 所用LB培养液配制方法为,以配制1L培养基为例:蛋白胨10g,酵母粉5g,NaCl 10g,琼脂20g,定容至1000mL,pH自然,121℃灭菌20min。

[0042] 实施例3、复合微生物肥料的研制

[0043] 所述的促进作物增产应用的复合微生物肥料,由普通有机肥与氨基酸水解液按5:1(w:v,kg:L)混合,按20Kg肥料:1L NJAU-B8发酵液的比例添加NJAU-B8发酵液,经过二次发酵,得到生物有机肥,添加化学养分至总氮(N),全磷(P₂O₅)和全钾(K₂O)养分分别为80g·kg⁻¹,40g·kg⁻¹和30g·kg⁻¹研制成复合微生物肥料,其有效活菌数≥0.5亿个/g肥料。化肥选用尿素(N,46.6%)、过磷酸钙(P₂O₅,12.0%)、氯化钾(K₂O,52.0%)。在不接种功能菌,采用同样工艺发酵成的混合物中添加养分至与复合微生物肥料一致形成有机-无机复混肥。

[0044] 实施例4、促生生物肥在玉米盆栽(第1季、第2季)上的应用效果

[0045] 两季盆栽试验于2014年6月2日至10月24日在江苏省固体有机废弃物资源化利用高新技术研究重点实验室(宜兴)温室内进行,供试玉米品种为苏玉29,购自江苏省农科院。将玉米种子浸泡在常温水中4h,放置在湿润的纱布上于30℃培养箱中催芽2-3天,待80%以上种子萌发后,选取露白的种子移至育苗盘育苗,待长出2片真叶后挑选长势一致幼苗移栽盆中。试验设置两个处理:1)CK,只施用普通有机肥;2)处理NJAU-B8,施用普通有机肥和NJAU-B8的菌悬液。每个处理6盆,每盆装2kg土,普通有机肥添加量为1.5%(质量百分比,以2kg土为基准),菌株NJAU-B8的菌悬液的灌菌量优选按 2.5×10^7 CFU/g土壤(干基)来施用。常规管理,42d后分别测定植株的株高、茎粗、叶绿素相对含量测量值(Soil and plant analyzer development, SPAD)、地上部鲜重、地上部干重。

[0046] 第1季玉米促生效果如图2、生物量情况如表1所示,盆栽培养42d后,相比于不接菌处理,接种菌株NJAU-B8对玉米苗有促生效果明显,除SPAD值外,其他生长指标均显著优于CK(P<0.05),其株高、茎粗、叶绿素、地上部鲜重、地上部干重较CK分别增加40.3%、18.7%、1.3%、76.4%、76.7%。

[0047] 第2季玉米促生效果如图3、生物量情况如表2所示,盆栽培养42d后,施用普通有机肥和NJAU-B8菌悬液后使得玉米植株的地上部鲜重和地上部干重均显著高于单施普通有机肥(CK)处理(p<0.05)。与CK相比,施用腐熟鸡粪和NJAU-B8菌悬液的处理在株高、茎粗、地上部鲜重和地上部干重方面,分别增加了15.3%、1.9%、6.2%、9.9%。

[0048] 综上两季盆栽结果表明,施用普通有机肥和NJAU-B8菌悬液(NJAU-B8)处理与单施普通有机肥(CK)处理的玉米株高、地上部鲜重、地上部干重之间差异明显,说明菌株NJAU-B8的促生效果明显。

[0049] 表1、第1季玉米促生盆栽试验生物量情况

[0050]

处理	株高 (cm)	茎粗 (mm)	SPAD	地上部鲜重 (g)	地上部干重 (g)
CK	23.01±0.47	10.83±0.31	34.7±0.47	6.31±0.07	0.86±0.04
NJAU-B8	32.30±0.88*	12.86±0.04	35.16±0.89	11.13±0.20*	1.52±0.05*

[0051] 注:SPAD:叶绿素相对含量测量值;表中数据表示平均值±标准偏差。*表示不同的显著性差异(Duncan-t_{est},P<0.05)。下同。

[0052] 表2、第2季玉米盆栽促生试验生物量情况

[0053]

处理	株高 (cm)	茎粗(mm)	SPAD	地上部鲜重(g)	地上部干重(g)
CK	24.66±1.05	11.86±0.09	33.30±1.61	20.90±0.39	2.91±0.05
NJAU-B8	29.13±0.33 [*]	12.1±0.24	33.70±0.89	22.30±0.85 [*]	3.23±0.20 [*]

[0054] 实施例5、促生生物肥在作物大田玉米上的应用效果

[0055] 据以上盆栽试验效果,菌株NJAU-B8被选择研制成复合微生物肥料进一步进行田间试验。田间试验于2015年3月至2016年4月在南通市海安县基本农田中进行,供试土壤为黄壤土,pH:6.83,有机质含量:9.63g·kg⁻¹,全氮含量:2.29g·kg⁻¹,全磷含量:4.08g·kg⁻¹,速效磷含量:21.1mg·kg⁻¹,速效钾含量:719mg·kg⁻¹。田间试验连续种植3季作物:玉米、白菜和土豆轮作。共设置3个处理:1)化肥对照(CF);2)有机-无机复混肥处理(AOF):在不接种功能菌,采用与含菌株NJAU-B8复合微生物肥料处理同样工艺发酵成的混合体中添加养分至与复合微生物肥料一致形成有机-无机复混肥;3)含菌株NJAU-B8复合微生物肥料处理(NJAU-B8)。每个处理3个重复,每个小区面积为30m²。

[0056] 如图4所示,第1季玉米田间试验于2015年3月至2015年8月进行。有机-无机复混肥和生物有机肥均施入3000kg·hm⁻²,其余养分用尿素、过磷酸钙和硫酸钾按总养分补齐,养分配比为8:4:3(即总氮N,全磷P₂O₅和全钾K₂O养分分别为80g·kg⁻¹,40g·kg⁻¹和30g·kg⁻¹);化肥处理直接施入相应养分的尿素、过磷酸钙和硫酸钾。肥料分2次施用,种苗前施入总养分的1/2作为基肥(包括所有的有机-无机复混肥或复合微生物肥料及相应养分的化肥),剩余的1/2养分于初果期追肥施用。

[0057] 第1季田间试验结果表明:一方面,各处理间玉米产量无显著性差异,可能是土壤养分比较高,掩盖了微生物肥料的作用;另一方面,NJAU-B8处理比AOF和CF处理分别增产0.82%和3.37%,这说明功能菌的增产作用开始显现。

[0058] 实施例6、促生生物肥在作物大田白菜上的应用效果

[0059] 如图5所示,第2季白菜田间试验于2015年9月至2015年12月进行。有机-无机复混肥和生物有机肥均施入3000kg·hm⁻²,其余养分用尿素、过磷酸钙和硫酸钾按总养分补齐,养分配比为8:4:3;化肥处理直接施入相应养分的尿素、过磷酸钙和硫酸钾。肥料分2次施用,种苗前施入总养分的1/2作为基肥(包括所有的有机-无机复混肥或复合微生物肥料及相应养分的化肥),剩余的1/2养分于结苞期追肥施用。

[0060] 第2季田间试验结果表明:NJAU-B8处理的白菜产量显著高于CF和AOF处理(图5),NJAU-B8处理比AOF和CF处理分别增产3.92%和5.74%,说明功能菌NJAU-B8有显著的增产作用。

[0061] 实施例7、促生生物肥在作物大田土豆上的应用效果

[0062] 如图6所示,第3季土豆田间试验于2015年12月至2016年5月进行。有机-无机复混肥和生物有机肥均施入3000kg·hm⁻²,其余养分用尿素、过磷酸钙和硫酸钾按总养分补齐,养分配比为8:4:8;化肥处理直接施入相应养分的尿素、过磷酸钙和硫酸钾。肥料分2次施用,种苗前施入总养分的1/2作为基肥(包括所有的有机-无机复混肥或复合微生物肥料及相应养分的化肥),剩余的1/2养分于初花期追肥施用。

[0063] 第3季田间试验结果表明:NJAU-B8处理的土豆产量显著高于CF和AOF处理(图6),

NJAU-B8处理比AOF和CF处理分别增产12.73%和35.89%，相比于第2季增产率更加显著。

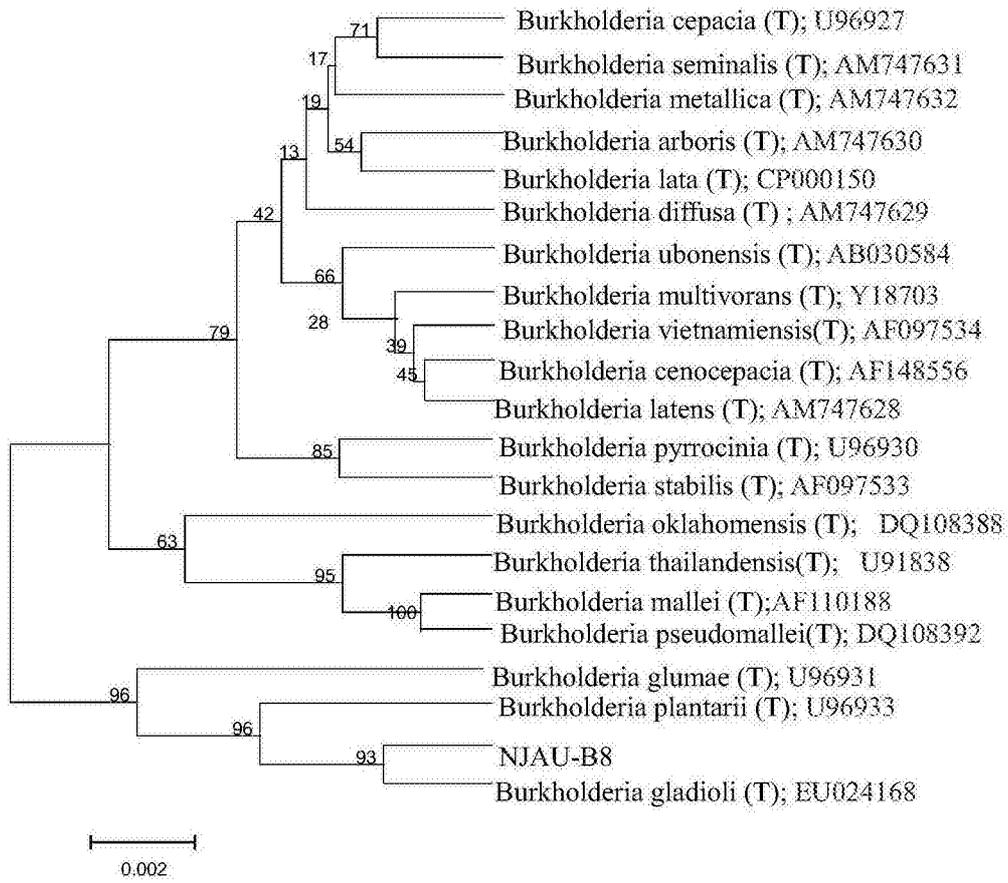


图1

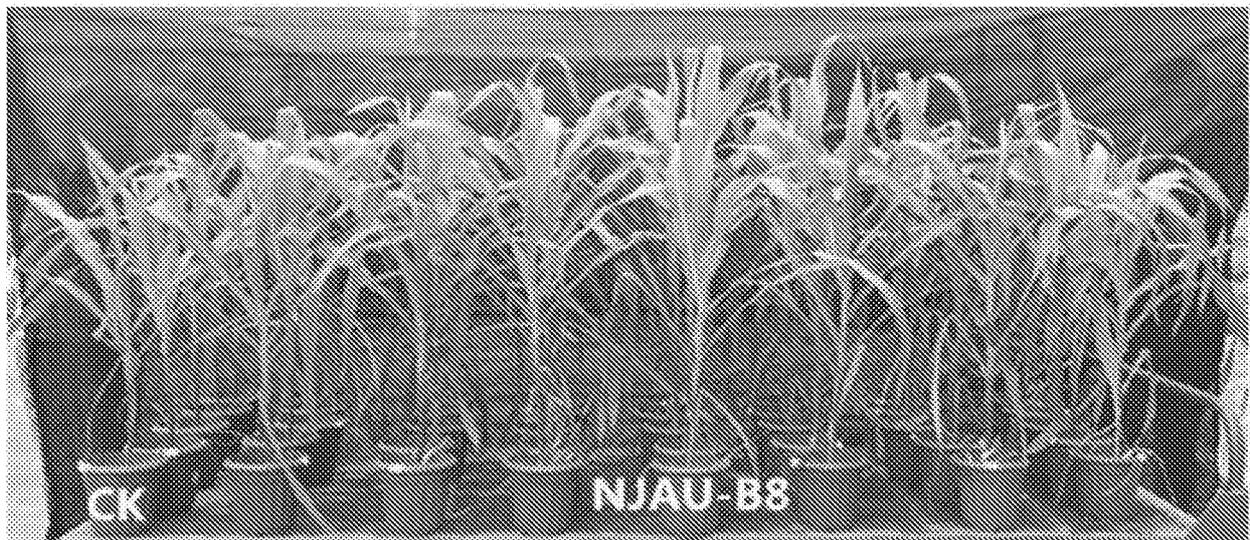


图2



图3

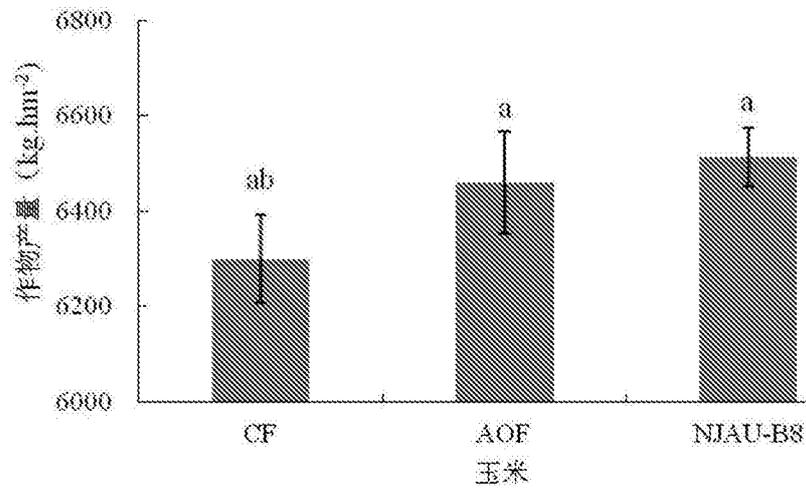


图4

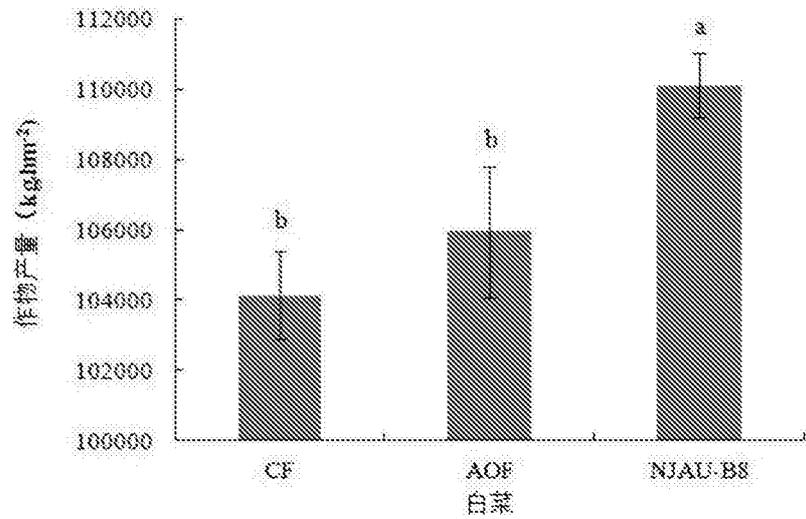


图5

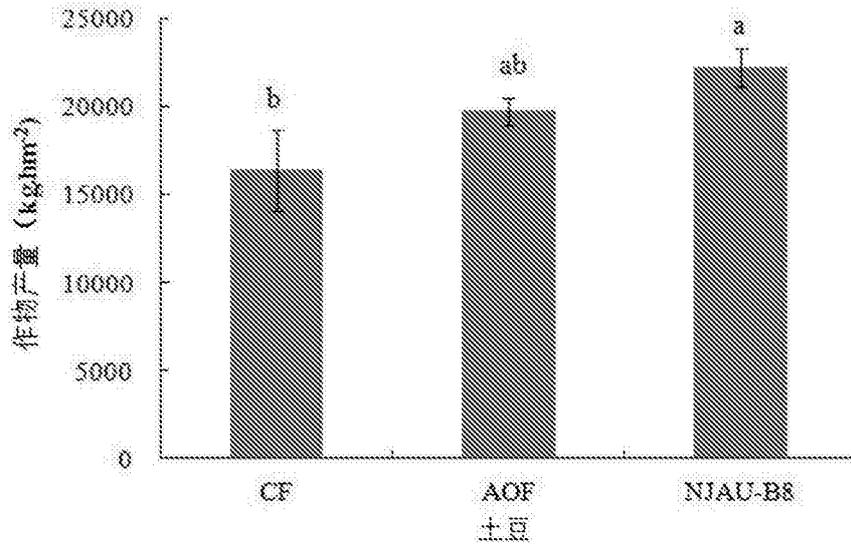


图6