



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103756909 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 30

(21) 申请号 201310195335. 9

(22) 申请日 2013. 05. 24

(83) 生物保藏信息

CGMCC No 7464 2013. 04. 12

(71) 申请人 山东泰丰源生物科技有限公司

地址 250014 山东省济南市历下区环山路
37 号

(72) 发明人 周峰 莫明和 杨舒惠

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006. 01)

C05F 11/08 (2006. 01)

C05F 17/00 (2006. 01)

C12R 1/685 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表1页

(54) 发明名称

一种解磷真菌及其在生物磷肥制备和蘑菇栽培中的应用

(57) 摘要

本发明涉及一种解磷真菌以及利用该真菌制备腐熟剂, 制备的腐熟剂可用于生物有机肥的生产和蘑菇栽培中, 属于农业废弃物资源化综合利用技术领域。本发明的微生物为黑曲霉 *Aspergillus niger* MZ 菌株, 该菌株 2013 年 4 月 12 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, 保藏号 :CGMCC No. 7464。MZ 菌株的 ITS4 基因序列(此序列在 GeneBank 数据库中的序列号为 HQ850370) 是鉴别该菌株的主要特征依据。利用本发明的 MZ 菌株制备的腐熟剂通过堆肥发酵方法能将玉米、水稻、小麦等农作物秸秆在 21 天内完全腐熟, 转化为生物磷肥。利用本发明的 MZ 菌株制备的腐熟剂还可用于双孢蘑菇、草菇等培养料的快速腐熟和提高蘑菇产量。

1. 一种解磷真菌,其特征在于:该菌株为黑曲霉 MZ 菌株,该菌株 2013 年 4 月 12 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,保藏号:CGMCC No. 7464。
2. 如权利要求 1 所述解磷真菌的用途,其特征在于:用于制备 MZ 腐熟剂。
3. 一种制备 MZ 腐熟剂的方法,其特征在于:将采用权利要求 1 所述的 *Aspergillus niger* MZ 菌株在 PDA 固体培养基上、28℃ 下培养 4 d,用无菌牙签将平板表面的菌丝和孢子刮下并接种到棉籽壳培养基中,28℃ 下培养 4-8 天后即得到 MZ 腐熟剂。
4. 如权利要求 3 所述的一种制备 MZ 腐熟剂的方法,其特征在于:所述的棉籽壳培养基由棉籽壳加 PDA 液体培养基混匀制成,含水量为 35%-45%。
5. 如权利要求 3 所述的一种制备 MZ 腐熟剂的方法,其特征在于:最适宜的培养条件为 28℃ 下培养 4 天。
6. 如权利要求 2 所述的 MZ 腐熟剂的用途,其特征在于:用于堆肥发酵农作物秸秆来制备生产生物磷肥、在发酵粪草培养料中加速培养料的腐熟和提高蘑菇产量。
7. 一种利用 MZ 腐熟剂发酵农作物秸秆制备生物磷肥的方法,其特征在于:农作物秸秆经自然风干,粉碎成小于 3cm 的片段,与草碳按重量比为 7:3 混匀,按堆料干重的 0.1%-5% 的比例接种 MZ 腐熟剂,充分混匀后将堆料水分调节到 30%-45%,将堆料在室内按梯形堆垛,每 3 天翻堆一次,发酵 18-21 天时终止发酵,将发酵产物在 65℃ 以下干至水分含量小于 5%,粉碎、过筛后即得到生物磷肥。
8. 一种利用 MZ 腐熟剂发酵粪草培养料的方法,其特征在于:向粪草培养料中,按堆料干重 0.1%-5% 的比例接种 MZ 腐熟剂,充分混匀后,将堆料水分调节到 30%-45%。
9. 将堆料在室内按梯形堆垛,堆体的下底长 1-1.5 米,上底长 0.5-1 米,高 0.5-1 米,每 3 天翻堆一次,发酵 6-10 天时获得的发酵产物。
10. 如权利要求 6 所述 MZ 腐熟剂的用途,其特征在于:所述的粪草培养料为双孢菇和草菇培养料。
11. 如权利要求 7 所述的一种利用 MZ 腐熟剂发酵农作物秸秆制备生物磷肥的方法,其特征在于:所述堆垛的下底长 1-1.5m,上底长 0.5-1m,高 0.5-1m。

一种解磷真菌及其在生物磷肥制备和蘑菇栽培中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及利用一种解磷真菌制备秸秆腐熟剂的方法,以及利用该腐熟剂发酵秸秆类农业废弃物制备生物磷肥和栽培蘑菇,属微生物菌剂技术领域。

背景技术

[0002] 秸秆还田有利于改善土壤理化和生物学性状、培肥土壤,促进作物生长发育和产量的提高。作物秸秆主要由纤维素、半纤维素、木质素、蜡质物质及少量灰分组成,在纤维素的晶型构架之间充满了半纤维素和三维网状结构的木质素大分子,三者通过特定的方式结合在一起形成稳定的复杂结构。尽管纤维素、半纤维素多糖类有机物质容易被微生物或酶分解,但是在植物组织中木质素与半纤维素以共价键形式结合,并将纤维素分子紧紧包裹其中成为外围基质,形成一种坚固的天然屏障,多数微生物及其产生的降解酶很难进入其中分解纤维素。因此,自然条件下秸秆腐熟速度缓慢,腐熟程度不彻底,还田后使用会影响土壤墒情,在土壤中经微生物继续发酵分解产生的热量还会导致作物烧苗等现象。

[0003] 我国是一个农业大国,农作物播种面积居世界第一位,秸秆中蕴藏着巨大的养分资源,作物吸收的养分有 50% 左右以生物质的形式保留在秸秆中。2006 年中国作物秸秆资源数量超过 7.6 亿吨,接近世界秸秆资源总量 1/3,是世界第一秸秆大国,且总产量呈不断增长之势(毕于运等,2009)。中国农作物秸秆种类繁多,主要作物秸秆近 20 种。其中,水稻、小麦和玉米三大作物秸秆的总量占全部秸秆总量的 77.2% (高利伟等,2009)。这三大作物秸秆的氮、磷、钾养分含量分别占到秸秆养分总量的 68.8%、74.0%、73.9%,总养分占到总量的 72.3% (高利伟等,2009)。因此,如何加速农作物秸秆的快速腐解、促进秸秆的原位还田,以及通过秸秆的快速堆肥发酵将其转化成有机肥,已成为秸秆资源循环利用亟待解决的关键问题。

[0004] 通过添加腐熟剂可以加快秸秆腐熟、实现废弃物的利用。农作物秸秆能够利用自身的、环境的微生物完成自身的腐熟过程,但人为添加腐熟剂能达到缩短腐熟时间、提高腐熟效率;同时,添加具有解磷、生防等特殊功能的微生物腐熟剂还能更大程度的满足农业发展的需要。木腐菌等微生物可分泌木质素酶、纤维素酶、半纤维素酶等胞外酶分解秸秆中的木质素、纤维素等成分,促进纤维类物质的分解(Zhou et al., 2007; 顾方媛等,2008)。Haruta 等(2002)构建的复合菌系能在 4 天的时间将水稻秸秆质量的 60% 分解;任克宁等(2011)报道了白腐菌和黑曲霉混合能降解玉米秸秆中的木质素和纤维素。刘成等(2007)以棉粕和玉米秆为主要原料研究了黑曲霉产木聚糖酶固态发酵条件及部分酶学性质及利用生物防治微生物降解秸秆等应用。研究表明黑曲霉具有较强溶解多种无机磷的能力和促进作物生长的作用(梁艳琼等,2011)。

[0005] 磷是植物生长发育所必需营养元素之一,在植物的生长和发育中的作用仅次于氮。我国有 74% 的耕地处于缺磷状态,为了确保农作物生长所必需的磷素营养,每年必须向农田土壤中施入大量的化学磷肥。但施入的化学肥料仅有 5% ~ 25% 可被植物吸收利用,绝大部分磷肥则很快与土壤中的其它成分发生反应变成植物不能吸收利用的难溶性磷酸盐

或以吸附态形式滞留于土壤中(Singh & Kapoor, 1994)。解磷微生物可通过分泌各种有机酸,无机酸等途径溶解矿物磷,释放可溶性磷供植物生长需要(Song et al., 2008)。利用解磷真菌制备的秸秆腐熟剂不仅具有常规腐熟剂腐熟秸秆的效果,还具有微生物磷肥的功能,应用前景十分广阔。

[0006] 双孢蘑菇和草菇的培养料主要是粪草,栽培之前需要将粪草堆肥发酵和充分腐熟以提高培养料的养分和减少蘑菇栽培过程中的病虫害。目前,对粪草腐熟以常规的堆肥自然发酵方式为主,耗时长,养分损失大。利用功能微生物制备的腐熟剂能加速粪草腐熟进程和减少养分流失,已经在双孢蘑菇的栽培中应用(石文权等,2010)。可以预见,利用抗病、促进生长等功能性微生物腐熟剂在蘑菇栽培中有广泛的应用前景。

[0007] 主要参考文献

毕于运等,高春雨,王亚静.中国秸秆资源数量估算.农业工程学报,2009,25:211-217.

高利伟,马林,张卫峰.中国作物秸秆养分资源数量估算及其利用状况.农业工程学报,2009,7:173-179.

顾方媛,陈朝银,石家骥.纤维素酶的研究进展与发展趋势.微生物学杂志,2008,28(1):83-87.

梁艳琼,雷照鸣,贺春萍.一株溶磷真菌的分离鉴定及其溶磷能力的初步研.热带作物学报,2011,32(6):1116-1121.

刘成,孙中涛,田林茂,杜金华.黑曲霉产木聚糖酶固态发酵条件及部分酶学性质的研究.生物技术,2007,17(4):82-85.

任克宁,张福元,王莹莹.白腐菌及黑曲霉对玉米秸秆生物降解的研究.中国饲料,2011,(3):35-37.

石文权,贾琦,刘民强.腐熟剂在双孢蘑菇栽培中的应用研究.食用菌,2010,1:33-35.

Haruta S, Cui ZJ, Huang Z. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59: 529-534.

Singh S, Kapoor K. Solubilization of insoluble phosphates by bacteria isolated from different sources. Environ Ecol. 1994, (12): 51-55.

Song OR, Lee SJ, Lee YS. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. Braz J Microbiol. 2008, (39): 151-156.

Zhou X, Smith JA, Oi FM, Koehler PG, Bennett GW, Scharf ME. Correlation of cellulase gene expression and cellulolytic activity throughout the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. Gene, 2007, 1(395): 29-39.

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种解磷真菌及其制备腐熟剂的方法,以及该腐熟剂在堆肥发酵农作物秸秆制备生物磷肥和腐熟蘑菇培养料上的应用。

[0009] 本发明人从磷矿区植物根际土中筛选获得一株能快速腐熟农作物秸秆和蘑菇培养料的解磷真菌,利用该微生物制备的腐熟剂具有快速腐熟农作物秸秆和蘑菇培养料的功能;同时,腐熟的秸秆基质里含有生物量很高的解磷真菌,可直接作为解磷菌肥替代化学磷肥在农业生产中应用。利用该微生物不但能加速蘑菇培养料的腐熟,而且能提高蘑菇产量。

[0010] 本发明人采用筛选解磷微生物的常规方法从云南省晋宁县磷矿厂植物根际土中筛选获得黑曲霉(*Aspergillus niger*) MZ 菌株。*Aspergillus niger* MZ 菌株已于2013年4月12日保存于中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心,保藏号:CGMCC No. 7464,保藏地址为:北京市朝阳区北辰西路1号院 中科院微生物研究所。

[0011] *Aspergillus niger* MZ 菌株在 CA 培养基(NaNO_3 3g, K_2HPO_4 1g, KCl 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, 蔗糖 30g, 琼脂 15g, 补水至 1000ml) 上 25℃ 下培养 7 天,菌落圆形,表面呈深棕色或黑色。分生孢子囊直径约 10-22 μm ,球状,深棕色,随着培养时间的延长逐渐分开成许多单列。分生孢子梗透明,或在朝向孢子囊的部分变暗。分生孢子头二列,附有棕色瓶梗,孢子球状或近球状,直径 3.5-5.0 μm ,深棕色或黑色,外表粗糙。分生孢子大小为 3-5 μm (长)×3-4 μm (宽)。利用引物 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC', 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' 经 PCR 扩增,获得 MZ 菌株的 ITS4 区基因序列,提交到 GeneBank 公共数据库,其序列号为 HQ850370,此序列是鉴定该菌株的主要特征依据。

[0012] 所述的解磷真菌 *Aspergillus niger* MZ 的用途是用于制备 MZ 腐熟剂。

[0013] 一种采用上述解磷真菌制备 MZ 腐熟剂的方法为:将 *Aspergillus niger* MZ 菌株在 PDA 固体培养基上、28℃ 下培养 4 d,用无菌牙签将平板表面的菌丝和孢子刮下并接种到棉籽壳培养基中,28℃ 下培养 4-8 天后即得到 MZ 腐熟剂。

[0014] 所述的棉籽壳培养基由棉籽壳加 PDA 液体培养基混匀制成,含水量为 35%-45%。

[0015] 上述制备的 MZ 腐熟剂用于堆肥发酵农作物秸秆来制备生产生物磷肥。

[0016] 一种利用 MZ 腐熟剂发酵农作物秸秆制备生物磷肥的方法:农作物秸秆经自然风干,粉碎成小于 3cm 的片段,与草碳按重量比为 7:3 混匀,按堆料干重的 0.1%-5% 的比例接种 MZ 腐熟剂,充分混匀后将堆料水分调节到 30%-45%,将堆料在室内按梯形堆垛,堆体的下底长 1-1.5m,上底长 0.5-1m,高 0.5-1m,每 3 天翻堆一次,发酵 18-21 天时终止发酵,将发酵产物在 65℃ 以下干至水分含量小于 5%,粉碎、过筛后即得到生物磷肥。

[0017] 上述制备的 MZ 腐熟剂用于发酵粪草培养料,可加速培养料的腐熟和提高蘑菇产量。

[0018] 一种利用 MZ 腐熟剂发酵粪草培养料的方法,向粪草培养料中,按堆料干重 0.1%-5% 的比例接种 MZ 腐熟剂,充分混匀后,将堆料水分调节到 30%-45%。将堆料在室内按梯形堆垛,堆体的下底长 1-1.5 米,上底长 0.5-1 米,高 0.5-1 米,每 3 天翻堆一次,发酵 6-10 天时获得的发酵产物可用于双孢蘑菇、草菇等栽培。

[0019] 本发明提供的解磷真菌 *Aspergillus niger* MZ 可制备腐熟剂,该腐熟剂可加快秸秆腐熟,具有解磷、生防等特殊功能,通过腐熟农作物秸秆制备的生物有机肥在土壤磷酸盐含量较高的土壤中可替代化学磷肥使用。同时该腐熟剂可用于双孢蘑菇、草菇等培养料的发酵环节中,可加速培养料(粪草)的腐熟进程和减少养分流失,并在抗病、促进生长等方面具有显著效果。本发明提供的解磷真菌在生物肥料及植物培植领域具有巨大的开发潜力。

具体实施方式

[0020] 实施例一: *Aspergillus niger* MZ 菌株的培养

分五组培养且进行对比,将 *Aspergillus niger* MZ 菌株的菌体接种到 PDA 培养基(去皮马铃薯 200g 切碎,用水煮沸 30 分钟后过滤取滤液,蔗糖 20g,琼脂 20g,补水至 1000 ml, pH 自然)斜面上,分别在 20℃、22℃、24℃、26℃、28℃、30℃ 下培养,相继在 4-10 天后获得斜面种子。

[0021] 经对比,最适宜的培养条件为 28℃ 下培养 4 天。

[0022] 实施例二: MZ 腐熟剂的制备

将 *Aspergillus niger* MZ 菌株在 PDA 固体培养基上、28℃ 下培养 4 d,用无菌牙签将平板表面的菌丝和孢子刮下并接种到棉籽壳培养基中,在 28℃ 下培养,实验表明 5-8 天后可得到 MZ 腐熟剂。

[0023] 经实验对比,最佳适宜的培养条件是 28℃ 下培养 4 天。

[0024] 所述的棉籽壳培养基是通过向棉籽壳加 PDA 液体培养基混匀制得,含水量为 35-45%。

[0025] 实施例三: 利用 MZ 腐熟剂发酵农作物秸秆制备生物磷肥

将水稻、小麦、玉米等农作物秸秆经自然风干,粉碎成小于 3 cm 的片段,然后与草碳按重量比为 7:3 的比例混匀后,按堆料干重的 0.1-5% 的比例接种 MZ 腐熟剂,充分混匀后将堆料水分调节到 30%-45%,将堆料在室内按梯形堆垛,堆体的下底长 1-1.5 米,上底长 0.5-1 米,高 0.5-1 米,每 3 天翻堆一次,发酵 18-21 天时终止发酵,将发酵产物在 65℃ 以下烘干或室温下晾干至水分含量小于 5%,粉碎、过筛后即得到生物磷肥。

[0026] 经检测,用此方法制备的生物磷肥, *Aspergillus niger* MZ 的活菌数含量一般在 $1 \sim 9 \times 10^9$ 个 / 克。

[0027] 实施例四: 利用 MZ 腐熟剂发酵粪草培养料

以双孢蘑菇的培养料为例(稻草 30%、玉米秆 15%、麦秆 5%、猪粪 41.7%、尿素 0.3%、石膏 1%、石灰 1%、过磷酸钙 1%),按培养料堆料干重的 0.1-5% 接种 MZ 腐熟剂,充分混匀后将堆料水分调节到 30-45%。将堆料在室内按梯形堆垛,堆体的下底长 1-1.5 米,上底长 0.5-1 米,高 0.5-1 米,每 3 天翻堆一次,发酵 6-10 天时获得的发酵产物用于双孢蘑菇的栽培。

[0028] 实施例五: 本发明制备的生物磷肥在番茄种植中的应用试验

供试作物: 番茄 *Solanum lycopersicum*, 品种: 欧石大红。

[0029] 土壤: 采自滇池富磷区的磷矿土。

[0030] 供试肥料: 活菌数含量为 5.5×10^9 个 / 克的 MZ 生物磷肥; 商品有机肥。

[0031] 试验方法: 用 5% 的次氯酸钠表面灭菌番茄种子 5-8 分钟,用清水清洗 3-4 次除去次氯酸钠后在常温下放置 30 分钟自然干燥。供试土壤充风干后经 2mm 孔径的筛子过筛,按过筛土壤重量的 1% 加入 MZ 生物磷肥并混合均匀,每盆装入混有生物菌肥的土壤 2kg,并将 10 颗油菜种子播入盆栽土壤上层 2cm 深处,浇透水。之后视植物生长需要浇水保持水分,待种子发芽长出 2 片叶时每盆保留 3 株苗。分别以未施用任何肥料和添加等量商品有机肥的处理为对照,每处理 3 个重复。统计番茄种子的发芽率,播种 60 天时测定单株番茄果实数量和重量。

[0032] 试验结果表明: 未施肥料的对照中番茄种子萌发率为 75.43%,施用商品有机肥的

对照中种子萌发率为 93.36%，而施用 MZ 生物磷肥的处理中种子萌发率高达 98.67%，种子萌发率分别比两对照提高了 23.24% 和 5.31%。收获时，未施肥料的对照中单株番茄果实平均数为 13.45 个，总重 1.47kg，单果重 109.29g；施用商品有机肥的对照中单株番茄果实平均数为 12.73 个，总重 1.93kg，单果重 151.61g；而施用 MZ 生物磷肥的处理中单株番茄果实平均数为 13.23 个，总重 2.17kg，单果重 164.02g。可以看出施用 MZ 生物磷肥和商品有机肥的单株番茄个数与不施肥料的相当，但总产量和单果重均高于不施肥料的处理，其中施用 MZ 生物磷肥的单株产量和单果重量最高。

[0033] 实施例六：MZ 腐熟剂在双孢蘑菇栽培中的应用试验

试验方法：在双孢蘑菇的培养料（稻草 30%、玉米秆 15%，麦秆 5%，猪粪 41.7%，尿素 0.3%，石膏 1%，石灰 1%，过磷酸钙 1%）中，按堆料干重 0.5% 的比例接种 MZ 活菌数为 4.5×10^9 个/克的腐熟剂，充分混匀后将堆料水分调节到 30-45%。将堆料在室内按梯形堆垛，堆体的下底长 1-1.5 米，上底长 0.5-1 米，高 0.5-1 米，每 3 天翻堆一次，发酵 8 天时终止发酵。栽培双孢蘑菇时，在拱棚内将培养料铺成 1.5 m × 0.5 m × 0.25 m 大小的样板，常规方法接种双孢蘑菇菌种 As2796、发菌、覆土、出菇管理，记录出菇产量。以未添加腐熟剂而自然发酵的培养料栽培蘑菇的处理为对照，每处理 3 个重复。

[0034] 试验结果表明：经过 MZ 腐熟剂发酵 8 天时的培养料用于栽培双孢蘑菇，产量为 13.37 kg/m²，而常规自然发酵的培养料栽培双孢蘑菇的产量仅为 10.93 kg/m²，表明使用 MZ 腐熟剂可使双孢蘑菇产量提高 22.32%。

<110> 山东泰丰源生物科技有限公司	
<120> 一种解磷真菌及其在生物磷肥制备和蘑菇栽培中的应用	
<140>201310195335.9	
<141>2013-05-24	
<160> 2	
<210> 1	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 1	
TCCTCCGCTT ATTGATATGC	20
<210> 2	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 2	
GGAAGTAAAA GTCGTAACAA GG	22