



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103588544 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 19

(21) 申请号 201210286744. 5

(22) 申请日 2012. 08. 13

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO. 5812 2012. 02. 27

(71) 申请人 北京中农广寰农业科技有限公司

地址 100039 北京市丰台区西四环中路 72  
号金名仕假日饭店 510 室

(72) 发明人 陈舒

(74) 专利代理机构 北京润平知识产权代理有限  
公司 11283

代理人 王凤桐 周建秋

(51) Int. Cl.

C05G 3/00 (2006. 01)

C05F 11/08 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种微生物有机肥及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明提供了一种微生物有机肥的制备方法,该方法包括如下步骤:(1)厚垣孢子制备步骤,所述厚垣孢子制备步骤中,将保藏号为CGMCC NO:5812的哈茨木霉菌株进行液体深层发酵以产生厚垣孢子;(2)粪肥颗粒制备步骤,所述粪肥颗粒制备步骤中,将粪便、腐植酸和水混合,并接种除臭菌种进行发酵除臭,然后通过造粒和干燥得到粪肥颗粒;(3)混合步骤,所述混合步骤中,将所述粪肥颗粒与所述厚垣孢子混合。本发明还提供了如上所述的制备方法得到的微生物有机肥。本发明还提供了如上所述的微生物有机肥在防治植物病害中的用途。通过上述技术方案,本发明能够显著地提高木霉菌防治病害的效果。

1. 一种微生物有机肥的制备方法,该方法包括如下步骤:

(1) 厚垣孢子制备步骤,所述厚垣孢子制备步骤中,将一种木霉菌株进行液体深层发酵以产生厚垣孢子,其中,该木霉菌株为哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)的菌株,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为 CGMCC NO :5812 ;

(2) 粪肥颗粒制备步骤,所述粪肥颗粒制备步骤中,将粪便、腐植酸和水混合,并接种除臭菌种进行发酵除臭,然后通过造粒和干燥得到粪肥颗粒 ;

(3) 混合步骤,所述混合步骤中,将所述粪肥颗粒与所述厚垣孢子混合。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其中,所述液体深层发酵的操作包括如下步骤:

(1) 接种步骤,在所述接种步骤中,将所述木霉菌株的分生孢子和 / 或菌丝体接种到液体培养基中 ;

(2) 发酵步骤,在所述发酵步骤中,将接种了所述木霉菌株的分生孢子和 / 或菌丝体的液体培养基在发酵罐中进行发酵,所述发酵的条件包括:发酵第 0-40 小时的发酵温度为 27.5-28.5℃ ;发酵第 40 小时以后的发酵温度为 25.5-26.5℃ ;发酵第 0-10 小时的通气量为 1:0.55-0.65 体积:(体积·分钟);发酵第 10-40 小时的通气量为 1:0.9-1.1 体积:(体积·分钟),发酵第 40 小时以后的通气量为 1:0.55-0.65 体积:(体积·分钟);搅拌速度为 175-185rpm。

3. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其中,所述液体培养基含有由以下重量百分比混合得到的物料:2-3.5% 的淀粉、1-2% 的酵母粉、4-8% 的玉米浆、0.1-0.5% 的  $\text{CaCO}_3$ 、0.01-0.02% 的  $\text{Zn}^{2+}$ 、0.01-0.03% 的  $\text{Mg}^{2+}$  和余量的水。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的制备方法,其中,所述发酵的条件还包括:在发酵第 60-63 小时,相对于每 100 升的发酵液,补加 0.45-0.55kg 的淀粉。

5. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其中,所述粪肥颗粒制备步骤的条件包括:将 200-400kg 的鸡粪、600-800kg 的腐植酸和 200-600kg 的水混合,并接种除臭菌种 90-110g 后在 15-40℃ 下发酵除臭 9-11 天,然后滚筒造粒和干燥后得到的直径 4-5mm 的粪肥颗粒。

6. 根据权利要求 1 或 5 所述的制备方法,其中,所述混合步骤的操作包括:将 900-1100kg 的粪肥颗粒、0.8-1.2kg 的所述厚垣孢子和 1-3kg 的糖稀在不高于 60℃ 的温度下进行包衣。

7. 根据权利要求 1-6 中任意一项所述的制备方法得到的微生物有机肥。

8. 权利要求 7 所述的微生物有机肥在防治植物病害中的用途。

9. 根据权利要求 8 所述的用途,其中,所述植物病害为土传植物病害。

10. 根据权利要求 9 所述的用途,其中,所述土传植物病害为棉花黄萎病、棉花枯萎病、水稻立枯病和香蕉枯萎病中的至少一种。

## 一种微生物有机肥及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及农业生物技术领域,具体地,涉及一种微生物有机肥、该微生物有机肥的制备方法和该微生物有机肥的用途。

### 背景技术

[0002] 有机肥主要是由畜禽粪便、作物秸秆、腐植酸等有机物组成,能够为作物生长提供所需营养,具有改善土壤结构,持续地释放养分的环境友好型肥料。同时有机肥也是能够为微生物的繁殖提供良好条件的介质,是当前肥料科学发展的重要方向。

[0003] 木霉菌 (*Trichoderma* spp.) 属半知菌亚门,丝孢纲,丛梗孢目,粘孢菌类,是一类普遍存在的腐生真菌,是真菌类中最有潜力的植物病害生物防治菌株,可用来防治多种植物真菌性病害。常见的木霉菌种类有哈茨木霉 (*T. harzianum*)、哈氏木霉 (*T. hamatum*)、多孢木霉 (*T. polysporum*)、康氏木霉 (*T. koningii*)、拟康氏木霉 (*T. pseudokoningii*)、绿色木霉 (*T. viride*) 和长枝木霉 (*T. longibrachiatum*) 等。在众多种类中,绿色木霉和哈茨木霉在植病防治防治效果方面表现尤为突出,是目前生产上主要应用的菌株。

[0004] 木霉菌在其生长周期内可以产生三种繁殖体,包括菌丝体、厚垣孢子和分生孢子。木霉菌的分生孢子形成于瓶形小梗上,分生孢子近球形,椭圆形,或短倒卵形,壁光滑或细胞壁上明显而微小粗糙突起,浅色或无色,大小约  $3.5 \times 3.2 \mu\text{m}$ 。木霉菌常常形成厚垣孢子,在基内菌丝上间生,或者在营养菌丝侧枝的尖端端生,圆形或椭圆形,无色至浅黄色或绿色,大小约  $9.5 \times 11.5 \mu\text{m}$ ,表面光滑,细胞壁有加厚现象,无性生殖产生,通常有耐不良环境条件的能力。厚垣孢子是木霉菌重要的繁殖体形式。木霉菌厚垣孢子在土壤中存活能力要优于分生孢子,至少能存活 20 月。

[0005] 土传病害是我国目前农业生产中的主要病害之一,特别是在保护地、多年连作地,土传病害常常导致严重减产,甚至毁苗绝收。木霉菌能够增加作物根际有益微生物的菌群数量,改善作物根际的微生物菌群结构,作为微生物有机肥的组成部分,能够起到防治病害的作用,但是防治病害的效果仍有待提高。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是提高木霉菌防治病害的效果,提供一种具有更好的防治病害效果的微生物有机肥。

[0007] 为了实现上述目的,本发明提供了一种微生物有机肥的制备方法,该方法包括如下步骤:(1) 厚垣孢子制备步骤,所述厚垣孢子制备步骤中,将一种木霉菌株进行液体深层发酵以产生厚垣孢子,其中,该木霉菌株为哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 的一个菌株,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为 CGMCC NO:5812;(2) 粪肥颗粒制备步骤,所述粪肥颗粒制备步骤中,将粪便、腐植酸和水混合,并接种除臭菌种进行发酵除臭,然后通过造粒和干燥得到粪肥颗粒;(3) 混合步骤,所述混合步骤中,将所述粪肥颗粒与所述厚垣孢子混合。

[0008] 本发明还提供了如上所述的制备方法得到的微生物有机肥。

[0009] 本发明还提供了如上所述的微生物有机肥在防治植物病害中的用途。

[0010] 通过上述技术方案,本发明能够显著地提高木霉菌防治病害的效果,例如,相对于使用购自中国农业微生物保藏管理中心的商品牌号为 ACCC30371 哈茨木霉菌种制备的微生物有机肥,本发明的微生物有机肥能够将棉花黄萎病的病情指数降低 25% 以上。

[0011] 本发明的其他特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

[0012] 生物保藏

[0013] 本发明的菌株的分类命名为哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*),于 2012 年 2 月 27 日被保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(地址: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,邮政编码:100101)(保藏单位的缩写为 CGMCC),保藏编号为 CGMCC:5812。

### 具体实施方式

[0014] 以下对本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是,此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明,并不用于限制本发明。

[0015] 本发明提供了一种微生物有机肥的制备方法,该方法包括如下步骤:(1)厚垣孢子制备步骤,所述厚垣孢子制备步骤中,将一种木霉菌株进行液体深层发酵以产生厚垣孢子,其中,该木霉菌株为哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)的一个菌株,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为 CGMCC NO:5812;(2)粪肥颗粒制备步骤,所述粪肥颗粒制备步骤中,将粪便、腐植酸和水混合,并接种除臭菌种进行发酵除臭,然后通过造粒和干燥得到粪肥颗粒;(3)混合步骤,所述混合步骤中,将所述粪肥颗粒与所述厚垣孢子混合。

[0016] 其中,所述木霉菌株的生理状态为菌丝体、厚垣孢子和分生孢子中的至少一种。

[0017] 其中,所述液体深层发酵的操作可以按照常规的液体深层发酵方法进行,优选情况下,所述液体深层发酵的操作包括如下步骤:(1)接种步骤,在所述接种步骤中,将如上所述的木霉菌株的分生孢子和/或菌丝体接种到液体培养基中;(2)发酵步骤,在所述发酵步骤中,将接种了所述木霉菌株的分生孢子和/或菌丝体液体培养基在发酵罐中进行发酵。

[0018] 其中,所述木霉菌株的分生孢子和/或菌丝体可以使用常规的斜面培养法获得,例如,可以将如上所述的木霉菌株的菌丝体接种在 PDA 培养基(含有马铃薯 180-220g/L,葡萄糖 18-22g/L,琼脂 10-25g/L)上,在 27-29℃下培养 5-7 天,即可得到大量附着在培养基上的分生孢子和/或菌丝体,可以将斜面培养结束的培养基挖块以得到用于接种的分生孢子和/或菌丝体。其中,也可以将斜面培养结束的培养基挖块并接种于液体培养基中扩大培养,得到扩大培养的分生孢子和/或菌丝体,将扩大培养的分生孢子和/或菌丝体作为用于接种的分生孢子和/或菌丝体。

[0019] 其中,所述发酵的条件可以为常规的液体深层发酵条件,优选情况下,所述发酵的条件包括:发酵第 0-40 小时的发酵温度为 27.5-28.5℃;发酵第 40 小时以后的发酵温度为 25.5-26.5℃;发酵第 0-10 小时的通气量为 1:0.55-0.65 体积:(体积·分钟);发酵第 10-40 小时的通气量为 1:0.9-1.1 体积:(体积·分钟),发酵第 40 小时以后的通气量为

1:0.55-0.65 体积:(体积·分钟);搅拌速度为 175-185rpm。

[0020] 其中,所述液体培养基可以为常规的适用于木霉菌的液体深层发酵的培养基,如 ZL200610057339.0 中所记载的培养基,优选情况下,所述液体培养基含有由以下重量百分比混合得到的物料:2-3.5%的淀粉、1-2%的酵母粉、4-8%的玉米浆、0.1-0.5%的  $\text{CaCO}_3$ 、0.01-0.02%的  $\text{Zn}^{2+}$ 、0.01-0.03%的  $\text{Mg}^{2+}$  和余量的水。

[0021] 其中,为了进一步提高厚垣孢子的产量,所述发酵的条件还包括:在发酵第 60-63 小时,相对于每 100 升的发酵液,补加 0.45-0.55kg 的淀粉。

[0022] 其中,所述发酵进行的总时间可以为进行木霉菌发酵常规采用的时间,优选情况下,在发酵的第 100-120 小时左右结束发酵,此时,90%以上的菌丝体都形成了厚垣孢子,因而可以进一步提高厚垣孢子的产量。

[0023] 其中,结束发酵以后,可以通过过滤、离心和干燥等方法从结束发酵的发酵液中分离得到厚垣孢子,也可以直接将结束发酵的发酵液作为含有厚垣孢子的产品使用。

[0024] 其中,所述粪肥颗粒可以为常规使用的各种粪肥颗粒,例如所述粪肥颗粒制备步骤的条件包括:将 200-400kg 的鸡粪、600-800kg 的腐殖酸和 200-600kg 的水混合,并接种除臭菌种 90-110g 后在 15-40℃下发酵除臭 9-11 天,然后滚筒造粒和干燥后得到的直径 4-5mm 的粪肥颗粒。其中,所述除臭菌种可以为常规使用的、能商购得到的各种用于除臭的菌种。例如,可以使用购自河南宝融生物科技有限公司的 BM 菌剂-发酵剂或购自郑州基业生物工程有限公司的速腐剂。其中,除臭菌种的重量是以干重计算的。

[0025] 其中,将所述厚垣孢子与粪肥颗粒混合的操作可以为常规的混合操作,混合后的物料即可作为微生物有机肥使用,为了提高混合后的物料的均匀性和储藏性能,优选情况下,所述混合步骤的操作可以包括:将 900-1100kg 的粪肥颗粒、0.8-1.2kg 的本发明所述的木霉菌种的厚垣孢子和 1-3kg 的糖稀在不高于 60℃的温度下进行包衣,得到包衣产物。所得到的包衣产物具有较好的均匀性和储藏性能,可以作为优选的微生物有机肥使用。其中,优选情况下,每克微生物有机肥中的厚垣孢子数量不少于  $10^5$  个厚垣孢子。

[0026] 本发明还提供了如上所述的微生物有机肥在防治植物病害中的用途。本发明提供的微生物有机肥可以对常规的其它木霉菌能够防治的植物病害均起到有效防治的作用。优选地,本发明提供的微生物有机肥对土传植物病害具有更好的防治效果;特别优选地,本发明提供的微生物有机肥对棉花黄萎病、棉花枯萎病、水稻立枯病和香蕉枯萎病具有更好的防治效果。即,优选所述土传植物病害为棉花黄萎病、棉花枯萎病、水稻立枯病和香蕉枯萎病中的至少一种。

[0027] 其中,防治病害的操作可以按照常规的利用木霉菌防治病害的操作进行,例如,可以将所述微生物有机肥直接施用于土壤来防治病害。

[0028] 其中,将所述微生物有机肥施用于田间时,以厚垣孢子的量计算,施用量可以在很大范围内变化,例如可以为  $5 \times 10^4$  至  $2 \times 10^5$  个厚垣孢子/平方米。

[0029] 以下将通过实施例对本发明进行详细描述。

[0030] 实施例 1

[0031] 取削皮后的马铃薯 20g 煮沸 20 分钟取汁,将汁与 2g 葡萄糖、1.5g 琼脂和水配成 100ml,装瓶灭菌后冷却得到 PDA 培养基。

[0032] 将 195kg 的淀粉、130kg 的酵母粉、325kg 的玉米浆、19.5kg 的  $\text{CaCO}_3$ 、2.4kg (以使

$Zn^{2+}$  为 0.015 重量 %) 的  $ZnSO_4$ 、6.5kg 的  $MgSO_4$  (以使  $Mg^{2+}$  为 0.02 重量 %), 加水至  $6.5m^3$ , 混匀并灭菌, 得到液体培养基。

[0033] 将保藏号为 CGMCC NO:5812 哈茨木霉菌株接种于 PDA 培养基,  $28^\circ C$  下培养 6 天; 将接种并培养后的 PDA 培养基挖块接种于摇瓶液体培养基中 (100ml 液体培养基接种 PDA 培养基生长的菌苔  $1cm^2$ ), 在  $28^\circ C$  和转速 200rpm 的条件下, 培养 24 小时, 作为发酵种子罐接种体; 将培养好的摇瓶接种体接入灭菌后的种子罐培养基中 (接种量 2% (v/v)), 在  $28^\circ C$  和转速 180rpm 的条件下, 培养 24 小时, 成为发酵种子; 将发酵种子接入发酵罐培养基中进行控制发酵 (接种量 10% (V/V))。发酵罐中的发酵条件为: 发酵第 0-40 小时的发酵温度为  $28^\circ C$ ; 发酵第 40 小时以后的发酵温度为  $26^\circ C$ ; 发酵第 0-10 小时的通气量为 1:0.6 体积:(体积·分钟); 发酵第 10-40 小时的通气量为 1:1 体积:(体积·分钟), 发酵第 40 小时以后的通气量为 1:0.6 体积:(体积·分钟); 搅拌速度为 180rpm。

[0034] 在发酵罐的发酵过程中进行补料。即于发酵第 62 小时时, 相对于每 100 升的发酵液, 补加 0.5kg 的淀粉。

[0035] 发酵第 110 小时时, 90% 以上菌丝都形成厚垣孢子, 发酵液变稀, 将此时的发酵液压滤并将收集压滤得到的滤物干燥, 得到厚垣孢子。将该厚垣孢子进行显微形态观察, 证实该厚垣孢子具有典型的哈茨木霉的厚垣孢子形态。

[0036] 将 300kg 的鸡粪、700kg 的腐殖酸和 330kg 的水混合, 并接种除臭菌种 (购自河南宝融生物科技有限公司的 BM 菌剂-发酵剂) 100g 后在  $15-40^\circ C$  下发酵除臭 10 天, 然后滚筒造粒和干燥后得到的直径 4.5mm 的粪肥颗粒。

[0037] 将 900-1100kg 的本实施例得到的粪肥颗粒、0.8-1.2kg 的本实施例得到的哈茨木霉的厚垣孢子和 1-3kg 的糖稀在不高于  $60^\circ C$  的温度下进行包衣, 得到包衣产物。

[0038] 对比例 1

[0039] 采用实施例 1 的方法制备包衣产物, 不同的是, 所用的哈茨木霉菌种为购自中国农业微生物保藏管理中心的商品牌号为 ACCC30371 的哈茨木霉菌种。

[0040] 测试实施例 1

[0041] 将实施例 1 和对比例 1 得到的包衣产物分别作为微生物有机肥 1 和微生物有机肥 2, 以厚垣孢子的量计算, 施用量为  $1 \times 10^5$  个厚垣孢子 / 平方米, 将无机化肥 (每亩施尿素 21kg, 过磷酸钙 52kg, 硫酸钾 11kg) 作为常规施肥, 按照文献 (利用木霉菌防治棉花黄萎病, 植物保护学报, 第 30 卷, 2003 年第 3 期, 284-288 页) 中的方法, 于 2010 年在新疆石河子地区, 对比了微生物有机肥 1、微生物有机肥 2 和常规施肥对棉花黄萎病的防治效果、对棉花产量的影响和对棉花品质影响, 结果如表 1-3 所示。结果证明, 本发明的微生物有机肥能够显著地提高木霉菌防治病害的效果并提高棉花的产量和品质。

[0042] 表 1 微生物有机肥对棉花黄萎病的防治作用

[0043]

施肥	7月25日测量		8月14日测量		8月30日测量	
	发病率(%)	病情指数(%)	发病率(%)	病情指数(%)	发病率(%)	病情指数(%)
微生物有机肥1	13.50	5.29	45.20	23.5	46.86	32.59
微生物有机肥2	20.51	10.12	60.10	40.12	70.22	50.32
常规施肥	30.89	18.44	83.09	75.43	95.38	80.00

[0044] 表2:微生物有机肥对棉花产量的影响

[0045]

施肥	籽棉重 (30铃)	皮棉重 (g)	衣分 (%)	单铃重 (g)	百粒籽棉 (g)	百粒皮棉 (g)	衣指 (%)	亩铃数 (个)	亩产量 (kg)
微生物有机肥1	138.84	57.65	41.52	4.628	18.37	7.75	42.19	55886.54	258.64
微生物有机肥2	120.12	40.21	39.80	4.11	17.70	7.15	40.01	47223.31	201.32
常规施肥	95.03	36.44	38.35	3.17	17.31	6.59	38.07	40709.23	129.05

[0046] 表3:微生物有机肥对棉花品质影响,绒长(cm)

[0047]

施肥	平均(10次测量)
微生物有机肥1	33.95
微生物有机肥2	32.5
常规施肥	29.5

[0048] 测试实施例2

[0049] 将实施例1和对比例1得到的包衣产物分别作为微生物有机肥1和微生物有机肥2,以厚垣孢子的量计算,施用量为 $5 \times 10^4$ 个厚垣孢子/平方米,将无机化肥作为常规施肥,按照文献(GB/T 17980.92-2004,杀菌剂防治棉花黄、枯萎病)中的方法,对比了微生物有机肥1、微生物有机肥2和常规施肥对棉花枯萎病的防治效果,其中微生物有机肥1与微生物有机肥2相比,棉花枯萎病的病情指数平均下降了28%,微生物有机肥1与常规施肥相比,棉花枯萎病的病情指数平均下降了52%。结果证明,本发明的微生物有机肥能够显著地提高木霉菌防治病害的效果。

[0050] 测试实施例3

[0051] 将实施例1和对比例1得到的包衣产物分别作为微生物有机肥1和微生物有机肥2,以厚垣孢子的量计算,施用量为 $2 \times 10^5$ 个厚垣孢子/平方米,将无机化肥作为常规施肥,按照文献(哈茨木霉与多菌灵复合使用对水稻苗期立枯病的防治,浙江大学学报(农业与生命科学版),第35卷,第65-70页)中的方法,对比了微生物有机肥1、微生物有机肥2和常规施肥对水稻立枯病的防治效果,其中微生物有机肥1与微生物有机肥2相比,水稻立枯病的相对防效平均提高了11%,微生物有机肥1与常规施肥相比,水稻立枯病的相对防效平均提高了40%。结果证明,本发明的微生物有机肥能够显著地提高木霉菌防治病害的效果。

[0052] 测试实施例 4

[0053] 将实施例 1 和对比例 1 得到的包衣产物分别作为微生物有机肥 1 和微生物有机肥 2,以厚垣孢子的量计算,施用量为  $4 \times 10^5$  个厚垣孢子 / 平方米,将无机化肥作为常规施肥,按照文献(生物农药“蔬得康”对香蕉枯萎病的防治试验,江苏农业科学,第 39 卷,第 199-201 页)中的方法,对比了微生物有机肥 1、微生物有机肥 2 和常规施肥对香蕉枯萎病的防治效果,其中微生物有机肥 1 与微生物有机肥 2 相比,香蕉枯萎病的相对防效平均提高了 15%,微生物有机肥 1 与常规施肥相比,香蕉枯萎病的相对防效平均提高了 50%。结果证明,本发明的微生物有机肥能够显著地提高木霉菌防治病害的效果。

[0054] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。