



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110982748 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201911364735.1

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2019.12.26

C12N 1/20(2006.01)

(83)生物保藏信息

C12N 1/14(2006.01)

CGMCC No.12133 2016.02.18

C05G 3/80(2020.01)

CGMCC No.12134 2016.02.18

A01G 24/20(2018.01)

CGMCC No.12135 2016.02.18

A01G 24/10(2018.01)

CGMCC No.12136 2016.02.18

C12R 1/465(2006.01)

CGMCC No.12137 2016.02.18

C12R 1/38(2006.01)

CGMCC No.12894 2016.08.23

C12R 1/80(2006.01)

CGMCC No.7699 2013.06.14

(71)申请人 北京林业大学

地址 100083 北京市海淀区清华东路35号

申请人 内蒙古绿矿环保科技有限公司

(72)发明人 彭霞薇 代兴和 乔浩亮 周金星

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种用于煤矸石人工生态基质的复合微生物菌剂制备及应用

(57)摘要

本发明公开了一种用于煤矸石人工生态基质的复合微生物菌剂,包括5种放线菌:高温紫链霉菌(*Streptomyces thermoviolaceus*),嗜热淀粉酶链霉菌(*Streptomyces thermodiastaticus*),嗜热一氧化碳链霉菌(*Streptomyces thermocarboxydus*),微白黄链霉菌(*Streptomyces albidoflavus*)和热普通链霉菌(*Streptomyces thermovulgaris*),1种细菌:假单胞菌(*Pseudomonas sp.*),以及1种霉菌:草酸青霉菌(*Penicillium oxalicum*)。该菌剂的制备过程包括:菌种活化、种子液制备、液态复合菌剂制备、固态菌剂制备4个步骤。本发明技术解决了煤矸石中微生物缺少,养分不利于植物吸收利用的问题,为煤矸石及园林绿化废弃物的资源化利用提供了一条新途径,在煤矸石的处理及资源化利用等方面具有广阔的应用前景。

1. 一种用于煤矸石人工生态基质的复合微生物菌剂,所述复合菌剂包括放线菌、细菌和霉菌,其中放线菌为高温紫链霉菌(*Streptomyces thermoviolaceus*),嗜热淀粉酶链霉菌(*Streptomyces thermodiastaticus*),嗜热一氧化碳链霉菌(*Streptomyces thermocarboxydus*),微白黄链霉菌(*Streptomyces albidoflavus*)和热普通链霉菌(*Streptomyces thermovulgaris*),保藏号分别为CGMCC No.12133、CGMCC No.12134、CGMCC No.12135、CGMCC No.12136和CGMCC No.12137,细菌为假单胞菌(*Pseudomonas sp.*),保藏号为CGMCC.No.12894,霉菌为草酸青霉菌(*Penicillium oxalicum*),保藏号为CGMCC.No.7699,均保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,所述复合微生物菌剂中的5种放线菌由各菌株种子液分别等体积混合后进行发酵获得,所述复合微生物菌剂中假单胞菌种子液单独进行液体发酵获得,所述复合微生物菌剂中草酸青霉菌种子液单独液体发酵获得。

2. 一种如权利要求1所述的复合菌剂制备方法,包括如下制备步骤:

(1) 菌株活化:取本发明微生物4℃保存的斜面,5种放线菌分别接种至高氏I号固体平板培养基,在50℃的恒箱中培养3d,1种细菌接种到LB固体平板培养基,在35℃的恒箱中培养2d,1种霉菌接种到PDA固体培养基,在28℃的恒箱中培养4d,实现菌株活化;

(2) 种子液制备:将步骤(1)中经斜面活化的菌种平板,5种放线菌分别转接到200mL无菌ISP2液体培养基中,pH 7.2-7.4,50℃、120rpm摇床条件下培养,1种细菌转接到200mL无菌LB液体培养基中,pH 7.2-7.4,35℃、150rpm摇床条件下培养,1种霉菌转接到400mL无菌PD液体培养基中,自然pH,28℃、180rpm摇床条件下培养,高温紫链霉菌,嗜热淀粉酶链霉菌,热普通链霉菌和假单胞菌培养12h,嗜热一氧化碳链霉菌和微白黄链霉菌培养48h,草酸青霉菌培养96h,获得各菌的种子液;

(3) 液体发酵复合菌剂的制备:上述种子液按10% (v/v) 的接种量接种至已灭菌的发酵罐中,进行扩大发酵培养,5种放线菌在温度50℃、振荡频率120rpm的条件下,高温紫链霉菌,嗜热淀粉酶链霉菌,热普通链霉菌24h,嗜热一氧化碳链霉菌和微白黄链霉菌培养96h,假单胞菌在温度35℃、振荡频率150rpm的条件下培养24h,草酸青霉菌在温度28℃、振荡频率170rpm的条件下培养120h,上述菌液按体积比1:1:1:1:1::1:2混合均匀,即得到液体发酵的复合微生物菌剂。

3. 如权利要求2所述的复合微生物菌剂制备方法,其特征在于:进一步地,将上述复合功能微生物菌剂通过真空冷冻干燥机进行浓缩,使液体发酵液体积减少为原体积一半时停止干燥,即得到复合微生物菌剂浓缩液。

4. 如权利要求3所述的复合微生物菌剂制备方法,其特征在于:进一步地,将粉碎过50目筛子的煤矸石粉与玉米面、米糠按照2:1:1质量比混合后,与菌剂浓缩液按质量与体积比2:1混合,制作固态复合微生物菌剂,黑暗放置10-15天,期间翻动1-2次,即获得固态复合菌剂。

5. 如权利要求1所述复合微生物菌剂在以煤矸石和园林绿化剩余物为主要原料制备人工生态基质中的应用。

6. 如权利要求5所述的应用,其特征在于:以煤矸石和园林绿化废弃物为主要原料,添加蘑菇渣和尿素,使混合物料碳氮比为20-40:1、含水率50%-60%,固态复合菌剂按物料重量的0.1%比例添加到混合物料中,进行煤矸石的堆肥熟化处理。

一种用于煤矸石人工生态基质的复合微生物菌剂制备及应用

技术领域

[0001] 本发明属于环境生物技术领域,具体涉及一种用于煤矸石人工生态基质的复合微生物菌剂的制作备及其应用。

背景技术

[0002] 煤矸石是煤炭生产中的伴生产物,其产量为煤炭生产量的10%-20%,是我国最大的工业固体废物之一。煤矸石的自然堆放不但占用了大量土地,还对周边的环境和地下水造成不可逆的污染。煤矸石的主要处理方式有填埋,煤矸石发电,工业提炼某些物质,以及建筑业制砖、水泥等。近年来利用煤矸石作为土壤改良剂成分或制备复合肥的也开始见报道,但一般用量都相对较少,并不能大量的对煤矸石进行消纳,如何优化和正确处理煤矸石的问题已经成为我国经济可持续发展中所必须解决的重大能源和环境问题。

[0003] 煤矸石中含有一定比例的有机质、种类丰富的重金属元素和微量元素,也含有植物生长所需的碳、氮、磷、钾等元素,此外煤矸石粉碎物具有不同的粒径组成、孔隙度相对较大、具有一定的保水性,有效水利用率较高,上述特征使其作为土壤的资源化利用成为可能。

[0004] 虽然煤矸石中含有一定量的可供植物生长的养分元素,但大部分元素不能被植物直接吸收利用,需要采取一定的处理技术使养分释放出来,从而发挥其作用。而且在利用时需要与其他材料配合使用才能更好地发挥作用,实现资源化利用。中国专利(公开号:CN109438116A)公开了一种制备土壤改良剂的方法,将煤矸石超微活化,与草木灰在600-900℃高温条件焙烧0.5-2h,再与风化煤或有机肥复配造粒制得。中国专利(公开号:CN108774532A)公开了一种基于煤矸石和硼泥的土壤改良剂及其制备方法,是将粉碎后过120目筛的煤矸石与NaOH按一定比例混合均匀于650℃焙烧30min,与高温焙烧的硼泥及微生物菌剂混合制备土壤改良剂,用于白浆土的土壤改良。上述两个专利制备土壤改良剂时煤矸石均需要高温条件焙烧,从而大大增加了能耗和成本。

[0005] 煤矸石中微生物种类和数量均显著低于土壤等植物生长基质材料,因此在利用煤矸石制备人工生态基质时必须添加其他基质材料以及微生物。研究表明,一些功能微生物具有溶解矿石或活化土壤中难以被植物直接利用的养分,也可以通过固定大气中的氮气、产生多种促进植物生长的生长调节剂等方式提高植物生长环境中的养分条件、改善植物生存环境从而有利于植物生长。

[0006] 本发明专利涉及的微生物包括具有高效利用植物纤维素、高效解磷、溶解煤矸石、促进植物生长作用的多种复合微生物,复合微生物菌剂用于以煤矸石为主要原料的人工基质中,能够盘活基质中多种营养成分,使其中的养分得到有效释放,促进人工基质团聚体结构形成,在相对温和的条件下起到熟化煤矸石的作用,使人工基质成为有活性、有生命力的生态基质,从而实现最大限度的消纳煤矸石。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是：提供一种用于煤矸石人工生态基质的复合微生物功能菌剂，解决煤矸石中养分难以直接被植物利用、活性微生物种类和数量少的问题，可在煤矸石制备人工生态基质中使其得到熟化，其中难利用养分得到有效释放，增加煤矸石人工基质中活性微生物数量，实现煤矸石资源化利用效果。

[0008] 本发明提供的技术方案是：一种具有使煤矸石形成人工生态基质性能的复合微生物功能菌剂，所述复合菌剂包括放线菌、细菌和霉菌，其中放线菌为高温紫链霉菌 (*Streptomyces thermoviolaceus*)，嗜热淀粉酶链霉菌 (*Streptomyces thermodiastaticus*)，嗜热一氧化碳链霉菌 (*Streptomyces thermocarboxydus*)，微白黄链霉菌 (*Streptomyces albidoflavus*) 和热普通链霉菌 (*Streptomyces thermovulgaris*)，保藏号分别为CGMCC No.12133、CGMCC No.12134、CGMCC No.12135、CGMCC No.12136和CGMCC No.12137，细菌为假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*)，保藏号为CGMCC.No.12894，霉菌为草酸青霉菌 (*Penicillium oxalicum*)，保藏号为CGMCC.No.7699，上述菌均保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，所述复合菌剂由各菌株发酵液按体积1:1:1:1:1:1:2混合获得。

[0009] 本发明所述复合菌剂中高温紫链霉菌 (*Streptomyces thermoviolaceus*)，嗜热淀粉酶链霉菌 (*Streptomyces thermodiastaticus*)，嗜热一氧化碳链霉菌 (*Streptomyces thermocarboxydus*)，微白黄链霉菌 (*Streptomyces albidoflavus*)，热普通链霉菌 (*Streptomyces thermovulgaris*) 分别编号为ST1、ST2、ST3、ST4、ST5，复合菌剂中假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*)，菌株编号为XKS1，复合菌剂中的草酸青霉菌 (*Penicillium oxalicum*)，菌株编号为TJ2，均已在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC) 保藏，(保藏地址是：北京市朝阳区北辰西路1号院3号，邮政编码：100101)，其保藏号分别为CGMCC No.12133、CGMCC No.12134、CGMCC.12135No、CGMCC No.12136、CGMCC No.12137、CGMCC.No.12894、CGMCC.No.7699，经检测均存活。

[0010] 本发明还提供所述复合菌剂的制备方法，其步骤如下：

[0011] (1) 菌株活化：取本发明微生物4℃保存的斜面，5种放线菌分别接种至高氏I号固体平板培养基，在50℃的恒箱中培养3d，1种细菌接种到LB固体平板培养基，在35℃的恒箱中培养2d，1种霉菌接种到PDA固体培养基，在28℃的恒箱中培养4d，实现菌株活化；

[0012] (2) 种子液制备：将步骤(1)中经斜面活化的菌种平板，5种放线菌分别转接到200mL 无菌ISP2液体培养基中，pH 7.2-7.4，50℃、120rpm摇床条件下培养，1种细菌转接到200mL无菌LB液体培养基中，pH 7.2-7.4，35℃、150rpm摇床条件下培养，1种霉菌转接到400mL无菌PD液体培养基中，自然pH，28℃、180rpm摇床条件下培养，高温紫链霉菌，嗜热淀粉酶链霉菌，热普通链霉菌和假单胞菌培养12h，嗜热一氧化碳链霉菌和微白黄链霉菌培养48h，草酸青霉菌培养96h，获得各菌的种子液；

[0013] (3) 液体发酵复合菌剂的制备：上述种子液按10% (v/v) 的接种量接种至已灭菌的发酵罐中，进行扩大发酵培养，5种放线菌在温度50℃、振荡频率120rpm的条件下，高温紫链霉菌，嗜热淀粉酶链霉菌，热普通链霉菌24h，嗜热一氧化碳链霉菌和微白黄链霉菌培养96h，假单胞菌在温度35℃、振荡频率150rpm的条件下培养24h，草酸青霉菌在温度28℃、振荡频率170rpm的条件下培养120h，上述菌液按体积比1:1:1:1:1:1:2混合均匀，即得到

液体发酵的复合微生物菌剂；

[0014] 进一步地,本发明还提供固态复合菌剂的制备方法:将步骤(3)中制得的复合菌液,通过真空冷冻干燥机进行浓缩,获得复合微生物菌剂浓缩液,将煤矸石粉、玉米面、米糠按照质量比2:1:1混合后作为菌剂浓缩液的吸附剂,并与菌剂浓缩液按质量与体积比 2:1混合,制作固态复合微生物菌剂,黑暗放置10-15天,期间翻动1-2次,即获得固态复合菌剂,可用于煤矸石制备人工生态基质。

[0015] 本发明具有以下有益效果:

[0016] 本发明涉及菌株种类多,功能全面,其中5株放线菌是从园林废弃物与动物粪便混合材料高温堆肥期样品中分离而来,具有耐高温、高效降解纤维素特性的混合菌剂,在对园林废弃物中高分子物质降解过程中产生腐殖质、小分子营养物质等,1株假单胞菌具有吸附重金属、产生植物促生因子及固氮作用,1株草酸青霉菌具有高效解磷,解离煤矸石的作用,各菌株间没有拮抗作用且具有良好的协同作用,这种协同作用可有效的加速煤矸石养分的释放,提高煤矸石生态基质的活性微生物种类和数量,改善基质理化性质,从而使煤矸石制备人工生态基质发挥优良的特性,使植物健康生长。

[0017] 将本发明所述复合菌剂应用于煤矸石与园林废弃物混合基质体系中,与不添加复合菌剂的对照基质相比,微生物菌群数量大大提高,基质养分更高,植物种子发芽率及株高、生物量均明显加快。

[0018] 本发明技术解决了煤矸石中微生物缺少,养分不利于植物吸收利用的问题,不仅为煤矸石及园林绿化废弃物的资源化利用提供了一条新途径,而且生产的复合菌剂具有对环境友好,生产成本低的特点,产品还具有明显改善土壤环境质量、促进植株生长的功能,可应用于煤矸石人工生态基质的制备,在煤矸石的处理及资源化利用等方面具有广阔的应用前景。

具体实施方式

[0019] 下面通过具体实施方式的详细描述来进一步阐明本发明,但并不是对本发明的限制,仅仅作示例说明。

[0020] 实施例1菌株之间拮抗作用研究

[0021] 将上述5株放线菌分别与假单菌两两划线在含有等体积的高氏I号和LB固体培养基上,5株放线菌分别与草酸青霉菌两两划线在含有等体积的高氏I号和PDA固体培养基上,假单胞杆与草酸青霉菌两两划线在含有等体积的LB和PDA固体培养基上,两两划线但不相交,30℃,培养4d。两菌交叉处如形成无菌区,说明两菌之间产生了抑菌圈,两菌彼此拮抗,不能组合到一起,如果两菌间没有形成无菌区,则说明两菌不彼此拮抗,可以组合。从结果来看,各个菌株之间没有拮抗作用,不会互相干扰,影响菌种生长,因此可以混合制作为复合菌剂。

[0022] 表1菌株拮抗实验结果

菌株	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	XKS1	TJ2
ST1	-	-	-	-	-	-	-
ST2	-	-	-	-	-	-	-
ST3	-	-	-	-	-	-	-
ST4	-	-	-	-	-	-	-
ST5	-	-	-	-	-	-	-
XKS1	-	-	-	-	-	-	-
TJ2	-	-	-	-	-	-	-

[0024] 注：“+”表示阳性,有拮抗作用;“-”表示阴性,无拮抗作用

[0025] ST1: *Streptomyces thermoviolaceus*; ST2: *Streptomyces thermospinosporus*; ST3: *Streptomyces albidoflavus*; ST4: *Streptomyces thermocarboxydus*; ST5: *Streptomyces hydrogenans*; XKS1: *Pseudomonas sp.*; TJ2: *Penicillium oxalicum*

[0026] 实施例2不同菌株组合对煤矸石人工生态基质理化指标及微生物的影响

[0027] 以本发明所述功能微生物菌剂中5种放线菌(包括高温紫链霉菌、嗜热淀粉酶链霉菌、嗜热一氧化碳链霉菌、微白黄链霉菌、热普通链霉菌),1种细菌(假单胞菌),1种霉菌(草酸青霉)。将5株链霉菌分别接种到无菌ISP2液体培养基中,pH 7.2-7.4,50℃、120rpm摇床条件下培养,1株假单胞菌接种到无菌LB液体培养基中,pH 7.2-7.4,30℃、150rpm摇床条件下培养12h,1株草酸青霉菌接种到马铃薯液体培养基中,pH值自然,28℃、170rpm摇床条件下培养96h。设置不同菌株组合:处理1,5种放线菌等体积混合,处理2,5种链霉菌与1株假单菌等体积混合,处理3,5种放线菌与1株草酸青霉菌按体积比1:1:1:1:1:2混合,处理4,7株菌按体积比1:1:1:1:1:1:2混合,添加到煤矸石与玉米秸秆粉碎物混合基质上,各处理菌剂添加量为物料重量的0.3%,以不接菌剂的处理为对照,调整物质含水量为55%-60%,将上述原料表面加一层塑料膜覆盖,期间每隔3-5天翻堆一次,然后再覆盖塑料膜,保持30-40天。结束后取样测定各处理相关指标。结果见表2。由表2可以看出,不添加菌剂的对照,基质中有机质、总氮、总磷、总钾及微生物含量都低于其他处理,添加7种功能菌剂的处理中有机质和养分的转化效率高,微生物更为活跃,因此其有机质、总氮、总磷、总钾及微生物含量均明显高于其他处理。

[0028] 表2不同菌剂组合添加对物料相关指标影响

指标	有机质	总氮	总磷	总钾	微生物量
处理	(%)	(%)	(g/kg)	(g/kg)	(10^6 个/kg)
[0029] 对照	15.32	1.53	0.99	1.80	2.57
处理1	16.87	2.09	1.07	2.01	12.66
处理2	17.26	2.31	1.36	2.13	19.64
处理3	18.39	2.52	1.98	2.15	21.27
处理4	19.66	2.96	2.43	2.36	28.56

[0030] 实施例3复合菌剂的制备

[0031] (1) 菌株活化:取本发明微生物4℃保存的斜面,5种放线菌分别接种至高氏I号固体平板培养基,在50℃的恒箱中培养3d,1种细菌接种到LB固体平板培养基,在35℃的恒箱中培养2d,1种霉菌接种到PDA固体培养基,在28℃的恒箱中培养4d,实现菌株活化。

[0032] (2) 种子液制备:将步骤(1)中经斜面活化的菌种平板,5种放线菌分别转接到200mL 无菌ISP2液体培养基中,pH 7.2-7.4,50℃、120rpm摇床条件下培养,1种细菌转接到200mL无菌LB液体培养基中,pH 7.2-7.4,35℃、150rpm摇床条件下培养,1种霉菌转接到400mL无菌PD液体培养基中,自然pH,28℃、180rpm摇床条件下培养,高温紫链霉菌,嗜热淀粉酶链霉菌,热普通链霉菌和假单胞菌培养12h,嗜热一氧化碳链霉菌和微白黄链霉菌培养48h,草酸青霉菌培养96h,获得各菌的种子液。

[0033] (3) 液体发酵复合菌剂的制备:上述种子液按10%(v/v)的接种量接种至已灭菌的发酵罐中,进行扩大发酵培养,5种放线菌在温度50℃、振荡频率120rpm的条件下,高温紫链霉菌,嗜热淀粉酶链霉菌,热普通链霉菌24h,嗜热一氧化碳链霉菌和微白黄链霉菌培养96h,假单胞菌在温度35℃、振荡频率150rpm的条件下培养24h,草酸青霉菌在温度28℃、振荡频率170rpm的条件下培养120h,上述菌液按体积比1:1:1:1:1:1:2混合均匀,即得到液体发酵的复合微生物菌剂。

[0034] (4) 固态复合菌剂的制备:将步骤(3)中制得的复合菌液,通过真空冷冻干燥机进行浓缩到原体积的二分之一,获得复合微生物菌剂浓缩液,将煤矸石粉、玉米面、米糠按照质量比2:1:1混合后作为菌剂浓缩液的吸附剂,并与菌剂浓缩液按质量与体积比2:1混合,制作固态复合微生物菌剂,黑暗放置10-15天,期间翻动1-2次,即获得固态复合菌剂,可用于煤矸石制备人工生态基质。

[0035] 实施例4复合微生物菌剂添加对植物生长的影响

[0036] 取过4目筛子的煤矸石粉碎物60份、植物来源有机质40份、尿素1.5份、功能微生物菌剂0.3%份制备的人工生态基质,以市售的植物营养土(北林科技有限公司提供)、未添加功能菌剂的基质、纯煤矸石基质为对照,记为处理1、处理2、处理3和处理4,在上述基质中种植高羊茅种子,测定不同基质对高羊茅生物量积累以及光合参数的影响,生物量包括地上部干物质质量和地下部干物质质量,光合参数包括净光合速率、气孔导度、蒸腾速率和胞间CO₂浓度。结果见表3。由表3可以看出,添加功能微生物菌剂的人工生态基质在地上部干

物质量、地下部干物质量、净光合速率、气孔导度、蒸腾速率均明显高于未添加功能菌剂基质和纯煤矸石基质,比市售的植物营养土略低,但差异不大,说明添加功能微生物菌剂的煤矸石人工生态基质可以作为种植植物的基质使用。

[0037] 表3不同基质对植物生物量及光合参数的影响

基质种类	高羊茅地上干重(g)	高羊茅地下干重(g)	净光合速率	气孔导度	蒸腾速率	胞间 CO ₂ 浓度
处理 1	4.22	0.45	6.72	0.14	2.88	326.46
处理 2	4.49	0.51	7.25	0.16	2.98	289.63
处理 3	3.27	0.39	5.44	0.11	2.31	338.23
处理 4	1.25	0.32	1.82	0.045	0.87	358.74

[0039] 注:[1][2][3]单位: $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, [4]单位: $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。