



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104388354 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 04

(21) 申请号 201410704883. 4

C12R 1/41(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 11. 26

A62D 101/04(2007. 01)

A62D 101/28(2007. 01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC No9864 2014. 10. 28

(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 高淼 孙建光 张磊 孙颖飞

(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10页
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

一株降解除草剂的细菌及其用途

(57) 摘要

本发明公开了一株降解除草剂的细菌及其用途。该降解除草剂的细菌是根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30, 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. 9864。本发明提供的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30 CGMCC No. 9864 在无机盐培养基中 7 天对 100mg/L 普施特的降解率达到 93.40%; 对 50mg/L 乙草胺降解率达到 88.44%; 对 100mg/L 氯嘧磺隆降解率达到 41.15%; 对 100mg/L 杂草焚的降解率达到 12.28%。这表明该菌株能降解除草剂普施特、乙草胺、氯嘧磺隆和杂草焚。

1. 根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30,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. 9864。
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 所述的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30 CGMCC No. 9864。
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) 用于降解除草剂的菌剂;所述除草剂为普施特、乙草胺、氯嘧磺隆和杂草焚中至少一种;
 - 2) 用于修复土壤除草剂污染的菌剂;所述除草剂为普施特、乙草胺、氯嘧磺隆和杂草焚中至少一种。
4. 权利要求 1 所述的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30 CGMCC No. 9864、或权利要求 2 或 3 所述的菌剂在降解除草剂中的应用;所述除草剂为普施特、乙草胺、氯嘧磺隆和杂草焚中至少一种。
5. 权利要求 1 所述的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30 CGMCC No. 9864、或权利要求 2 或 3 所述的菌剂在修复土壤除草剂污染中的应用;所述除草剂为普施特、乙草胺、氯嘧磺隆和杂草焚中至少一种。
6. 培养权利要求 1 所述根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30 CGMCC No. 9864 的方法,包括将所述根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30 CGMCC No. 9864 在用于培养根瘤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 所述的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30 CGMCC No. 9864 作为活性成分,得到所述菌剂。

一株降解除草剂的细菌及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物领域中一株可以降解除草剂的细菌及其用途,所述除草剂可为普施特、乙草胺、氯嘧磺隆和杂草焚中的至少一种。

背景技术

[0002] 普施特,又名咪草烟,英文名称 Pursuit(imazethapyr-ammonium),化学名称(RS)-5-乙基-2-(4-异丙基-4-甲基-5-氧代-2-咪唑啉-2-基)烟酸。普施特是咪唑啉酮类除草剂,是侧链氨基酸合成抑制剂,芽前或芽后均可施用,对大豆和其他豆科植物农田的禾本科杂草和某些阔叶杂草如苋菜、蓼、藜、龙葵、苍耳、稗草、狗尾草、马唐、黍等有优异的防治效果。

[0003] 乙草胺,英文通用名称 acetochlor,化学名称是 2-乙基-6-甲基-N-乙氧基甲基- α -氯代乙酰替苯胺。乙草胺是内吸性酰胺类除草剂,是选择性的芽前除草剂。能被杂草的幼芽和幼根吸收,抑制杂草蛋白质合成,而使杂草死亡。主要用于大豆、花生、玉米、棉花等作物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。

[0004] 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。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 α -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] 杂草焚,又名三氟羧草醚,英文名称 acifluorfen,化学名称 5-(2-氯- α , α , α -三氟对甲苯氧基)2-硝基苯甲酸。杂草焚是二苯醚类除草剂,属接触性除草剂,是原卞咪氧化酶抑制剂。通常采用 25% 水剂进行大豆苗前表土处理及苗后经叶喷雾,可有效防除大豆田阔叶杂草如苍耳、苘麻、龙葵、苋、藜、蓼、牵牛、豚草、曼陀罗、马齿苋、铁苋菜、鬼针草、鼬瓣花、鸭跖草等,苗后早期处理也可防除包括狗尾草在内的一年生禾本科杂草。喷药后,大豆会不同程度受害,表现为叶片黄化、皱缩、褐变等,但 6~7 天后恢复正常。

[0006] 普施特和氯嘧磺隆为长残效除草剂,优点是除草效果好、杀草谱宽、用药量少、使用方便、用药成本低,但它们在土壤中残留时间长,一般可达 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。主要表现为:一是在黑龙江、吉林、内蒙古一些地方把大豆田改为水田,种植水稻受害严重,甚至绝产;二是除草剂施后 3-4 年仍有药害,导致甜菜种植业下滑;三是经济作物发展受影响,白瓜籽、向日葵、马铃薯、亚麻和蔬菜等受到伤害,严重者基地受毁;四是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。

[0007] 乙草胺和杂草焚半衰期较短,一直被认为是一种低毒的环境友好型农药,但近年

来频繁、过量或使用不当,对农田土壤和地下水等造成了不同程度的污染,对后茬作物的危害也越来越严重。研究表明,在环境中大量施用乙草胺和杂草焚造成一定的残留毒性,其在地下水、地表水中可以残留数年,进入到环境中通过食物链在生物体内不断富集,对鱼类有较强的毒性,对环境污染很大。尤其乙草胺可以引起生物体的内分泌紊乱,造成不育、不正常的性别差异甚至致癌,已被美国环保局定为致癌物。

[0008] 自然界除草剂残留的降解主要依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除草剂残留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

[0009] 本发明所要解决的技术问题是如何降解除草剂,所述除草剂可为普施特、乙草胺、氯嘧磺隆和杂草焚中的至少一种。

[0010] 为解决上述技术问题,本发明提供了一株可以降解除草剂的细菌,所述除草剂可为普施特、乙草胺、氯嘧磺隆和杂草焚中的至少一种。

[0011] 本发明提供的细菌是根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30,该菌株已于2014年10月28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. 9864。

[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根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864。

[0013] 上述菌剂可为下述1)或2)所述菌剂:

[0014] 1) 用于降解除草剂普施特、乙草胺、氯嘧磺隆和杂草焚中至少一种的菌剂;

[0015] 2) 用于修复土壤除草剂普施特、乙草胺、氯嘧磺隆和杂草焚中至少一种污染的菌剂。

[0016] 所述菌剂还可以包括载体。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和/或聚二醇。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] 所述的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864或以根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864为活性成分的菌剂在降解除草剂普施特、乙草胺、氯嘧磺隆和杂草焚中至少一种的应用也属于本发明的保护范围。

[0019] 所述的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864或以根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864为活性成分的菌剂在修复土壤除草剂普施特、乙草胺、氯嘧磺隆和杂草焚中至少一种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根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 的方法。

[0021] 本发明所提供的培养根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 的方法, 包括将根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 在用于培养根瘤菌的培养基中培养的步骤。

[0022] 本发明的又一个目的是提供一种以根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 为活性成分的菌剂的制备方法。

[0023] 本发明所提供上述菌剂的制备方法, 包括如下步骤: 将所述的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 作为活性成分, 得到所述菌剂。

[0024] 本发明是从长期受到除草剂普施特、乙草胺、氯嘧磺隆和杂草焚污染的农田采集土样, 并从中分离筛选得到的除草剂降解菌根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864。实验证明, 该菌株在无机盐培养基中 7 天对 100mg/L 普施特的降解率达到 93.40%; 对 50mg/L 乙草胺降解率达到 88.44%; 对 100mg/L 氯嘧磺隆降解率达到 41.15%; 对 100mg/L 杂草焚的降解率达到 12.28%。这表明该菌株能降解除草剂普施特、乙草胺、氯嘧磺隆和杂草焚, 在修复土壤除草剂普施特、乙草胺、氯嘧磺隆和杂草焚污染方面具有广阔的应用前景。

[0025] 保藏说明

[0026] 菌种名称: 根瘤菌

[0027] 拉丁名: (*Rhizobium* sp.)

[0028] 菌株编号: 198-L-30

[0029] 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

[0030] 保藏机构简称: CGMCC

[0031] 地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号

[0032] 保藏日期: 2014 年 10 月 28 日

[0033] 保藏中心登记入册编号: CGMCC No. 9864

具体实施方式

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 下述实施例中所用的培养基如下:

[0037] 无氮液体培养基: 溶质及其浓度为蔗糖 10g/L, NaCl 0.12g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5g/L, $CaCO_3$ 1g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g/L; 溶剂为蒸馏水; pH7.2。

[0038] 无氮固体培养基: 向无氮液体培养基中加琼脂至其含量为 15-20g/L 得到的培养基。

[0039] 牛肉膏蛋白胨液体培养基: 溶质及其浓度为牛肉膏 5g/L、蛋白胨 10g/L、NaCl 15g/L; 溶剂为蒸馏水; pH7.2。

[0040] 牛肉膏蛋白胨固体培养基: 溶质及其浓度为牛肉膏 5g/L、蛋白胨 10g/L、NaCl 15g/L、琼脂 15-20g/L; 溶剂为蒸馏水; pH7.2。

[0041] 无机盐液体培养基: 溶质及其浓度为 NH_4Cl 1.0g/L, KH_2PO_4 0.5g/L, K_2HPO_4 1.5g/L,

MgSO₄ 0.2g/L, NaCl 0.5g/L; 溶剂为蒸馏水; pH7.2。

[0042] 无机盐固体培养基: 向无机盐液体培养基中加琼脂至其含量为 2% 得到的培养基。

[0043] 下述实施例中的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) LD1616CGMCC No. 7775 (简称根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) LD1616) 已在中国发明专利文献 CN 103343100B 中公开。

[0044] 实施例 1、根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 的分离与鉴定

[0045] 一、除草剂降解菌 198-L-30 的分离

[0046] 1、在 100ml 无菌水中加入 10g 土壤样品 (采自中国黑龙江黑河受除草剂污染的农田), 振荡培养 30min 制成混浊液。吸取 1ml 上述混浊液加入盛有 9ml 无菌水中的试管中充分混匀 (此时稀释度记为 10⁻¹), 然后从此试管中吸取 1ml 加入到另一盛有 9ml 无菌水的试管中混合均匀, 以此类推制成 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 不同稀释度的菌悬液。将各稀释度取 0.1ml 均匀涂布在无氮固体培养基平板上, 28℃ 恒温静置培养 2—3 天。待菌落形成后, 在无氮固体培养基平板上进行菌种纯化。

[0047] 2、对除草剂普施特、乙草胺、氯嘧磺隆和杂草焚降解能力的初步筛选采用平板透明圈法。将普施特标准品 (Fluka 公司产品) 加入无机盐固体培养基使其含量为 1000mg/L, 得到普施特平板; 将乙草胺标准品 (Fluka 公司产品) 加入无机盐固体培养基使其含量为 1000mg/L, 得到乙草胺平板; 将氯嘧磺隆标准品 (Fluka 公司产品) 加入无机盐固体培养基使其含量为 1000mg/L, 得到氯嘧磺隆平板; 将杂草焚标准品 (Fluka 公司产品) 加入无机盐固体培养基使其含量为 1000mg/L, 得到杂草焚平板。将普施特平板、乙草胺平板、氯嘧磺隆平板和杂草焚平板进行分区。吸取步骤 1 纯化得到的每株菌的菌悬液 10 μL 和本实验室的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) LD1616 的菌悬液 10 μL (各种菌株菌悬液的菌体含量相同) 分别点种到四种平板上 (每株菌在一个平板上重复 3 次), 28℃ 培养、观察。筛选到一株在普施特平板、乙草胺平板、氯嘧磺隆平板和杂草焚平板上均能形成较大透明圈的菌株, 将该菌株命名为除草剂降解菌 198-L-30。根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) LD1616 只在氯嘧磺隆平板上形成较大透明圈, 在普施特平板、乙草胺平板和杂草焚平板上均不能形成透明圈。说明除草剂降解菌 198-L-30 能降解氯嘧磺隆、普施特、乙草胺和杂草焚; 根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) LD1616 能降解氯嘧磺隆, 不能降解普施特、乙草胺和杂草焚。

[0048] 表 1. 除草剂降解菌 198-L-30 和根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) LD1616 对四种除草剂降解能力初筛结果

[0049]

菌株编号	普施特	乙草胺	氯嘧磺隆	杂草焚
除草剂降解菌 198-L-30	+	+	+	+
根瘤菌 (<i>Rhizobium</i> sp.) LD1616	-	-	+	-

[0050] 注: “+” 表示形成较大透明圈, “-” 表示无透明圈形成。

[0051] 二、除草剂降解菌 198-L-30 的鉴定

[0052] 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 198-L-30:

[0053] 1、形态学鉴定

[0054] 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 198-L-30 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)。

[0055] 结果表明,上述步骤一分离并纯化得到的除草剂降解菌 198-L-30 菌落圆形凸起,乳白色,湿润不透明,边缘规则,直径 0.9-1.5mm。

[0056] 2、生理生化特征分析

[0057] 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 198-L-30 的生理生化特征。

[0058] 所述除草剂降解菌 198-L-30 的生理生化特征测定结果如表 2 所示:

[0059] 表 2. 除草剂降解菌 198-L-30 的生理生化特征

[0060]

生理生化特征	实验结果	生理生化特征	实验结果	
淀粉水解	+	糖 醇 发 酵	D-葡萄糖	+
硝酸盐还原反应	+		D-蔗糖	+
甲基红试验	-		D-乳糖	-
利用柠檬酸盐	+		D-半乳糖	+
苯丙氨酸脱氨酶	-		L-阿拉伯糖	+
接触酶反应	+		D-果糖	+
氧化酶反应	+		D-甘露醇	-
V.P 试验	-		D-山梨醇	+
卵磷脂酶	-		D-麦芽糖	+
吲哚试验	+		木糖	+
石蕊牛奶反应	+		甘油	+
明胶液化	-			

[0061] 注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

[0062] 3、16S rDNA 序列同源性分析

[0063] 常规方法培养上述步骤一分离纯化得到的除草剂降解菌 198-L-30,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。

[0064] PCR 基因扩增得到除草剂降解菌 198-L-30 的 16S rDNA 基因片段约 1.3kb,测定序列后与 NCBI 和 EzTaxon 数据库中已公开的 16S rDNA 序列进行在线同源性比对,结果显示除草剂降解菌 198-L-30 与根瘤菌属 *Rhizobium nepotum* 同源性最高,达到 99.77%。

[0065] 除草剂降解菌 198-L-30 的 16S rDNA 序列详见序列 1。

[0066] 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 198-L-30 鉴定为根瘤菌属 (*Rhizobium* sp.)。该除草剂降解菌 198-L-30 已于 2014 年 10 月 28 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. 9864。除草剂降解菌 198-L-30 的全称为根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864, 简称为根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30。

[0067] 实施例 2、根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 降解普施特能力定量测定

[0068] 一、普施特测定标准曲线的绘制

[0069] 准确称取普施特标准品 (Fluka 公司产品) 10.0mg 于 10mL 容量瓶中, 用少量甲醇溶解, 将容量瓶放在超声波浴槽中振荡 10min, 然后用甲醇定容至 10mL, 摇匀, 配成 1000mg/L 普施特母液。继续用甲醇稀释配制 20、40、60、80、100mg/L 系列普施特标准品溶液。采用高效液相色谱 (HPLC) 测定不同浓度普施特标准品的峰面积, 3 次重复。以普施特浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制普施特标准曲线, 如图 1 所示。

[0070] 检测条件如下:

[0071] 检测系统: Agilent 1100Series。色谱柱: C18Diamosil™ 反相柱, 250mm×4.6mm, 粒径 5μm。色谱条件: 流动相: 乙腈: 水 (冰乙酸调 pH3.0) = 40:60 (v/v); 检测波长, 258nm; 流速, 1.0mL/min; 进样体积, 10μL; 柱温 30℃。

[0072] 所得普施特测定标准曲线: $y = 24.482x - 6.6979$ ($R^2 = 0.9998$)。其中, y 为峰面积, x 为普施特浓度。

[0073] 二、根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 降解普施特能力定量测定

[0074] 根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30 处理: 将根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 接种在牛肉膏蛋白胨固体培养基上培养 24h, 挑取 1 环接种在 5mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 180r/min 培养 12h, 离心去掉培养基, 用无机盐液体培养基调节到 OD_{600} 值为 1.0。吸取 0.2mL 菌悬液 (1×10^9 cfu/ml) 接种到 5mL 含普施特 100mg/L 的无机盐液体培养基 (向无机盐液体培养基中加入普施特 (Fluka 公司产品) 使普施特的浓度为 100mg/L 得到的培养基) 的试管中, 28℃, 180r/min 培养 7d, 得到降解液。取 4mL 降解液至 50mL 离心管中, 加入 8mL 二氯甲烷, 振荡 2min, 静置 10min, 加入少许无水硫酸钠。准确吸取 800μL 有机相转移至 1.5mL EP 离心管中, 在氮吹仪上吹干, 加入 400μL 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 法测定普施特。

[0075] 根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) LD1616 处理: 除将上述根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30 处理中的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 替换为根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) LD1616CGMCC No. 7775, 其余均相同。

[0076] 空白对照处理: 同时, 以未接种根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 的上述含普施特 100mg/L 的无机盐液体培养基作为空白对照, 按照上述方法测定普施特的浓度。

[0077] 普施特降解率: $X = (1 - A/B) \times 100\%$, 式中 X 为降解率 (%), A 为根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30 处理液中残留的普施特浓度或根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) LD1616 处理液中残留的普施特浓度, B 为未接菌空白对照处理液中残留的普施特浓度。实验设 3 次

重复,每次重复每个处理接种 10 个试管。测定结果如表 3 所示。

[0078] 表 3. 根瘤菌 (*Rhizobium sp.*)198-L-30CGMCC No. 9864 降解普施特功效

[0079]

实验处理	7 天 HPLC 峰面积	普施特残留 (mg/L)	降解率
空白对照	2433.00	99.65	
根瘤菌(<i>Rhizobium sp.</i>) 198-L-30 CGMCCNo. 9864	154.37	6.58	93.40%
根瘤菌(<i>Rhizobium sp.</i>)LD1616 CGMCC No. 7775	2432.45	99.63	0.02%

[0080] 结果显示,普施特初始浓度为 100mg/L,7 天后所述根瘤菌 (*Rhizobium sp.*)198-L-30CGMCC No. 9864 对普施特的降解率达到 93.40% (如表 3 所示);根瘤菌 (*Rhizobium sp.*)LD1616CGMCC No. 7775 对普施特的降解率达到 0.02%。这一结果表明,本发明所提供的根瘤菌 (*Rhizobium sp.*)198-L-30CGMCC No. 9864 可降解普施特。

[0081] 实施例 3、根瘤菌 (*Rhizobium sp.*)198-L-30CGMCC No. 9864 降解乙草胺能力定量测定

[0082] 一、乙草胺测定标准曲线制作

[0083] 准确称取乙草胺标准品 (Fluka 公司产品) 10.0mg 于 10mL 容量瓶中,用少量甲醇溶解,将容量瓶放在超声波浴槽中振荡 10min,然后用甲醇定容至 10mL,摇匀,配成 1000mg/L 乙草胺母液。然后用甲醇稀释获得浓度分别为 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,如图 2 所示。

[0084] 检测条件如下:

[0085] 检测系统:Agilent 1100Series。色谱柱:C18Diamosil™ 反相柱,250mm×4.6mm,粒径 5 μ m。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 μ L;柱温 30℃。

[0086] 所得乙草胺测定标准曲线: $y = 55.363x + 144.5$ ($R^2 = 0.9999$)。其中,y 为峰面积,x 为乙草胺浓度。

[0087] 二、根瘤菌 (*Rhizobium sp.*)198-L-30CGMCC No. 9864 降解乙草胺能力定量测定

[0088] 根瘤菌 (*Rhizobium sp.*)198-L-30 处理:将根瘤菌 (*Rhizobium sp.*)198-L-30CGMCC No. 9864 接种在牛肉膏蛋白胨固体培养基上培养 24h,挑取 1 环接种在 5mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中,180r/min 培养 12h,离心去掉培养基,用无机盐液体培养基调节到 OD₆₀₀ 值为 1.0。吸取 0.2mL 菌悬液 (1×10^9 cfu/ml) 接种到 5mL 含乙草胺 50mg/L 的无机盐液体培养基 (向无机盐液体培养基中加入乙草胺 (Fluka 公司产品) 使乙草胺的浓度为 50mg/L 得到的培养基) 的试管中,28℃,180r/min 培养 7 天,得到降解液,按照如下方法测定乙草胺残留量: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 μ L 有机相于 1.5mL 的离心管中,用氮吹仪吹干,加入 400 μ L 甲醇,在超声波清洗器中超声 10min,用 0.22 μ m 的有机相针刺式过滤器过滤至液相色谱

谱样品瓶,按照上述 HPLC 法测定乙草胺。

[0089] 根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)LD1616 处理:除将上述根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30 处理中的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30CGMCC No. 9864 替换为根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)LD1616CGMCC No. 7775,其余均相同。

[0090] 空白对照处理:同时,以未接种根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30CGMCC No. 9864 的上述含乙草胺 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。

[0091] 乙草胺降解率: $X = (1-A/B) \times 100\%$,式中 X 为降解率(%),A 为根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30 处理液中残留的乙草胺浓度或根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)LD1616 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 10 个三角瓶。

[0092] 表 4. 根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30CGMCC No. 9864 降解乙草胺功效

[0093]

实验处理	7 天 HPLC 峰面积	乙草胺残留 (mg/L)	降解率
空白对照	2558.40	43.60	
根瘤菌 (<i>Rhizobium</i> sp.) 198-L-30 CGMCC No. 9864	423.50	5.04	88.44%
根瘤菌 (<i>Rhizobium</i> sp.) LD1616 CGMCC No. 7775	2558.23	43.60	0%

[0094] 结果显示,乙草胺初始浓度为 50mg/L,7 天后所述根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30CGMCC No. 9864 对乙草胺的降解率达到 88.44%;根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)LD1616CGMCC No. 7775 对乙草胺的降解率为 0% (如表 4 所示)。这一结果表明,本发明所提供的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30CGMCC No. 9864 可降解乙草胺。

[0095] 实施例 4、根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30CGMCC No. 9864 降解氯嘧磺隆能力定量测定

[0096] 一、氯嘧磺隆测定标准曲线制作

[0097] 用甲醇将氯嘧磺隆标准品 (Fluka 公司产品) 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,如图 3 所示。

[0098] 检测条件如下:

[0099] 检测系统:Agilent 1100Series。色谱柱:C18Diamosil™ 反相柱,250mm×4.6mm,粒径 5μm。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,10μL;柱温 30℃。

[0100] 所得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。

[0101] 二、根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30CGMCC No. 9864 降解氯嘧磺隆能力定量测定

[0102] 根瘤菌 (*Rhizobium* sp.)198-L-30 处理:在试管中准确加入 5mL 含氯嘧磺隆 100mg/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 100mg/L 得到的培养基),再加入 0.2ml 的 OD₆₀₀ 值为 1.0 的根瘤菌 (*Rhizobium*

sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 菌液 (1×10^9 cfu/ml), 28°C、200r/min 培养 7 天, 得到降解液。取 4mL 降解液至 50mL 离心管中, 加入 4mL 乙腈, 振荡 2min, 静置 10min, 加入少许无水硫酸钠。准确吸取 800 μ L 有机相转移至 1.5mL EP 离心管中, 在氮吹仪上吹干, 加入 500 μ L 甲醇 (色谱级), 在超声波作用下使氯嘧磺隆完全溶解, 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。

[0103] 根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) LD1616 处理: 除将上述根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30 处理中的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30 替换为根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) LD1616CGMCC No. 7775, 其余均相同。

[0104] 空白对照处理: 以未接种根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 的上述含氯嘧磺隆 100mg/L 的无机盐液体培养基作为空白对照, 按照上述方法测定氯嘧磺隆的浓度。

[0105] 氯嘧磺隆降解率: $X = (1 - A/B) \times 100\%$, 式中 X 为降解率 (%), A 为根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30 处理液中残留的氯嘧磺隆浓度或根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) LD1616 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 10 个试管。

[0106] 测定结果如表 5 所示。

[0107] 表 5. 根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 降解氯嘧磺隆功效

[0108]

实验处理	7 天 HPLC 峰面积	氯嘧磺隆残留 (mg/L)	降解率
------	--------------	---------------	-----

[0109]

空白对照	2924.00	87.32	
根瘤菌 (<i>Rhizobium</i> sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864	1712.70	51.39	41.15%
根瘤菌 (<i>Rhizobium</i> sp.) LD1616 CGMCC No. 7775	1146.20	34.59	60.39%

[0110] 结果显示, 氯嘧磺隆初始浓度为 100mg/L, 7 天后所述根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 对氯嘧磺隆的降解率 41.15%; 根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) LD1616CGMCC No. 7775 对氯嘧磺隆的降解率 60.39% (如表 5 所示)。这一结果表明, 本发明所提供的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 可降解氯嘧磺隆。

[0111] 实施例 5、根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 198-L-30CGMCC No. 9864 降解杂草焚能力定量测定

[0112] 一、杂草焚测定标准曲线的绘制

[0113] 准确称取杂草焚标准品 (Fluka 公司产品) 10.0mg 于 10mL 容量瓶中, 用少量甲醇溶解, 将容量瓶放在超声波浴槽中振荡 10min, 然后用甲醇定容至 10mL, 摇匀, 配成 1000mg/L 杂草焚母液。将该母液用甲醇稀释得到杂草焚浓度为 10、20、40、60、80、100mg/L 系列杂草焚标准品溶液。采用高效液相色谱 (HPLC) 测定不同浓度杂草焚标准品的峰面积, 3 次重复。以杂草焚浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制杂草焚标准曲线, 如图 4 所示。

[0114] 检测条件如下：

[0115] 检测系统:Agilent 1100Series。色谱柱:C18Diamosil™反相柱,250mm×4.6mm,粒径5μm。色谱条件:流动相:乙腈:水(冰乙酸调pH3.0)=40:60(v/v);检测波长,258nm;流速,1.0mL/min;进样体积,10μL;柱温30℃。

[0116] 所得杂草焚测定标准曲线: $y = 7.3196x + 2.1212 (R^2 = 0.9875)$ 。其中,y为峰面积,x为杂草焚浓度。

[0117] 二、根瘤菌(Rhizobium sp.)198-L-30CGMCC No. 9864降解杂草焚能力定量测定

[0118] 根瘤菌(Rhizobium sp.)198-L-30处理:在试管中准确加入5mL含杂草焚100mg/L的无机盐培养基(向无机盐液体培养基中加入杂草焚(Fluka公司产品)使杂草焚的浓度为100mg/L得到的培养基),再加入0.2mL的OD₆₀₀值为1.0的根瘤菌(Rhizobium sp.)198-L-30CGMCC No. 9864菌液(1×10^9 cfu/ml),28℃、200r/min培养7天,得到降解液。取4mL降解液至50mL离心管中,加入4mL乙腈,振荡2min,静置10min,加入少许无水硫酸钠。准确吸取800μL有机相转移至1.5mL EP离心管中,在氮吹仪上吹干,加入400μL甲醇(色谱级),在超声波作用下使杂草焚完全溶解,用液谱过滤器过滤收集至样品瓶中,按照上述HPLC法测定杂草焚。

[0119] 根瘤菌(Rhizobium sp.)LD1616处理:除将上述根瘤菌(Rhizobium sp.)198-L-30处理中的根瘤菌(Rhizobium sp.)198-L-30替换为根瘤菌(Rhizobium sp.)LD1616CGMCC No. 7775,其余均相同。

[0120] 空白对照处理,以未接种根瘤菌(Rhizobium sp.)198-L-30CGMCC No. 9864的上述含杂草焚100mg/L的无机盐液体培养基作为空白对照,按照上述方法测定杂草焚的浓度。

[0121] 杂草焚降解率: $X = (1 - A/B) \times 100\%$,式中X为降解率(%),A为根瘤菌(Rhizobium sp.)198-L-30处理液中残留的杂草焚浓度或根瘤菌(Rhizobium sp.)LD1616处理液中残留的杂草焚浓度,B为未接菌空白对照处理液中残留的杂草焚浓度。实验设3次重复,每次重复每个处理接种10个试管。测定结果如表6所示。

[0122] 表6. 根瘤菌(Rhizobium sp.)198-L-30CGMCC No. 9864降解杂草焚功效

[0123]

实验处理	7天HPLC峰面积	杂草焚残留(mg/L)	降解率
空白对照	711.13	96.86	
根瘤菌(<i>Rhizobium sp.</i>) 198-L-30CGMCC No. 9864	624.03	84.97	12.28%
根瘤菌(<i>Rhizobium sp.</i>)LD1616 CGMCC No. 7775	710.95	96.84	0.02%

[0124] 结果显示,杂草焚初始浓度为100mg/L,7天后所述根瘤菌(Rhizobium sp.)198-L-30CGMCC No. 9864对杂草焚的降解率12.28%(如表2所示);根瘤菌(Rhizobium sp.)LD1616CGMCC No. 7775对杂草焚的降解率0.02%。这一结果表明,本发明所提供的根瘤菌(Rhizobium sp.)198-L-30CGMCC No. 9864可降解杂草焚。

[0001]

序 列 表

<110> 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所

<120> 一株降解除草剂的细菌及其用途

<130> CGGNARLD143168

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1325

<212> DNA

<213> 根瘤菌 (*Rhizobium sp.*)

<400> 1

```

cccgcagggg agtggcagac gggtgagtaa cgcgtgggaa tetacctgc cctgcggaat      60
agetceggga aactggaatt aataccgeat agccctacg ggggaaagat ttateggggt      120
atgatgagcc cgcgttggat tagctagttg gtggggtaaa ggcctaccaa ggcgacgatac      180
catagctggt ctgagaggat gatcagccac attgggactg agacacggcc caaactccta      240
cgggaggcag cagtggggaa tattggacaa tgggcgcaag cctgatccag ccatgcccgcg      300
tgagtgatga aggccttagg gttgtaaagc tctttcaccg gagaagataa tgacgggtatc      360
cggagaagaa gccccggcta acttcgtgce agcagccgcg gtaatacgaa gggggctagc      420
gttgctcgga attactgggc gtaaagcgca cgtagcgcca tatttaagtc aggggtgaaa      480
tcccagaget caactctgga actgcctttg ataactgggta tcttgagtat ggaagaggta      540

```

[0002]

agtggaattc cgagtgtaga ggtgaaattc gtagatattc ggaggaacac cagtggcgaa	600
ggcggttac tggccatta ctgacgtga ggtgcgaaag cgtgggggagc aaacaggatt	660
agataacctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaatgttag ccgtcgggca gtatactgtt	720
cggtggecga gctaacgeat taaacattcc gectggggag taeggtegca agattaaaac	780
tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaage ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac	840
gagcagaacc ttaccagctc ttgacattcg gggtttgggc agtggagaca ttgtccttca	900
gtaggctgg cccagaaca ggtgctgcat ggctgtctgc agctcgtgtc gtgagatgtt	960
gggtaagtc ccgcaacgag cgcaaccctc gcccttagtt gccageatit agttgggcac	1020
tctaagggga ctgcegggtga taagccgaga ggaaggtggg gatgacgtca agtctcatg	1080
gcccttacgg gctgggctac acacgtgcta caatggtggt gacagtgggc agcgagacag	1140
cgatgtegag ctaatctcca aaagccatct cagttcggat tgcactctgc aactcgagtg	1200
catgaagttg gaategctag taatcgaga tcagcatgct gcggtgaata cgttcccggg	1260
cctgtacac accgcccgtc acaccatggg agttggtttt acccgaaggt agtgcgctaa	1320
ccgca	1325

www.patviewer.com

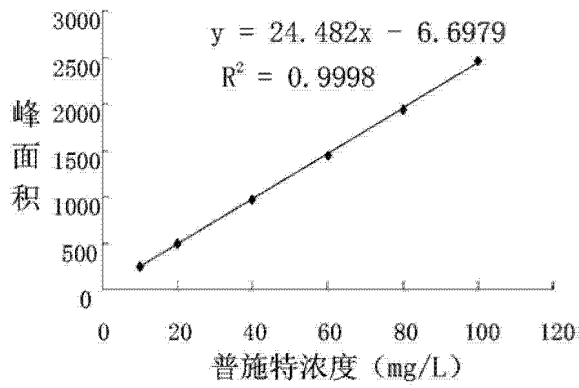


图 1

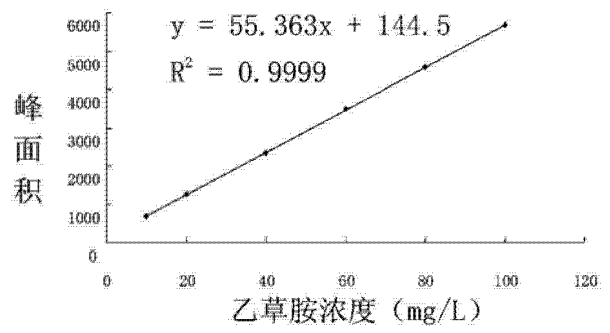


图 2

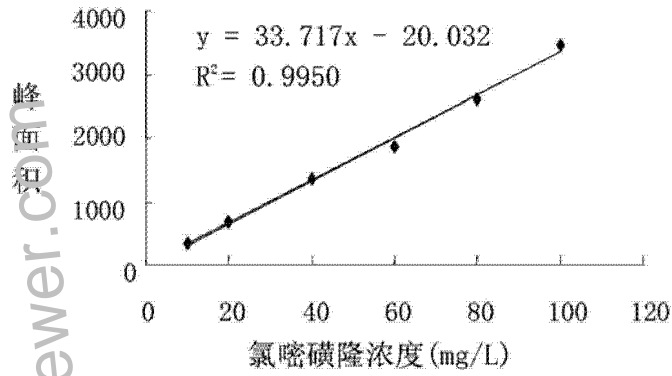


图 3

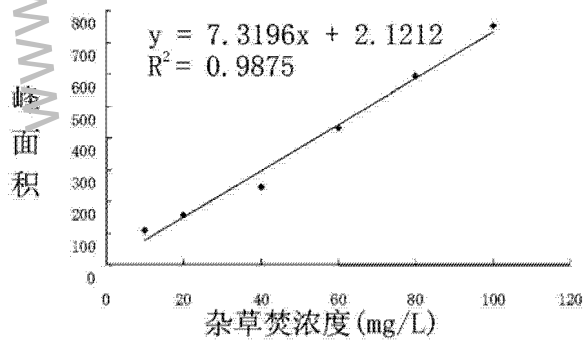


图 4