



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117417870 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 19

(21) 申请号 202311746076.4

C12N 1/14 (2006.01)

(22) 申请日 2023.12.19

C09K 17/14 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

A01B 79/02 (2006.01)

CGMCC NO. 26114 2022.11.11

C12R 1/01 (2006.01)

(71) 申请人 山东省林业科学研究院

C12R 1/645 (2006.01)

地址 250014 山东省济南市历下区文化东路42号

C09K 101/00 (2006.01)

C09K 109/00 (2006.01)

(72) 发明人 刘方春 马海林 杨庆山 刘幸红

刘丙花 潘博雅 憨化景 孙铭婕

彭琳 杜振宇 马丙尧

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司

37221

专利代理师 宋海海

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

球形赖氨酸芽孢杆菌、组合物及其在盐碱地改良中的应用

(57) 摘要

本发明属于微生物和土壤治理与修复技术领域,具体涉及球形赖氨酸芽孢杆菌、组合物及其在盐碱地改良中的应用。具体的,本发明成功筛选获得一株球形赖氨酸芽孢杆菌,其能有效加速盐碱地盐分淋洗,同时,配合印度梨形孢使用,能显著降低盐碱地土壤盐分含量,提高土壤脱盐率。总之,本发明根据不同微生物的特性,从加速盐分淋洗、降低返盐两个角度降低土壤水溶性盐分含量,综合改良盐碱地,其操作简单、价格低廉、环境友好,因此具有良好的实际应用之价值。



1. 一株球形赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus sphaericus*) 6', 其特征在于, 该菌株已于2022年11月11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, 其生物保藏号为CGMCC No. 26114。

2. 一种微生物菌剂, 其特征在于, 所述微生物菌剂至少包含权利要求1所述球形赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus sphaericus*) 6'。

3. 一种组合物, 其特征在于, 所述组合物至少包含如下(a1) - (a2)中的任意一种:

(a1) 权利要求1所述球形赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus sphaericus*) 6' 和菌根真菌;

(a2) 权利要求2所述微生物菌剂和菌根真菌。

4. 如权利要求3所述的组合物, 其特征在于, 所述菌根真菌选自褐绒盖牛肝菌、双孢菇和印度梨形孢。

5. 权利要求1所述球形赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus sphaericus*) 6'、权利要求2所述微生物菌剂和/或权利要求3-4任一项所述组合物在盐碱地改良中的应用。

6. 如权利要求5所述应用, 其特征在于, 所述盐碱地改良表现为如下任意一种或多种:

(b1) 加速盐碱地盐分淋洗、抑制盐分表聚;

(b2) 抑制土壤返盐;

(b3) 降低盐碱地土壤盐分含量;

(b4) 提高土壤脱盐率。

7. 一种盐碱地改良的方法, 其特征在于, 所述方法包括: 向盐碱地环境中施加权利要求1所述球形赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus sphaericus*) 6'、权利要求2所述微生物菌剂和/或权利要求3-4任一项所述组合物。

8. 如权利要求7所述的方法, 其特征在于, 所述方法包括: 在春季耐盐植物种植之前, 将所述球形赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus sphaericus*) 6' 或所述微生物菌剂施用到盐碱地中。

9. 如权利要求8所述的方法, 其特征在于, 所述方法还包括, 盐碱地灌溉或降雨以后, 开始种植耐盐植物; 待雨季结束后开始接种菌根真菌。

10. 如权利要求9所述的方法, 其特征在于, 所述耐盐植物包括怪柳、杜梨、白刺和白蜡, 所述菌根真菌为印度梨形孢。

球形赖氨酸芽孢杆菌、组合物及其在盐碱地改良中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物和土壤治理与修复技术领域,具体涉及球形赖氨酸芽孢杆菌、组合物及其在盐碱地改良中的应用。

背景技术

[0002] 随着全球气候暖化问题的日益加剧,土壤盐渍化问题已经成为各国关心的全球性问题,全球约有7%的土地受到盐渍化的威胁,而且这个数字还在上升。我国是土壤盐渍化比较严重的国家,盐渍化土壤面积大,分布广,区域内生态环境脆弱,生态问题突出,土壤盐渍化问题严重制约着区域经济的发展。

[0003] 盐碱地生态治理是一个长期的、复杂的系统工程,涉及多学科,具有长期复杂性。以盐碱地改良利用为目标的退化生态系统研究为世界性重大科学技术问题,国内外众多学者和机构从事相关研究。目前国内外盐碱地开发利用方法主要有水利工程方法、物理方法、化学方法和生物方法。盐碱地改良面临的最大的问题就是盐分淋洗难度大,干旱季节容易返盐,盐分表聚现象严重。

[0004] 专利202010125947.0公开了一种促进盐碱土壤盐分淋洗的方法,通过胶冻样芽孢杆菌、园林废弃物堆肥、膨润土等材料促进盐碱土壤盐分淋洗的,改善土壤肥力和土壤物理结构,利于灌溉水洗盐,抑制地表返盐。专利202210904213.1公开了一种避免盐碱耕地春季返盐的方法,将作物秸秆留茬20cm~30cm,同时秸秆收割机在收获籽粒的同时将秸秆粉碎或利用秸秆收割机将已收获的作物秸秆粉碎,将粉碎的秸秆均匀喷洒并覆盖于耕地地表,能使得水分快速渗透进盐碱耕地的土壤,减少地表水分的蒸发,防止盐碱离子随土壤蒸发上升到地表,使盐碱离子滞留在土壤深层,有效防止土壤返盐。然而,发明人发现,上述方法存在制备处理过程繁琐,处理效果不佳等缺陷,影响其大规模推广使用。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一株球形赖氨酸芽孢杆菌,其能有效加速盐碱地盐分淋洗。

[0006] 本发明的另外一个目的在于提供一种组合物,其包含球形赖氨酸芽孢杆菌和印度梨形孢,能显著降低盐碱地土壤盐分含量,提高土壤脱盐率。

[0007] 本发明的另外一个目的在于提供上述球形赖氨酸芽孢杆菌、组合物在盐碱地土壤改良中的相关应用。

[0008] 为实现上述发明目的,本发明提供如下技术方案:

一株球形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus sphaericus*)6', 生物保藏号为CGMCC No. 26114,该菌株已于2022年11月11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。

[0009] 所述球形赖氨酸芽孢杆菌6' 从东营市垦利区天宁寺林场黄河三角洲耐盐碱树种种质资源库内的怪柳根际土样中分离,其为革兰氏阳性菌,明胶液化阳性,淀粉水解实验阳

性,硝酸盐还原实验阳性,苯丙氨酸脱氢酶实验阳性,接触酶实验阳性,吡啶试验阳性,V-P实验阴性。其16S rDNA序列如SEQ ID NO.1所示。

[0010] 在本发明的具体实施方式中,提供一种微生物菌剂,所述微生物菌剂包含上述球形赖氨酸芽孢杆菌6'。

[0011] 在本发明的具体实施方式中,所述微生物菌剂中,除所述活性成分外,还含有载体。所述载体可为菌剂领域常用的且在生物学上是惰性的载体。

[0012] 所述载体可为固体载体或液体载体;

所述固体载体可为矿物材料、植物材料或高分子化合物;所述矿物材料可为粘土、滑石、高岭土、蒙脱石、白碳、沸石、硅石和硅藻土中的至少一种;所述植物材料可为玉米粉、豆粉和淀粉中的至少一种;所述高分子化合物可为聚乙烯醇或/和聚二醇;

所述液体载体可为有机溶剂、植物油、矿物油或水;所述有机溶剂可为癸烷或/和十二烷。

[0013] 所述菌剂的剂型可为多种剂型,如液剂、乳剂、悬浮剂、粉剂、颗粒剂、可湿性粉剂或水分散粒剂。

[0014] 根据需要,所述菌剂中还可添加表面活性剂(如吐温20、吐温80等)、粘合剂、稳定剂(如抗氧化剂)、pH调节剂等。

[0015] 在本发明的具体实施方式中,提供一种组合物,所述组合物至少包含如下(a1)-(a2)中的任意一种:

(a1) 上述球形赖氨酸芽孢杆菌6' 和菌根真菌;

(a2) 上述微生物菌剂和菌根真菌。

[0016] 其中,所述菌根真菌优选繁殖速度快、菌丝体生长旺盛的真菌,如褐绒盖牛肝菌、双孢菇、印度梨形孢等。在本发明的一个具体实施方式中,所述菌根真菌为印度梨形孢。

[0017] 在本发明的具体实施方式中,提供上述球形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus sphaericus*)6'、微生物菌剂和/或组合物在盐碱地改良中的应用。

[0018] 具体的,所述盐碱地改良表现为如下任意一种或多种:

(b1) 加速盐碱地盐分淋洗、抑制盐分表聚;

(b2) 抑制土壤返盐;

(b3) 降低盐碱地土壤盐分含量;

(b4) 提高土壤脱盐率。

[0019] 在本发明的具体实施方式中,提供一种盐碱地改良的方法,所述方法包括:向盐碱地环境中施加球形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus sphaericus*)6'、微生物菌剂和/或组合物。

[0020] 在本发明的具体实施方式中,所述方法包括:在春季耐盐植物种植之前,将所述球形赖氨酸芽孢杆菌6' 或所述微生物菌剂施用到盐碱地中。

[0021] 在本发明的具体实施方式中,盐碱地灌溉(或降雨)以后,开始种植耐盐植物;待雨季结束后开始接种菌根真菌。

[0022] 在本发明的具体实施方式中,所述耐盐植物包括但不限于柽柳、杜梨、白刺和白蜡,选择的耐盐植物需与应用的菌根真菌共生,在本发明的一个具体实施方式中,所述菌根真菌为印度梨形孢。

[0023] 上述一个或多个技术方案的有益技术效果:

(1) 上述技术方案选用的球形赖氨酸芽孢杆菌6'耐盐性强,在高盐土壤环境下具有较强的产胞外多糖能力,具有增强土壤水稳性团聚体含量,重组土壤团粒结构的功能,能够加速盐碱地土壤的淋洗速度。

[0024] (2) 上述技术方案利用菌根真菌和部分耐盐植物能够共生的特性,提高菌根真菌的繁殖速度,增加菌丝体生长速度,利用菌根真菌的菌丝体切断土壤毛管,抑制蒸发造成的土壤返盐和盐分表聚现象。

[0025] (3) 上述技术方案根据不同微生物的特性,从加速盐分淋洗、降低返盐两个角度降低土壤水溶性盐分含量,综合改良盐碱地。

[0026] 生物保藏说明:

球形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus sphaericus*)6',该菌株已于2022年11月11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(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),其生物保藏号为CGMCC No. 26114。

附图说明

[0027] 构成本发明的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。

[0028] 图1为本发明实施例2实验室阶段采用PVC管开展室内土柱模拟试验实物图。

具体实施方式

[0029] 应该指出,以下详细说明都是示例性的,旨在对本发明提供进一步的说明。除非另有指明,本发明使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解相同含义。

[0030] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本发明申请的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作、器件、组件和/或它们的组合。

[0031] 如前所述,目前国内外盐碱地开发利用方法主要有水利工程方法、物理方法、化学方法和生物方法。盐碱地改良面临的最大的问题就是盐分淋洗难度大,干旱季节容易返盐,盐分表聚现象严重。

[0032] 有鉴于此,本发明充分利用球形赖氨酸芽孢杆菌6'的耐盐性强,产胞外多糖,增强土壤水稳性团聚体,重组土壤团粒结构等功能的特性,再结合菌根真菌(如印度梨形孢)能够切断土壤毛管、有效抑制返盐的特征,加速盐碱地盐分淋洗、抑制土壤返盐,对于盐碱地土壤改良意义重大。

[0033] 以下通过实施例对本发明做进一步解释说明,但不构成对本发明的限制。应理解这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。

[0034] 实施例1

球形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus sphaericus*)6'的筛选方法,步骤如下:

通过梯度稀释法,从东营市垦利区天宁寺林场黄河三角洲耐盐碱树种种质资源库

内的桤柳根际土样中分离细菌,通过三区划线法对分离到的细菌进行纯化,纯化后的细菌进行编号,于LB斜面上保存备用。通过小麦叶片保绿法进行初筛,然后通过萝卜子叶增重进行复筛获得候选菌株,最后通过测定所欲候选菌株产胞外多糖能力,得到赖氨酸芽孢杆菌6'。

[0035] 将所测16s rDNA序列(SEQ ID NO.1)输入到NCBI网站的GenBank数据库网站上进行相似性比较。结合生理生化、菌落形态和指标(球形赖氨酸芽孢杆菌6'为革兰氏阳性菌,明胶液化阳性,淀粉水解实验阳性,硝酸盐还原实验阳性,苯丙氨酸脱氢酶实验阳性,接触酶实验阳性,吡啶试验阳性,V-P实验阴性),将此菌株鉴定命名为球形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus sphaericus*)6'。

[0036] 实施例2:淋洗实验

采用PVC管(直径7.5cm、高40cm)开展室内土柱模拟试验,试验设6个处理,分别为(1)CK:加水;(2)接种球形赖氨酸芽孢杆菌6';(3)接种枯草芽孢杆菌GE3;(4)接种阿氏芽孢杆菌BPR078;(5)接种纺锤芽孢杆菌L13;(6)接种印度梨形孢(*Serendipita indica*)。

[0037] 将枯草芽孢杆菌GE3、阿氏芽孢杆菌BPR078、纺锤芽孢杆菌L13和球形赖氨酸芽孢杆菌6'分别接入LB培养基,于28℃,180 rpm条件下振荡培养24 h,用无菌生理盐水调节菌悬液(2.0×10^8 cfu/mL)分别制成GE3、BPR078、L13和球形赖氨酸芽孢杆菌6'接种剂。

[0038] 将印度梨形孢母种接种到PDA固体培养基(pH = 6.5)上,在黑暗条件下恒温恒湿($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 60.00%)培养1周,进行平板活化和增殖培养。用直径5 mm的无菌打孔器在活化的菌落边缘打孔,挑取菌丝块置于印度梨形孢液体培养基中,置于旋转培养箱中避光培养3天(32°C , 60.00% RH, 180 rpm),调制孢子含量 10^5 个/mL的接种剂。

[0039] 所述印度梨形孢液体培养基配方为:马铃薯滤液100 mL(水100 mL,马铃薯20 g),麦芽汁4.370 mL,酵母粉0.052 g,硫酸镁0.040 g。

[0040] 所述印度梨形孢(CGMCC 3.17686)购买自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

[0041] 实验所用土壤取自东营市垦利区天宁寺林场黄河三角洲耐盐碱树种种质资源库内,原始盐分含量为8.2%。将土壤过2 mm筛后,按照不同实验设计将100 mL接种剂(4.46%v/w)与2.24kg土壤混合并搅拌均匀,1.69 g/cm³均匀装柱,每个处理7次重复。

[0042] PVC管底盖均匀打孔并覆盖4层透水布防止漏土,土柱装填完成后架设在淋出液收集筒中,在土层表面放置一层滤纸防止注水时冲散土表,然后倒入100mL去离子水,静置10 d。10 d后开始向土柱内注水进行淋洗,注水量为420mL,记录淋洗所用时间,并测定淋洗液的电导率。可以看出,球形赖氨酸芽孢杆菌6'处理明显降低了淋出时间,且淋出液电导率显著高于其他处理;而印度梨形孢处理显著增加了淋出时间,且淋出液电导率有了明显的降低。其他几种微生物菌剂对盐分淋洗速度和淋洗液电导率影响较小。这说明球形赖氨酸芽孢杆菌6'能显著促进土壤中的盐分淋出,而印度梨形孢对盐分淋洗有一定的抑制作用。

[0043] 表1 不同处理条件下的室内土柱模拟试验结果

处理	全部淋出平均时间 (d)	淋出液电导率 (ms cm ⁻¹)	>0.25mm 土壤团聚体含 量 (%)
对照	5.6 b	102.4 b	14.7 c
6'	3.0 c	130.1 a	46.4 a
GE3	5.9 b	111.9 b	16.9 c
BPR078	5.4 b	104.8 b	12.6 c
L13	5.5 b	103.2 b	24.3 b
印度梨形孢	8.7 a	96.2 c	17.4 c

[0044] 实施例3:大田实验

大田实验安排在东营市垦利区天宁寺林场黄河三角洲耐盐碱树种种质资源库内,试验开始于2022年4月开始,设置四个处理,分别为:(1)对照:不加任何接种剂;(2)接种球形赖氨酸芽孢杆菌6';(3)接种印度梨形孢(Si);(4)先接种球形赖氨酸芽孢杆菌6',后接种印度梨形孢(6'+Si)。按实施例2液体发酵培养的方法制备球形赖氨酸芽孢杆菌6'和印度梨形孢接种剂。

[0045] 2022年4月份,处理2和处理4小区将球形赖氨酸芽孢杆菌6'随灌溉一起用到盐碱地,用量为每亩15升,随着灌溉措施一起将微生物接种剂应用到盐碱地。定植树种为“鲁桤一号”(1年生容器苗),将400株桤柳分别栽植于4个处理小区。8月份雨季结束后将处理3和处理4小区接种印度梨形孢,接种菌根真菌印度梨形孢时,在定植的耐盐植物周围打3个孔,将印度梨形孢接种剂接种到耐盐植物根系周围,每株耐盐林木的接种量30ml。11月初测定不同小区的表层土壤(0~20 cm)盐分含量和脱盐率,结果如下表2所示。可以看出,球形赖氨酸芽孢杆菌6'配合印度梨形孢联合应用,能显著降低盐碱地土壤盐分含量,提高土壤脱盐率。

[0046] 表2 表层土壤盐分含量结果

处理	初始含盐量 g·kg ⁻¹	改良后含盐量 g·kg ⁻¹	脱盐率%
对照	9.8 a	8.7 a	11.2
6'	9.5 a	4.9 b	48.4
Si	9.7 a	7.1 a	26.8
6'+Si	9.8 a	3.2 c	67.3

[0047] 球形赖氨酸芽孢杆菌6'的16S rDNA序列:

AGCCGGGCGGGCGTGCTATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAGAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAG
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCG
AATAATCTTTTGTCCCTCATGGGACAATACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGGGCGCAT
TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGCCCACTGGG
ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCA
ACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGATTTTCGGTTCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAGTGGC
TGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAG

CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACC
GTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTATCTGGTCTGTAAGTACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTT
AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTT
GACCACTGTAGAGATATGGTTTTCCCTTCGGGGACAACGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCG
TGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGG
TGAAGTCCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC
GTGCTACAATGGACGATACAAACGGTTGCCAACTCGCGAGAGGGAGCTAATCCGATAAAGTCGTTCTCAGTTCCGA
TTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGC
CAGCCGCCGAAGGTGAATAGAGG (SEQ ID NO.1)。

[0048] 最后应说明的是：以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，
尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明，对于本领域的技术人员来说，其依然可
以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分技术特征进行等同替换。
凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的
保护范围之内。



图1