



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103333836 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 02

(21) 申请号 201310272123. 6

*C12R 1/01* (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 07. 01

*A62D 101/04* (2007. 01)

(83) 生物保藏信息

*A62D 101/28* (2007. 01)

CGMCC No. 7776 2013. 06. 20

*A62D 101/26* (2007. 01)

(71) 申请人 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街  
12 号中国农业科学院农业资源与农业区划研究所

(72) 发明人 孙建光 辛访华 高淼 周义清

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任凤华

(51) Int. Cl.

*C12N 1/20* (2006. 01)

*A62D 3/02* (2007. 01)

*B09C 1/10* (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页  
序列表2页

## (54) 发明名称

一株降解除草剂氯嘧磺隆和乙草胺的细菌及其用途

## (57) 摘要

本发明公开了一株降解除草剂氯嘧磺隆和乙草胺的细菌及其用途。该细菌是纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.) LY1114, 其在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏号为 CGMCC No. 7776。本发明提供的纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.) LY1114CGMCC No. 7776 在无机盐培养基中 7d 对氯嘧磺隆 (45mg/L) 的降解率达到 89. 11%, 对乙草胺 (45mg/L) 降解率达到 32. 08%。这表明该菌株能够高效降解氯嘧磺隆和乙草胺, 在修复土壤残留除草剂氯嘧磺隆和乙草胺污染方面具有广阔的应用前景。

CN 103333836 A

1. 纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114,其在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为 CGMCC No. 7776。
2. 一种菌剂,其特征在于:所述菌剂的活性成分为权利要求 1 所述的纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776。
3. 根据权利要求 2 所述的菌剂,其特征在于:所述菌剂为下述 1) 或 2) 所述菌剂:
  - 1) 用于降解氯嘧磺隆和 / 或乙草胺的菌剂;
  - 2) 用于修复土壤氯嘧磺隆和 / 或乙草胺污染的菌剂。
4. 权利要求 1 所述的纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776、或权利要求 2 或 3 所述的菌剂在降解氯嘧磺隆和 / 或乙草胺中的应用。
5. 权利要求 1 所述的纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776、或权利要求 2 或 3 所述的菌剂在修复土壤氯嘧磺隆和 / 或乙草胺污染中的应用。
6. 培养权利要求 1 所述纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCCNo. 7776 的方法,包括将所述纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCCNo. 7776 在用于培养纤维微菌的培养基中培养的步骤。
7. 权利要求 2 或 3 所述菌剂的制备方法,包括如下步骤:将权利要求 1 所述的纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 作为活性成分,得到所述菌剂。

## 一株降解除草剂氯嘧磺隆和乙草胺的细菌及其用途

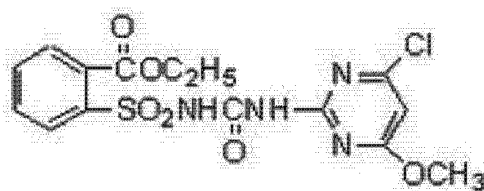
### 技术领域

[0001] 本发明涉及一株降解除草剂氯嘧磺隆和乙草胺的细菌及其用途。

### 背景技术

[0002] 氯嘧磺隆,英文通用名称 chlorimuron-ethyl,化学名称 2-(4-氯-6-甲氧基嘧啶-2-基氨基甲酰氨基磺酰基)苯甲酸甲酯,结构式如式 1 所示:

[0003]

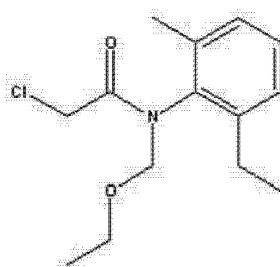


式 1。

[0004] 氯嘧磺隆是超高效的磺酰脲类除草剂,作用靶标为植物体内的 ALS(乙酰乳酸合成酶),抑制支链氨基酸缬氨酸、异亮氨酸的生物合成,导致底物  $\alpha$ -丁酮积累,阻碍细胞分裂间期 DNA 合成,使有丝分裂停止,细胞不能正常生长。氯嘧磺隆可被植物的根、茎、叶吸收,在植物体内进行上下传导,是选择性芽前、芽后除草剂,主要用于大豆等农田,防除阔叶杂草和某些莎草科及禾本科杂草。

[0005] 乙草胺,英文通用名称 acetochlor,化学名称 2-乙基-6-甲基-N-乙氧基氨基- $\alpha$ -氯代乙酰替苯胺,结构式如式 2 所示:

[0006]



式 2。

[0007] 乙草胺是内吸性酰胺类除草剂,是农业生产中用量最大的几种除草剂之一。能被杂草幼芽和幼根吸收,抑制杂草蛋白质合成,而使杂草死亡。用于玉米、棉花、大豆、花生、油菜、马铃薯、甘蔗、芝麻、向日葵和豆科、十字花科、茄科、菊科、伞形花科等多种蔬菜田及果园防除一年生禾本科杂草和部分阔叶杂草,对大豆菟丝子有良好防效,对多年生杂草无效,在土壤中持效期可达 2 个月,一次施药可控制整个作物生育期无杂草危害。

[0008] 化学除草剂的大量使用大大提高农业生产效率,但同时也带来了很大的生产和环境问题,如长残效除草剂对后茬作物的药害日趋严重,影响农业种植业结构调整,给农业生产造成严重损失。氯嘧磺隆具有用量少、活性高、除草效果好等优点,深得广大农民喜爱,但

氯嘧磺隆是长效除草剂,在土壤中残效期较长,可达 2—3 年,对后茬作物如甜菜、马铃薯、瓜类、高粱、油菜、玉米等都会产生不同程度的药害,使植物生长缓慢、生长点坏死、分枝及茎基部老化、节间缩短、植株矮化、成熟期推迟,甚至导致作物死亡。在使用过氯嘧磺隆的大豆田中再种植向日葵,将会导致后茬向日葵大面积受害绝产。

[0009] 自然界的除草剂残留的降解主要靠土壤中微生物来完成,但自然降解十分缓慢。因此,有针对性地筛选高效微生物菌株,研制微生物修复剂,通过人工接种加速土壤长残留除草剂的降解消除农田除草剂残留药害是一项十分必要的工作和切实可行的途径。

## 发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一株可以高效降解除草剂氯嘧磺隆和乙草胺的细菌。

[0011] 本发明所提供的细菌是纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114,该菌株已于 2013 年 6 月 20 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(简称 CGMCC,地址为:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号),保藏编号为 CGMCC No. 7776。

[0012] 本发明的另一个目的是提供一种菌剂,该菌剂的活性成分为所述的纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776。

[0013] 所述菌剂为下述 1) 或 2) 所述菌剂:

[0014] 1) 用于降解除草剂氯嘧磺隆和 / 或乙草胺的菌剂;

[0015] 2) 用于修复土壤残留除草剂氯嘧磺隆和 / 或乙草胺污染的菌剂。

[0016] 所述菌剂还可包括载体。所述载体可为固体载体或液体载体。所述固体载体为矿物材料、植物材料或高分子化合物;所述矿物材料为粘土、滑石、高岭土、蒙脱石、白碳、沸石、硅石和硅藻土中的至少一种;所述植物材料为玉米粉、豆粉和淀粉中的至少一种;所述高分子化合物为聚乙烯醇和 / 或聚二醇。所述液体载体为有机溶剂、植物油、矿物油或水;所述有机溶剂为癸烷和 / 或十二烷。所述菌剂中,所述活性成分可以以被培养的活细胞、活细胞的发酵液、细胞培养物的滤液或细胞与滤液的混合物的形式存在。所述组合物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。

[0017] 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。

[0018] 所述的纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 或以纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 为活性成分的菌剂在降解除草剂氯嘧磺隆和 / 或乙草胺中的应用也属于本发明的保护范围。

[0019] 所述的纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 或以纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 为活性成分的菌剂在修复土壤残留除草剂氯嘧磺隆和 / 或乙草胺污染中的应用也属于本发明的保护范围。

[0020] 本发明的再一个目的是提供一种培养纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 的方法,该方法包括将纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 在用于培养纤维微菌的培养基中培养的步骤。

[0021] 本发明的又一个目的是提供一种以纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 为活性成分的菌剂的制备方法,包括如下步骤:将所述的纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 作为活性成分,得到所述菌剂。

[0022] 本发明是从长期受到残留除草剂氯嘧磺隆和乙草胺污染的农田采集土样,并从中分离、筛选得到的降解除草剂氯嘧磺隆和乙草胺菌株纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.) LY1114CGMCC No. 7776。实验证明,该菌株在无机盐培养基中 7d 对氯嘧磺隆(45mg/L)降解率达到 89.11%;对乙草胺(45mg/L)降解率达到 32.08%。这表明,该菌株能高效降解除草剂氯嘧磺隆和乙草胺,在修复土壤残留除草剂氯嘧磺隆和乙草胺污染方面具有广阔的应用前景。

[0023] 保藏说明

[0024] 菌种名称:纤维微菌

[0025] 拉丁名:(*Cellulosimicrobium* sp.)

[0026] 菌株编号:LY1114

[0027] 保藏机构:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

[0028] 保藏机构简称:CGMCC

[0029] 地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号

[0030] 保藏日期:2013 年 6 月 20 日

[0031] 保藏中心登记入册编号:CGMCC No. 7776

### 具体实施方式

[0032] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0033] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0034] 富集培养液: $K_2HPO_4$ 7g/L,  $KH_2PO_4$ 2g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g/L,  $MnSO_4$ 0.05g/L,  $FeSO_4$ 0.05g/L,  $CaCl_2$ 0.003g/L, 葡萄糖 5g/L, 用蒸馏水定容至 1L, pH7.0;(氯嘧磺隆和乙草胺用量按照下文实施例 1 添加)。

[0035] 分离培养基:向富集培养液中加入琼脂至其质量浓度为 2%。

[0036] 无机盐液体培养基: $NH_4Cl$ 11.0g/L,  $KH_2PO_4$ 0.5g/L,  $K_2HPO_4$ 1.5g/L,  $MgSO_4$ 0.2g/L,  $NaCl$ 0.5g/L, 用蒸馏水定容至 1L, pH7.0。

[0037] 无机盐固体培养基:向无机盐液体培养基中加入琼脂至其质量浓度为 2%。

[0038] 牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 5g/L, 蛋白胨 10g/L,  $NaCl$ 5g/L, 琼脂 20g/L, 用蒸馏水定容至 1L, pH7.2。

[0039] 实施例 1、纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.) LY1114CGMCC No. 7776 的分离与鉴定

[0040] 一、除草剂降解菌 LY1114 的分离

[0041] 在 100mL 含氯嘧磺隆 20mg/L 的富集培养液中加入 10g 土壤样品(采自中国山东省受到除草剂乙草胺污染的农田), 28℃、180r/min 振荡培养 7d 富集氯嘧磺隆降解菌。第一轮富集结束后, 吸取 10mL 富集液转移至含氯嘧磺隆 40mg/L 的 100mL 富集培养液中, 继续培养 7d 进行第二轮富集。如此连续富集、培养 5 次, 氯嘧磺隆浓度依次为 20、40、60、80 和 100mg/L。

[0042] 降解菌的筛选采用平板透明圈法。将氯嘧磺隆加入无机盐固体培养基制成平板, 终浓度为 1000mg/L。将平板均分为四个区, 每区标记不同样品(富集液)编号, 取富集液 15  $\mu$ L 点种到编号区域, 28℃ 培养、观察。将有透明圈出现的样品(富集液)用无菌水倍比

稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  梯度,取  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  梯度各 100  $\mu$ L 至上述含氯嘧磺隆 1000mg/L 的无机盐固体培养基,每个梯度 3 个重复,涂布均匀。28 $^{\circ}$ C 培养、观察,待平板上出现单菌落后,挑取有透明圈的单菌落转接至牛肉膏蛋白胨培养基上,25 $^{\circ}$ C 培养,纯化,备用。

[0043] 经过大量的富集培养,分离到能够在含氯嘧磺隆 1000mg/L 的无机盐平板培养基上形成透明圈的菌株 60 余株。进一步筛选后,获得一个编号为 LY1114 的菌株,命名为除草剂降解菌 LY1114,该菌株能够在纯培养条件下,将初始浓度 45mg/L 的氯嘧磺隆在 7d 内降解 89.11%;而且还能降解乙草胺,7d 将初始浓度 45mg/L 的乙草胺降解到 32.08%。

[0044] 二、除草剂降解菌 LY1114 的鉴定

[0045] 从以下几个方面鉴定步骤一分离并纯化得到的除草剂降解菌 LY1114:

[0046] 1、形态学鉴定

[0047] 将处于对数生长期,且菌落大小稳定,上述步骤一分离并纯化得到的除草剂降解菌 LY1114 进行单菌落状态观察,主要包括菌落的大小、颜色、透明度、湿润度、菌落表面状态(是否平坦、突起、褶皱、凹陷等)、菌落边缘状态(是否整齐、不规则、放射状等)。

[0048] 对于处于对数生长期的所述除草剂降解菌 LY1114,经涂片染色后采用光学显微镜观察菌体的形态。

[0049] 结果表明,上述步骤一分离并纯化得到的除草剂降解菌 LY1114 菌落圆形凸起、淡黄色、表面光滑湿润、边缘整齐;菌体短杆状,革兰氏染色阳性。

[0050] 2、生理生化特征分析

[0051] 参考《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社,2011.)和《微生物学实验》(沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验(第三版). 北京:高等教育出版社,1999.)测定上述除草剂降解菌 LY1114 的生理生化特征。

[0052] 所述除草剂降解菌 LY1114 的生理生化特征测定结果如表 1 所示:

[0053] 表 1 除草剂降解菌 LY1114 的生理生化特征



生理生化特征	实验结果	生理生化特征	实验结果
接触酶反应	+	D+葡萄糖	+
氧化酶反应	-	D+蔗糖	+
VP 反应	-	D+乳糖	+
吲哚实验	+	D+半乳糖	+
明胶液化	+	L+阿拉伯糖	+
淀粉水解	+	D+果糖	+
[0054] 卵磷脂酶	-	D+甘露醇	+
硝酸盐还原	+	D+山梨醇	+
甲基红	+	D+麦芽糖	+
石蕊牛奶反应	+	木糖	+
柠檬酸盐利用	-	甘油	+
苯丙氨酸脱氨酶	-		
产二羟基丙酮	-	pH 5.7 生长测定	+
葡萄糖产气	-		

[0055] 注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。

[0056] 3、16s rDNA 序列同源性分析

[0057] 常规方法培养上述步骤一分离纯化得到的除草剂降解菌 LY1114, 提取菌株的总 DNA 作为基因扩增模板, 以细菌 16s rDNA 通用引物, 27f :5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' , 1492r :5' -TACCTTGTTACGACTT-3' 进行 PCR 反应。反应体系采用上海生物工程有限公司 PCR 扩增试剂盒。反应程序为 :95℃ 变性 30s、55℃ 退火 1min、72℃ 延伸 2min, 共 30 个循环。DNA 测序由北京三博远志生物技术公司完成, 序列拼接及相似性分析使用 DNASTar 软件完成, 基因比对通过美国国家生物技术信息中心 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 和 EzTaxon 在线完成。

[0058] PCR 基因扩增得到除草剂降解菌 LY1114 的 16S rDNA 基因片段约 1.4kb, 测定序列后与 NCBI 和 Ez Taxon 数据库中已公开的 16S rDNA 序列进行在线同源性比对, 结果显示 LY1114 与芬克纤维微菌 *Cellulosimicrobium funkei* ATCC BAA-886<sup>T</sup> (GenBank 登录号 AY501364) 的同源性最高, 达到 99.709%。

[0059] 除草剂降解菌 LY1114 的 16s rDNA 序列详见序列表中序列 1。

[0060] 鉴于上述形态、生理生化特征分析和 16s rDNA 序列同源性分析结果, 将步骤一分离纯化得到的除草剂降解菌 LY1114 鉴定为细菌域放线菌群微球菌科 (Micrococcineneae) 纤维微菌属 (*Cellulosimicrobium* sp.)。该除草剂降解菌 LY1114 已于 2013 年 6 月 20 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 (简称 CGMCC, 地址为 :北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号), 保藏编号为 CGMCC No. 7776。

[0061] 实施例 2、纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.) LY1114CGMCC No. 7776 降解除草剂

## 氯嘧磺隆和乙草胺能力定量测定

### [0062] 一、氯嘧磺隆测定标准曲线制作

[0063] 用甲醇将氯嘧磺隆标准品(购自 Fluka 公司)配制成系列浓度 10、20、40、60、80、100mg/L 标准溶液,采用高效液相色谱(HPLC)测定不同浓度氯嘧磺隆标准品的峰面积,3 次重复。以氯嘧磺隆的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制氯嘧磺隆标准曲线。

[0064] 检测条件如下:

[0065] 检测系统:Agilent1100Series。色谱柱:C18Diamosil™ 反相柱,250mm×4.6mm,粒径 5 μm。色谱条件:流动相:乙腈:甲醇:水:冰乙酸=45:15:40:0.1 (v/v);检测波长,236nm;流速,1.0mL/min;进样体积,10 μL;柱温 30℃。

[0066] 测定结果如表 2 所示:

[0067] 表 2 不同浓度氯嘧磺隆 HPLC 测定峰面积

氯嘧磺隆 (mg/L)	10	20	40	60	80	100
峰面积	351.7	680.1	1350.8	1865.7	2626.8	3457.0

[0069] 根据表 2 数据,得到氯嘧磺隆测定标准曲线: $y=33.717x-20.032$  ( $R^2=0.9950$ )。其中,  $y$  为峰面积,  $x$  为氯嘧磺隆浓度。

### [0070] 二、乙草胺测定标准曲线制作

[0071] 用甲醇将乙草胺标准品(购自 Fluka 公司)配制成系列浓度 10、20、40、60、80、100mg/L 标准溶液,采用高效液相色谱法(HPLC)测定不同浓度乙草胺标准品的峰面积,3 次重复。以乙草胺的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制乙草胺标准曲线。

[0072] 检测条件如下:

[0073] 检测系统:Agilent1100Series。色谱柱:C18Diamosil™ 反相柱,250mm×4.6mm,粒径 5 μm。色谱条件:流动相:甲醇:水=80:20 (v/v),水用冰醋酸调至 pH=3;检测波长,215nm;流速,1.0mL/min;进样体积,20 μL;柱温 30℃。

[0074] 测定结果如表 3 所示:

[0075] 表 3 不同浓度乙草胺 HPLC 测定峰面积

乙草胺 (mg/L)	10	20	40	60	80	100
峰面积	2129.48	2643.96	3672.92	4701.88	5730.84	6759.8

[0077] 根据表 3 数据,得到乙草胺测定标准曲线: $y=51.44x+1615$  ( $R^2=0.999$ )。其中,  $y$  为峰面积,  $x$  为乙草胺浓度。

### [0078] 三、纤维微菌 (Cellulosimicrobium sp.) LY1114CGMCC No. 7776 降解氯嘧磺隆能力定量测定

[0079] 在试管中准确加入 5mL 含氯嘧磺隆约 50mg/L 的无机盐培养基(向无机盐液体培养基中加入氯嘧磺隆使氯嘧磺隆的浓度为约 50mg/L 得到的培养基),再加入 OD600nm=1.0 的纤维微菌 (Cellulosimicrobium sp.) LY1114CGMCC No. 7776 菌液( $1 \times 10^9$  cfu/ml) 0.2mL,



28℃、180r/min 培养 7 天,取 4mL 降解液至 50mL 离心管中,加入 4mL 二氯甲烷,振荡 2min,静置 10min,加入少许无水硫酸钠。准确吸取 500 μL 有机相转移至 1.5mL EP 离心管中,在氮吹仪上吹干,加入 500 μL 甲醇(色谱级),在超声波清洗仪上溶解 10min,用液谱过滤器过滤收集至样品瓶中,按照上述 HPLC 法测定氯嘧磺隆。同时,以没有接种纤维微菌(*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 的上述含氯嘧磺隆约 50mg/L 的无机盐培养基作为空白对照,按照上述方法测定氯嘧磺隆的浓度。

[0080] 氯嘧磺隆降解率:  $X=(1-A/B) \times 100\%$ , 式中 X 为降解率(%), A 为接菌处理液中残留的氯嘧磺隆浓度, B 为未接菌空白对照处理液中残留的氯嘧磺隆浓度。实验设 3 次重复,每次重复每个处理接种 1 个试管。

[0081] 结果显示,氯嘧磺隆初始浓度为 45.09mg/L,7 天后所述纤维微菌(*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 对氯嘧磺隆的降解率达到 89.11% (如表 4 所示)。这一结果表明,本发明所提供的纤维微菌(*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 可高效降解氯嘧磺隆。

[0082] 表 4 纤维微菌(*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 降解氯嘧磺隆功效

[0083]

试验处理	初始 HPLC 峰 面积	初始氯嘧 磺隆 含量 (mg/L)	7 d HPLC 峰 面积	氯嘧磺隆 残留 (mg/L)	降解 率 (%)
空白对照	1501.6	45.13	1432.2	43.07	
纤维微菌( <i>Cellulosimicrobium</i> sp.) LY1114 CGMCC No. 7776	1500.3	45.09	138.1	4.69	89.11

[0084] 四、纤维微菌(*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 降解乙草胺能力定量测定

[0085] 在 50mL 含乙草胺约 50mg/L 的无机盐培养基的三角瓶(容积为 250ml)中接入 OD600nm=1.0 的纤维微菌(*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 菌液( $1 \times 10^9$ cfu/ml) 2mL, 30℃, 200r/min 摇床培养 7 天,测定乙草胺残留量。方法为:取 3mL 降解液至 50mL 离心管中,8000r/min 离心 5min 收集上清液,加入 3mL 二氯甲烷,剧烈振荡 5min,静置 10min,待水相和有机相分层,加入少量无水硫酸钠对有机相进行脱水,准确吸取 800 μL 有机相于 1.5mL 的离心管中,用氮吹仪吹干,加入 400 μL 甲醇,在超声波清洗器中超声 10min,用 0.22 μm 的有机相针刺式过滤器过滤至液相色谱样品瓶,按照上述 HPLC 法测定乙草胺。同时,以没有接入纤维微菌(*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 的上述含乙草胺约 50mg/L 的无机盐培养基作为空白对照,按照上述方法测定乙草胺的浓度。乙草胺降解率:  $X=(1-A/B) \times 100\%$ , 式中 X 为降解率(%), A 为接菌处理液中残留的乙草胺浓度, B 为未接菌空白对照处理液中残留的乙草胺浓度。实验设 3 次重复,每次重复每个处理接种 1 个三角瓶。

[0086] 结果显示,乙草胺初始浓度为 44.78mg/L,7 天后所述纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 对乙草胺的降解率达 32.08% (如表 5 所示)。这一结果表明,本发明所提供的纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 可高效降解乙草胺。

[0087] 表 5 纤维微菌 (*Cellulosimicrobium* sp.)LY1114CGMCC No. 7776 降解乙草胺功效  
[0088]

试验处理	初始 HPLC 峰 面积	初始乙草 胺 含量 (mg/L)	7 d HPLC 峰 面积	乙草胺 残留 (mg/L)	降解 率 (%)
空白对照	3931.18	45.02	3873.05	43.89	
纤维微菌 ( <i>Cellulosimicrobium</i> sp.) LY1114 CGMCC No. 7776	3918.84	44.78	3148.66	29.81	32.08

## 序列表

- <110> 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所  
 <120> 一株降解除草剂氯嘧磺隆和乙草胺的细菌及其用途  
 <130> CGGNAR132666  
 <160> 1  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 1375  
 <212> DNA  
 <213> 纤维微菌(*Cellulosimicrobium sp.*)

<400> 1  
 gcgaacgggt gggccatggg ctccgggtgt taccgacttt cgtgacttga cgggcgggtgt 60  
 gtacaaggec cgggaacgta ttcaccgcag cgttgetgat ctgcgattac tagcgactec 120  
 gacttcattg ggtcagattg cagaccccaa tccgaactga gaccggcttt ttggattcg 180  
 ctccacetta cggtatcgca gccctttgta ccggccattg tagcatgctt gaagcccaag 240  
 acataagggg catgatgatt tgacgtcate cccacctcc tccgagttga ccccggcagt 300  
 ctcccatgag tcccggcat aaccgcctgg caacatggga cgagggttgc gctcgttgcg 360  
 ggacttaace caacatctca cgacacgagc tgacgacaac catgcaccac ctgtgcacga 420  
 gtgtccaaag agaccacat ctctggtggc ttccegtgea tgtcaagcet tggtaaggtt 480  
 cttecgcttg cctegaatta atccgatgc tccgccctt gtgcgggccc cgtcaattc 540  
 ctttgattt tagccttgcg gccgtactcc ccaggcgggg cacttaatgc gtttgetgcg 600  
 gcacggact cgtggaatga gcccacacc tagtgcctaa cgtttacggc atggactacc 660  
 aggtttcta atcctgttcg ctcccatgt tttcctccc agcgtcagtt gcggcccaga 720  
 gacctgcctt cggcatcgtt gttcctctg atatctgege attccaccgc tacaccagga 780  
 attccagtet ccctaccgc actctagtct gccctaccg gatgcaagct cgaggttgag 840  
 cctcgagttt tcacaccaga cgcgacaaac cgcctacgag ctctttaccg ccaataattc 900  
 cggacaacgc ttgcgcctc cgtattaccg cggetgetgg cacgtagtta gccggcctt 960  
 cttctgcagg taccgtcact tgccttctt cctgctgaa agaggtttac aaccogaagg 1020  
 ccttateccc tcacgcggcg tgcctcacc aggettctgc ccattgtgca atattcccca 1080

ctgctgcctc ccgtaggagt ctgggccgtg tctcagtccc agtgtggccg gtcgccctct	1140
caggceggct acccgtegtc gcttiggtag gccatcaccc caccaacaag ctgatagccc	1200
gcgagcccat cctgaccga aaaactttcc aaccaccccc atgcgaaggt agctcatatc	1260
cggtattage cccggtttcc eggagttatc ccgaagtcaa gggcaggtta ctcagtggtt	1320
actaccctgt tcgccactaa tccaccceage aagetgggca tcatcgtega ctgca	1375

www.patviewer.com