



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114854598 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 05

(21) 申请号 202210281574.5

A01N 63/30 (2020.01)

(22) 申请日 2022.03.21

C09K 17/14 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

A01P 21/00 (2006.01)

CGMCC No. 23826 2021.11.30

C09K 101/00 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(71) 申请人 中国科学院南京土壤研究所

地址 210008 江苏省南京市玄武区北京东路71号

(72) 发明人 陈林 张佳宝 李含放 赵炳梓

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

专利代理师 唐循文

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

C05G 3/00 (2020.01)

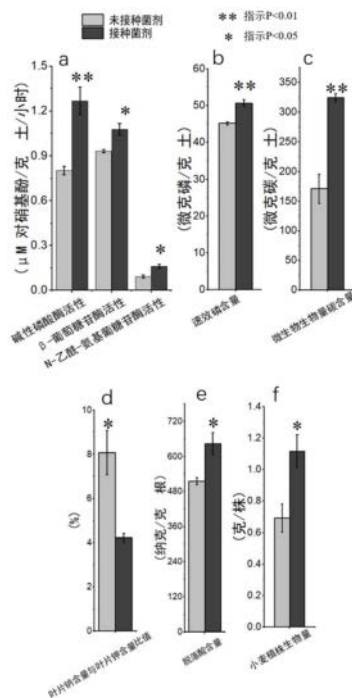
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一株高山被孢霉及其应用

(57) 摘要

一株高山被孢霉及其应用,该菌株已在国家知识产权局指定的保藏单位保藏,保藏日期为2021年11月30日,保藏单位名称: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.23826。该株高山被孢霉可以在土壤中稳定繁殖,且能与土著微生物形成稳定的协同关系。该株高山被孢霉来源于典型盐渍土壤,具有绿色环保,安全优质性。该株高山被孢霉培养过程简单,菌剂制作成本低廉,利于推广。



1. 一株高山被孢霉 (*Mortierella alpina* HSJ001), 该菌株已在国家知识产权局指定的保藏单位保藏, 保藏日期为2021年11月30日, 保藏单位名称: 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. 23826。

2. 权利要求1所述高山被孢霉的培养方法, 其特征在于, 步骤为: 挑取高山被孢霉菌丝接种至PD液体培养基中, 置于恒温摇床27 °C、180 rpm培养7 ~ 10天得菌丝球; 无菌条件下过滤, 取5 g菌丝球加入50 g麦麸-豆饼粉-面粉培养基中, 立即摇匀; 置于27 °C静置培养; 待到菌丝把麦麸-豆饼粉-面粉培养基凝固成块后, 使菌饼两面可接触到空气; 之后置于27 °C培养箱, 直到菌丝完全覆盖麦麸-豆饼粉-面粉培养基后, 捣散制得。

3. 根据权利要求2所述高山被孢霉的培养方法, 其特征在于, 所述PD液体培养基组成为: 去皮马铃薯200 g、葡萄糖20 g、水1000 mL; 麸皮-豆饼粉-面粉培养基组成为: 麦麸15 g、豆饼粉20 g、面粉15 g、水50 mL, 水先加入豆饼粉湿润30 min后, 再加入麦麸、面粉拌匀, 121 °C灭菌20 min后, 摇匀制得。

4. 权利要求1所述高山被孢霉在促进作物生长中的作用。

5. 权利要求1所述高山被孢霉在提高土壤磷酸酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和N-乙酰-氨基葡萄糖苷酶活性中的应用。

6. 权利要求1所述高山被孢霉在植物根系合成脱落酸中的应用。

7. 权利要求1所述高山被孢霉在提高土壤磷素溶解中的作用。

8. 根据权利要求7所述应用, 其特征在于, 提高土壤磷素溶解的无机磷培养基的组成为: 葡萄糖10 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1 g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  5.0 g。

## 一株高山被孢霉及其应用

[0001]

### 技术领域

[0002] 本发明属于微生物高山被孢霉领域,具体涉及一株高山被孢霉及其应用。

[0003]

### 背景技术

[0004] 土壤中的真菌主要分布在土壤表层,在土壤微生物类群中,它们是分解有机质的主力。土壤中一些有益真菌通过刺激作物生长激素的分泌,促进土壤养分的相互转化,提高作物对养分的吸收的同时提高抗逆性,促进作物生长。

[0005] 高山被孢霉(*Mortierella alpina*)是接合菌纲毛霉目被孢霉科被孢霉属丝状真菌,广泛分布于土壤、粪便及其他腐败的有机物质中。由于和同属于被孢霉属(*Mortierella*)的深黄被孢霉都能积累相当比例的花生四烯酸(Arachidonic Acid,简称ARA或AA)而被受到广泛的关注。花生四烯酸即全顺式 $\Delta$ -5,8,11,14-二十碳四烯酸(arachidonic acid,ARA),是人体生长和发育所必需的三大脂肪酸之一(Bajpai P K, Bajpai P, Ward O P. Arachidonic acid production by fungi[J].Appl Environ Microb,1991,57:1255-1258.),隶属于 $\omega$ -6系列多不饱和脂肪酸(曹刚刚,管政兵,廖祥儒,蔡宇杰.高山被孢霉产花生四烯酸的发酵和老化工工艺[J].食品与生物技术学报,2016,35(06):617-622.)。高山被孢霉是目前产花生四烯酸真菌中唯一具有正式安全性评估的菌种,其菌丝体中花生四烯酸含量高且提取方便,成为公认的产花生四烯酸的优良菌株。

[0006] 高山被孢霉除能积累花生四烯酸之外,还能积累亚油酸(LA)、亚麻酸(G1A)、二十碳五烯酸(EPA)等多饱和脂肪酸。此外,在农业中,鲜有报道高山被孢霉在有机物料的降解中发挥了一定作用,且有研究表明了一株长孢被孢霉促进土壤碳氮磷养分转化和植物生长激素的分泌,从而促进了植物生长,改善土壤肥力(Li,F., Chen, L., Redmile-Gordon, M.,Zhang,J. B., Zhang, C. Z., Ning, Q., Li, W., 2018. *Mortierella elongata*'s roles in organic agriculture and crop growth promotion in a mineral soil. Land Degradation & Development 29: 1642-1651)。同时也有研究表明高山被孢霉与长孢被孢霉混合菌剂协同作用显著提高了土壤速效碳氮养分和碳氮磷相关酶活,提高了土壤肥力,同时也促进植株分泌生长激素从而促进其生长(宁琪,陈林,李芳,张丛志,马东豪,蔡泽江,张佳宝. 2020. 被孢霉对土壤养分有效性和秸秆降解的影响. DOI: 10.11766/trxb202006020213)。但目前关于高山被孢霉在盐渍土壤中的应用鲜有报道,本发明从中国科学院地理科学与资源研究所黄河三角洲研究中心的小麦根际盐渍土壤中分离培养出一株高山被孢霉(*Mortierella alpina* HSJ001),该被孢霉菌剂能够有效提高盐渍土壤碳氮磷相关酶活活性,在碳氮磷养分活化中发挥一定的作用,还能使植株根系分泌大量脱落酸,促进植株养分吸收,提高了植株应对盐胁迫的能力,有利于植株在盐渍土壤环境下生长。该高山被孢霉可以制成菌剂,并在农业领域推广应用。

[0007]

### 发明内容

[0008] 解决的技术问题:本发明提供一株高山被孢霉及其应用。该高山被孢霉来自于中国科学院地理科学与资源研究所黄河三角洲研究中心的小麦根际盐渍土壤中,易培养,繁殖快。该菌株在促进作物生长、土壤养分活化中的作用显著。同时,该菌株能促进作物分泌脱落酸对作物生长抗逆产生直接的影响。

[0009] 技术方案:一株高山被孢霉(*Mortierella alpina* HSJ001),该菌株已在国家知识产权局指定的保藏单位保藏,保藏日期为2021年11月30日,保藏单位名称: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. 23826。

[0010] 高山被孢霉的培养方法,步骤为:挑取高山被孢霉菌丝接种至PD液体培养基中,置于恒温摇床27 °C、180 rpm培养7 ~ 10天得菌丝球;无菌条件下过滤,取5 g菌丝球加入50 g麦麸-豆饼粉-面粉培养基中,立即摇匀;置于27 °C静置培养;待到菌丝把麦麸-豆饼粉-面粉培养基凝固成块后,使菌饼两面可接触到空气;之后置于27 °C培养箱,直到菌丝完全覆盖麦麸-豆饼粉-面粉培养基后,捣散制得。

[0011] 上述PD液体培养基组成为:去皮马铃薯200 g、葡萄糖20 g、水1000 mL;麸皮-豆饼粉-面粉培养基组成为:麦麸15 g、豆饼粉20 g、面粉15 g、水50 mL,水先加入豆饼粉湿润30 min后,再加入麦麸、面粉拌匀,121 °C灭菌20 min后,摇匀制得。

[0012] 上述高山被孢霉在促进作物生长中的作用。

[0013] 上述高山被孢霉在提高土壤磷酸酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和N-乙酰-氨基葡萄糖苷酶活性中的应用。

[0014] 上述高山被孢霉在植物根系合成脱落酸中的应用。

[0015] 上述高山被孢霉在提高土壤磷素溶解中的作用。

[0016] 上述提高土壤磷素溶解的无机磷培养基的组成为:葡萄糖10 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1 g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  5.0 g。

[0017] 有益效果:(1)该株高山被孢霉能够提高土壤碱性磷酸酶活性(图1:a),并显著提高了速效磷的含量(图1:b),具有一定的溶磷能力(图2),说明该菌株在土壤磷素转化中发挥作用。(2)该株高山被孢霉使N-乙酰-氨基葡萄糖苷酶活性显著提高了72.06%, $\beta$ -葡萄糖苷酶活性提高了15.76%(图1:a),说明该菌株在土壤养分活化中发挥显著作用,并使植株生物量显著提高了57.28%(图1:f)。(3)作物根系脱落酸的含量提高了24.76%(图1:e),叶片钾含量比值降低了91.05%(图1:d),说明该菌株在提高作物耐盐抗逆中发挥了显著作用。(4)该菌株作为根际微生物,使根际土壤微生物生物量碳含量显著提高了89.80%(图1:c),同时改变微生物群落结构进而调节作物生长(图3)。

[0018]

### 附图说明

[0019] 图1为接种高山被孢霉对土壤碳、氮、磷相关酶活性、土壤微生物生物量碳含量和速效磷含量以及对小麦植株生物量、根系脱落酸含量和叶片钠含量与叶片钾含量比值的影响。其中a为高山被孢霉对酶活的影响,b为高山被孢霉对速效磷含量的影响,c为高山被孢

霉对生物碳含量的影响,d为高山被孢霉对叶片钠含量与叶片钾含量比值的影响,e为高山被孢霉对小麦根系脱落酸含量的影响,f为高山被孢霉对小麦植株生物量的影响。

[0020] 图2为高山被孢霉在无机磷培养基上的生长状况及其溶磷量。

[0021] 图3为接种高山被孢霉对土壤根际真菌群落的影响。

[0022]

### 具体实施方式

[0023] 以下实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人是能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围。凡根据本发明精神实质所做的等效变换或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

[0024] 该株高山被孢霉可以在土壤中稳定繁殖,且能与土著微生物形成稳定的协同关系。该株高山被孢霉在提高土壤磷素溶解的无机磷培养基的组成为:葡萄糖10 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1 g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  5.0 g。该株高山被孢霉来源于黄河三角洲典型盐渍土壤,具有绿色环保,安全优质性。该株高山被孢霉培养过程简单,菌剂制作成本低廉,利于推广。

[0025] 实施例1

从中国科学院地理科学与资源研究所黄河三角洲研究中心的小麦根际盐渍土壤中分离培养出一株高山被孢霉 (*Mortierella alpina* HSJ001),该菌株在显微镜下观察菌丝成管状,菌丝发达,生长繁密,菌丝成藕节状且在无机磷培养基中呈现明显透明圈。该菌株已在国家知识产权局指定的保藏单位保藏,保藏日期为2021年11月30日,保藏单位名称: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,保藏编号:CGMCC No. 23826。该表层土壤养分指标为:土壤含盐量2.14g/kg、pH 8.16、电导率1.00ds/m、土壤有机碳含量7.13 g/kg、土壤全磷含量0.73 g/kg。

[0026] 实施步骤:

步骤1:将生长良好的高山被孢霉菌种接种至PD液体培养基中,27℃、180 rpm摇床培养7 ~ 10天。

[0027] 步骤2:将液体培养的高山被孢霉在无菌条件下过滤,过滤后的菌丝体用无菌去离子水冲洗干净。

[0028] 步骤3:将3 g洁净的菌丝体溶于30 mL无菌去离子水中,菌液加入1.5 kg土壤中,混匀后装盆。

[0029] 步骤4:充分浇水后进行作物种植。

[0030] 对比例1

实施步骤:

步骤1:准确量取不含菌丝体的30 mL无菌去离子水,加入1.5 kg土壤后装盆。

[0031] 步骤2:充分浇水后进行作物种植。

[0032] 实施例2

实施步骤:

步骤1:将生长良好的高山被孢霉菌种接种至PD液体培养基中,27 °C、180 rpm摇

床培养7 ~ 10天,直到液体培养基浑浊并长满大量菌丝球。

[0033] 步骤2:将液体培养的高山被孢霉在无菌条件下过滤,过滤后的菌丝体用无菌去离子水冲洗干净。

[0034] 步骤3:将干净的菌丝接种到灭过菌麦麸-豆饼粉-面粉培养基中,27 °C静置黑暗培养,直到菌丝完全覆盖培养基。

[0035] 步骤4:将不同三角瓶中菌丝的麦麸-豆饼粉-面粉培养基捣散取出,混匀后即为菌剂。

[0036] 步骤5:准确称取3 g菌剂,加入1.5 kg土壤中,充分混匀后装盆。

[0037] 步骤6:充分浇水后进行作物种植。

[0038] 对比例2

实施步骤:

步骤1:准确称取灭菌处理的未加入菌丝体的麦麸-豆饼粉-面粉培养基3 g,加入1.5 kg土壤中,充分混匀后装盆。

[0039] 步骤2:充分浇水后进行作物种植。

[0040] 供试土壤为山东东营农田盐渍土,该表层土壤养分指标为:土壤含盐量3.50 g/kg、土壤有机碳11.46 g/kg、土壤全氮1.15 g/kg、土壤全磷1.07 g/kg、土壤速效磷32.07 mg/kg。种植作物为小麦(济南177),于三叶期定苗,每盆留三株。小麦于温室环境中进行培养,培养期间含水量保持为60%。期间按需进行浇水除草。培养至开花期进行采样,测定土壤酶活性、小麦生物量以及小麦根系激素含量等。

[0041] 测定结果如图1所示,接种高山被孢霉处理小麦的生物量提高了57.28%,小麦根系脱落酸的含量提高了24.76%,叶片钠含量和叶片钾含量比值降低了91.05%,碱性磷酸酶的活性提高了58.04%,N-乙酰-氨基葡萄糖苷酶活性显著提高了72.06%,β-葡萄糖苷酶活性提高了15.76%。结果表明,该株高山被孢霉能提高作物脱落酸的分泌,有利于植株叶片对钾离子的吸收,从而提高作物的耐盐性。接种高山被孢霉处理的土壤β-葡萄糖苷酶活性、磷酸酶活性、N-乙酰-氨基葡萄糖苷酶活性、速效磷含量以及小麦生物量的增加表明该菌剂在盐渍土壤养分碳氮磷活化中有促进作用,特别是氮磷养分,进而提高了作物对养分的获取,促进作物生长。

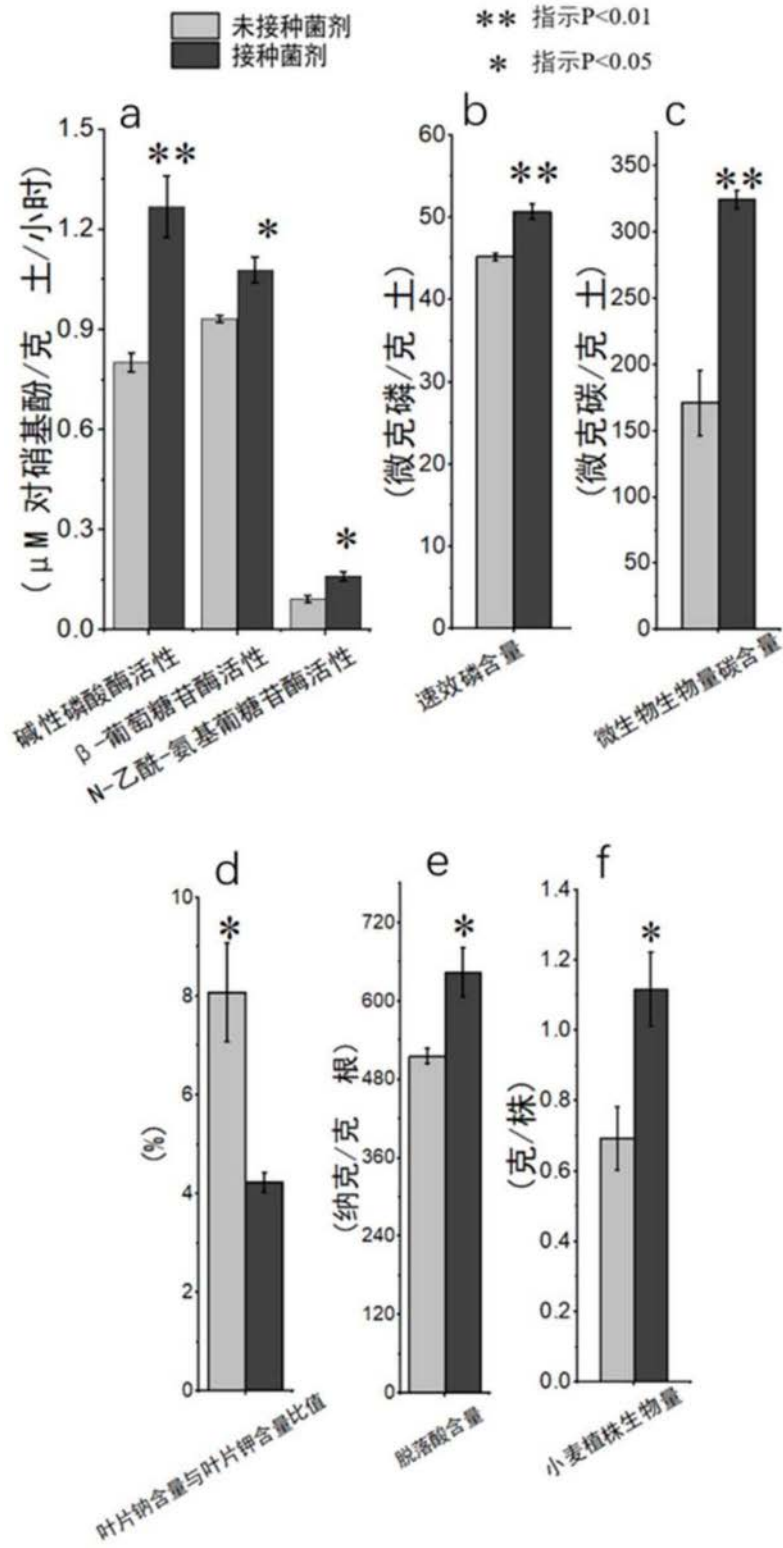


图1

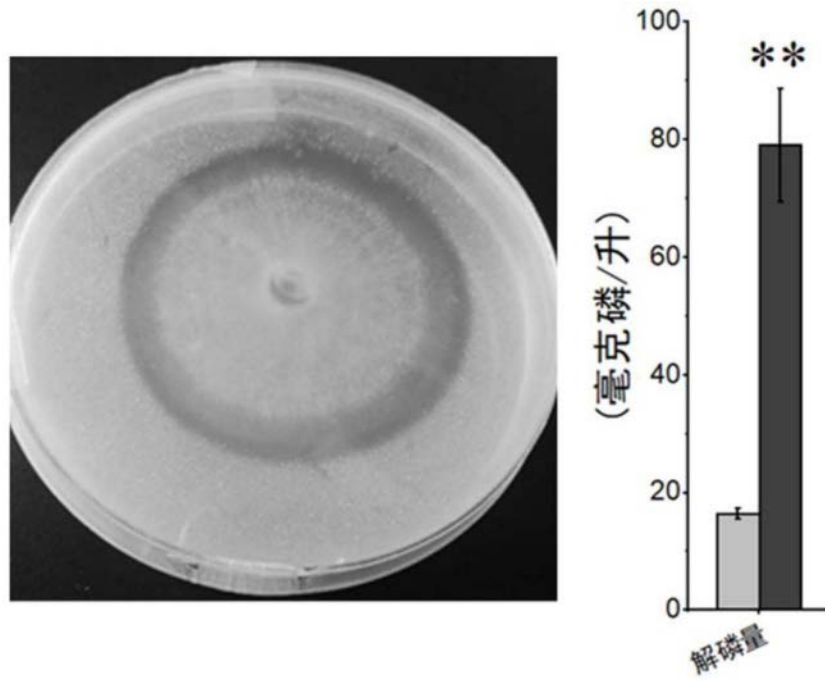


图2

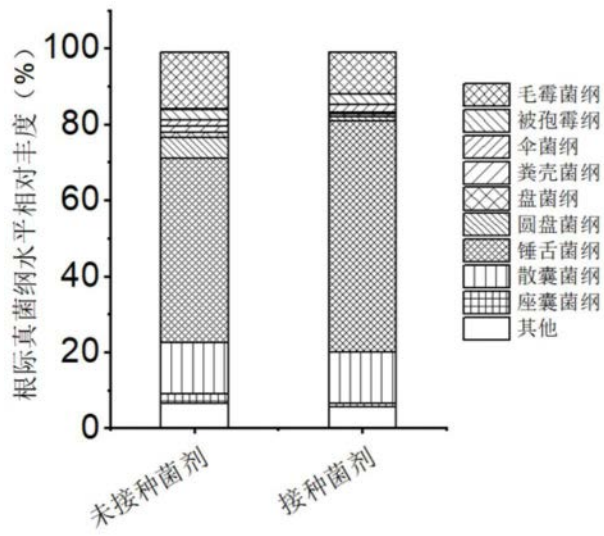


图3