



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110982707 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201911336845.7

C12R 1/645(2006.01)

(22)申请日 2019.12.23

(83)生物保藏信息

CGMCC No.15087 2017.12.25

(71)申请人 中国科学院沈阳应用生态研究所

地址 110016 辽宁省沈阳市沈河区文化路
72号

(72)发明人 魏玉莲 袁海生 李通

(74)专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司 21002

代理人 李颖

(51)Int.Cl.

C12N 1/14(2006.01)

C12N 9/02(2006.01)

B09C 1/10(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种粗毛硬毛盖齿菌及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种粗毛硬毛盖齿菌土壤中丁草胺残留的降解菌剂,所用菌株为一种白色腐朽真菌,经鉴定为粗毛硬毛盖齿菌(*Funalia trogii*),菌株IFP00751,属担子菌纲,多孔菌目。该菌株采集和分离自原始森林的杨树倒木上,主要培养特性为:菌落略为致密,棉絮状,白色。该菌株的ITS序列已提交至GenBank,登录号为MG779615。降解菌经固态发酵后产生的粗酶液,对受到丁草胺残留污染的土壤进行施用,15天可使土壤中丁草胺残留降低90.86%,使用柱状层析分离提纯后的纯漆酶降解丁草胺溶液,24小时后降解率最高可达到96.73%。由本发明技术方案生产的降解菌剂能够有效修复丁草胺残留污染水体,降低该类除草剂残留对人体毒害,保护生态环境。

1. 一种粗毛硬毛盖齿菌, 其特征在于: 粗毛硬毛盖齿菌 (*Funalia trogii*), 菌株 IFP00751, 保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏日期: 2017年12月25日保藏编号为: CGMCC No.15087。

2. 一种权利要求1所述的粗毛硬毛盖齿菌的应用, 其特征在于: 所述粗毛硬毛盖齿菌在降解含丁草胺的除草剂丁草胺中的应用。

3. 按权利要求2所述的粗毛硬毛盖齿菌的应用, 其特征在于: 所述粗毛硬毛盖齿菌在土壤中降解丁草胺的应用。

4. 一种降解菌剂, 其特征在于: 菌剂为粗毛硬毛盖齿菌 (*Funalia trogii*) 的发酵物或发酵物的菌悬液。

5. 按权利要求4所述的降解菌剂, 其特征在于: 将粗毛硬毛盖齿菌接入固体培养基中, 于28-30℃下培养10-15天, 进行固态发酵, 待菌丝长满基质即得发酵物; 或, 将菌丝通过固体培养基进行固态发酵所得发酵物; 所述发酵物经水重悬所得发酵物的酶悬液。

6. 按权利要求5所述的降解菌剂, 其特征在于: 所述固体培养基质为干固体培养基质和水溶液; 每10克干固体培养基质添加12-18克水溶液, 其中, 刨花和稻草按体积比为1:10-1:2的比例进行混合;

水溶液为含终浓度为0.5-1wt%的淀粉、终浓度为0.3-1wt%的尿素和终浓度为1-3wt%的硫酸铜的水溶液。

7. 按权利要求6所述的降解菌剂, 其特征在于: 所述粗毛硬毛盖齿菌为将粗毛硬毛盖齿菌菌丝按体积比为0.5%-2%的接种量接种于分离保藏培养基中, 于28-30℃下培养4-5天, 待用; 其中, 分离保藏培养基为麦芽浸粉15-30g, 琼脂11-16g, 加水至1L, pH值自然。

8. 一种降解菌剂的应用, 其特征在于: 所述菌剂作为含丁草胺的除草剂的降解菌剂的应用。

9. 一种漆酶, 其特征在于: 由粗毛硬毛盖齿菌 (*Funalia trogii*) 经固态发酵后的发酵物经液相柱状层析纯化分离, 即得漆酶。

10. 一种权利要求9所述的漆酶的应用, 其特征在于: 所述漆酶在降解含丁草胺的除草剂中的应用。

一种粗毛硬毛盖齿菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于环境微生物领域，一种粗毛硬毛盖齿菌及其应用。

背景技术

[0002] 丁草胺是一种高效内吸传导型的氯代乙酰胺类芽前除草剂，对禾本科杂草有较好的除草效果。其杀草活性高、选择性强，可用于水田和旱地防除以种子萌发的禾本科杂草、一年生莎草和一些双子叶杂草，多年来一直是我国水稻田中使用面广、时间长、量大的一种除草剂。

[0003] 尽管丁草胺属非长残效除草剂，在土壤中持效期约为30~40d，但随着丁草胺的长期施用，不可避免地会在植株、土壤和水中有一定量的沉积，对环境造成污染，其危害主要包括以下几个方面：①丁草胺会随水淋溶与扩散，特别是随排灌水和降水流失，造成地下水及江河污染；②丁草胺对藻类、光合细菌、固氮细菌等许多微生物的生长有抑制作用，从而破坏了土壤微生态平衡；③丁草胺对淡水鱼类和两栖动物的毒性很大；④丁草胺具有致突变性和遗传毒性，能够通过食物链和生物富集等将毒性逐级传递，最终影响人类健康。因此，丁草胺在生态环境中的安全性问题已逐渐引起人们的关注。

[0004] 解决丁草胺污染问题，除了减少丁草胺的滥用，如何去除环境体系中残留的丁草胺已经成为近年来研究的热点。目前，对含有除草剂残留污水的理化处理方法已进行了大量的研究和实践，包括高级氧化法、活性炭吸附法、低温等离子体技术和膜处理法等。但是这些理化法处理所需成本高、管理复杂，除了高级氧化法对丁草胺的去除率可达95%外，其他方法的去除效率都较低，并且都对固态介质中丁草胺残留处理存在局限性。

[0005] 研究表明丁草胺在自然条件下挥发性小，不易水解，抗光解性能比较好，其在环境中的消失主要是由于微生物的降解所致，因此寻找丁草胺的高效降解菌对于消除丁草胺的环境污染具有重要的现实意义，有关除草剂的微生物降解研究逐渐成为热点，相关研究结果见表一。

[0006] 表一、丁草胺降解菌的降解条件和降解效果

除草剂种类	降解菌	最佳处理温度	最佳处理时间	培养方式	降解率
[0007] 丁草胺	钩杆菌属细菌 (LYC-2)	35℃	5d	摇瓶液体培养	90.85%
丁草胺	副球菌属细菌 (FLY-8)	25-30℃	5d	摇瓶液体培养	80.3%
[0008] 丁草胺	<i>Catellibacterium</i> 属细菌 (DCA-1)	25-30℃	5d	摇瓶液体培养	75.9%
丁草胺	施氏假单胞菌 (BD-1)	30℃	3d	摇瓶液体培养	97.8%

[0009] 但这些菌株仅运用于水体中丁草胺的降解，对于土壤等固态基质中丁草胺的降解目前还未见报道。

发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种粗毛硬毛盖齿菌及其应用。

[0011] 为实现上述目的,本发明采用技术方案为:

[0012] 一种粗毛硬毛盖齿菌,粗毛硬毛盖齿菌 (*Funalia trogii*),菌株IFP00751,保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏日期:2017年12月25日保藏编号为:CGMCC No.15087。

[0013] 一种粗毛硬毛盖齿菌的应用,所述粗毛硬毛盖齿菌在降解含丁草胺的除草剂丁草胺中的应用。

[0014] 所述粗毛硬毛盖齿菌在土壤中降解丁草胺的应用。

[0015] 一种降解菌剂,菌剂为粗毛硬毛盖齿菌 (*Funalia trogii*) 的发酵物或发酵物的菌悬液。

[0016] 将粗毛硬毛盖齿菌接入固体培养基中,于28-30℃下培养10-15天,进行固态发酵,待菌丝长满基质即得发酵物;或,将菌丝通过固体培养基进行固态发酵所得发酵物;所述发酵物经水重悬所得发酵物的菌悬液。

[0017] 所述固体培养基为干固体培养基和水溶液;每10克干固体培养基添加12-18克水溶液,其中,刨花和稻草按体积比为1:10-1:2的比例进行混合;

[0018] 水溶液为含终浓度为0.5-1wt%的淀粉、终浓度为0.3-1wt%的尿素和终浓度为1-3wt%的硫酸铜的水溶液。

[0019] 所述固体培养基经高温灭菌后固体培养基中含水量为60-70%。

[0020] 所述粗毛硬毛盖齿菌为将粗毛硬毛盖齿菌菌丝按体积比为0.5%-2%的接种量接种于分离保藏培养基中,于28-30℃下培养4-5天,待用;其中,分离保藏培养基为麦芽浸粉15-30g,琼脂11-16g,加水至1L,pH值自然。

[0021] 一种降解菌剂的应用,所述菌剂作为含丁草胺的除草剂的降解菌剂的应用。

[0022] 一种漆酶,由粗毛硬毛盖齿菌 (*Funalia trogii*) 经固态发酵后的发酵物经液相柱状层析纯化分离,即得漆酶。

[0023] 将粗毛硬毛盖齿菌接入固体培养基中,于28-30℃下培养10-15天,进行固态发酵,待菌丝长满基质即得发酵物;或,将菌丝通过固体培养基进行固态发酵所得发酵物

[0024] 一种漆酶的应用,所述漆酶在降解含丁草胺的除草剂中的应用。

[0025] 本发明所具有的优点为:

[0026] 本发明粗毛硬毛盖齿菌是从原始森林的腐木上经过大规模分离筛选获得的一株具有较高活力,其对土壤中丁草胺残留降解能力很强,其培养方法简单,生长速度快,不易变异,该菌株在生长过程中产生的多种酶系能够非专一性降解丁草胺残留,可以作为研究白腐真菌对酰胺类除草剂残留降解机制的模式菌株;也可以利用其制备的稻草发酵培养物对土壤中残留的丁草胺进行降解,降低含有丁草胺的除草剂残留对人体毒害、保护生态环境具有重要价值。

附图说明

[0027] 图1为本发明实施例提的纯化提前后漆酶凝胶电泳检测图。

具体实施方式

[0028] 下面结合实施例对本申请做进一步的解释说明。

[0029] 本发明菌能够在水琼脂培养基中利用丁草胺作为唯一碳源和能源而生长,并使其降解;在使用以稻草秸秆碎木片混合物为培养基进行固态发酵后,将培养物添加至残留有丁草胺的土壤中,该菌15天能够将土壤中的丁草胺降解90.86%,具有极好的降解效果。充分说明该菌可以用于土壤中酰胺类除草剂残留的生物降解。

[0030] 实施例1

[0031] 粗毛硬毛盖齿菌(*Funalia trogii*)的分离和鉴定:

[0032] 1. 菌株的分离:从原始森林腐木上分离得到

[0033] 在无菌环境中,用消毒后的刀片去掉子实体较脏的表面,再选取菌管和菌盖交汇处的子实体,切取0.5cm*0.5cm左右的小块放入制备好的麦芽浸粉培养基中,放置于26-28℃的恒温箱中进行培养,待菌丝长满后,挑取菌丝进行DNA序列测定,并与GenBank中进行比对,确保分离菌种的正确性,将菌丝转移到菌种保藏管中待用

[0034] 2. 菌株形态学鉴定

[0035] 菌落为棉絮状,乳白色;菌落由生殖菌丝和骨架菌丝组成,生殖菌丝薄壁到稍厚壁,直径通常为2.3-3.5微米,分枝具有锁状联合,骨架菌丝在棉兰试剂中菌丝壁有弱嗜蓝反应,在KOH试剂中菌丝组织变为暗褐色;平皿培养3天菌落直径4-5厘米;主要寄生于杨树和柳树活树和倒木上,分解并利用木材中的木质素、纤维素和半纤维素,并能以丁草胺为唯一营养源进行生长。

[0036] 该菌株的ITS序列为:

[0037] TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGTTTTGAAATGGGTTGTAGCTGGCTTCTCCGGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTGGTATCGGGAGGTGTCGCGTCGTTTACGCGAGGCGTTAACCGTGCCTACGTTTTACTACAAACGATTTCAGTATCA GAATGTGTATTGCGATGTAACGCATCTATATACTTTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAA CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCC TTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTGAGTGTGCATGAAATTCTCAAACCCATAAGTCTTTGCGGGCTTACGGCT TTGGACTTGGAGGCTTGTTCGGCGACCGTGAGGTCACATCGACTCCTCTCAAATGCATTAGCTTGATTCCTTGCAGG TCGGCTCTCGGTGTGATAATTGTCTACGCCGTGACCGTGAAGCGTTTTGGCAAGCTTCTAACCGTCTCTAACGAGA CAGCTTACTTTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAA。

[0038] 实施例2菌剂的获得

[0039] 1. 培养基配制:

[0040] (1) 菌种分离保藏培养基(固体,1L):麦芽浸粉20g,琼脂17g,加水至1L,pH值自然;

[0041] (2) 固体培养基(固体,1Kg):桦木薄片与稻草秸秆按体积比1:2的比例混合,混合后干重1Kg,加水1500ml;其中,木片直径0.5-1cm,秸秆长1-2cm;

[0042] 上述两种培养基均在高压锅中121℃灭菌20-30分钟。

[0043] 2. 菌种活化、固体培养制备:

[0044] 菌种活化:挑取所述粗毛硬毛盖齿菌菌株接种于加有分离保藏培养基的60mm培养皿中,于28-30℃下培养4-5天。

[0045] 将上述培养好的菌种切成6mm的菌丝小片,接入固体培养基,于28-30℃下培养

10-15天,待菌丝长满基质,固态发酵完成,即得发酵菌剂可使用,待用。

[0046] 固体培养基质的配置:将桦木薄片粉碎成直径为1cm左右的薄片,将稻草切段,段长2cm左右,桦木薄片与稻草秸秆按体积比1:2的比例混合,然后添加淀粉质量含量为0.5%、尿素质量含量为0.3%、硫酸铜质量含量为0.5%的水溶液,按照每10克干物质添加上述水溶液15毫升,经灭菌后木片稻草混合物含水量达到60-70% (为重量百分比),然后装入蘑菇菌种袋,经121℃高温灭菌20分钟。

[0047] 3. 菌剂的制备

[0048] 1) 菌种的培养:用接种针挑取粗毛硬毛盖齿菌菌株*Funalia trogii* IFP00751的菌丝接种到上述菌种分离保藏培养基的平皿中,在温度为28℃培养箱中培养4天,菌落疏松,雪白色,棉絮状。用灭菌后的直径为6mm的打孔器将其均匀切成菌丝小块,接种到固体培养基质中,接种量5-10% (V/V),于28℃培养15天,待菌丝长满基质,即为培养菌母种待用。

[0049] 固体培养基质的配置将桦木刨花粉碎成直径为1cm左右的薄片,将稻草切段,段长2cm左右,按照桦木薄片与稻草秸秆按体积比1:2的比例混合,然后添加淀粉质量含量为0.5%、尿素质量含量为0.3%、硫酸铜质量含量为0.5%的水溶液,经灭菌后木片稻草混合物含水量为60-70% (为重量百分比),然后装入蘑菇菌种袋,经121高温灭菌20分钟,待用。

[0050] 将培养菌母种在无菌条件下切成1*1厘米左右的菌丝块,接入灭菌后的菌袋,每个菌袋接8-10块,放置于28℃的恒温箱中培养,待菌丝长满菌袋,此时菌袋中由菌丝分泌的活性物质已达到最高,取发酵后的固体基质进行粗提物的浸提。为避免其他化合物的干扰,浸提液采用30-35℃的无菌蒸馏水,每10克干物质加入10ml无菌蒸馏水,28℃恒温摇床震荡2小时,3层灭菌纱布进行过滤,将过滤液3000转离心10分钟,获得上清液,即为粗提液,检测其活性,待用。

[0051] 实施例3

[0052] 漆酶的制备:

[0053] 将上述实施例经固体培养获得粗提进一步的经高效液相层析柱进行分离。具体纯化过程如下:

[0054] (1) 填料预处理

[0055] 称取SephadexG-75粉末20g,加双蒸水400ml浸泡,置于水浴锅中加热至100℃,保持温度3小时,冷却至室温,将其置于布氏漏斗中(连接真空泵抽滤),再用pH 6.0的20mmol/L Tris-HCl缓冲液清洗几遍。

[0056] (2) 装柱及平衡

[0057] 取洗净的内径18mm,长为490mm的层析柱,管底内部放置一张丝网,将层析柱垂直,关闭出水口,加入1/2柱体积的双蒸水,然后将已溶胀好的凝胶连续缓慢地从上口加入层析柱中,同时打开出水口,使凝胶自然沉降。使用洗脱液平衡过夜,约2个柱体积。

[0058] (3) 上样

[0059] 将固体培养基浸提后的粗提物,用胶头滴管小心的滴于柱子表面,待液体表面与柱料平面相切时,再滴入缓冲液,反复重复此过程几次,使样品更好的与树脂吸附,最后将柱子内部的高度调节器调节至与柱料表面相平。

[0060] (4) 洗脱

[0061] 上样完成后,洗脱结合蛋白之前,先用pH 6.0的20mmol/L Tris-HCl缓冲液以

1.5mL/min的速度持续流过离子交换树脂,洗去未结合的蛋白质,待有少量蛋白质出现后,开始洗脱,将含0.5mol/L NaCl的Tris-HCl缓冲液(pH 6.0)与不含NaCl的缓冲液等梯度混合,以0-0.5mol/L的盐浓度线性洗脱,自动收集器收集洗脱液于100支小试管中,采用定时洗脱,3min/管,检测每管中的漆酶活性,蛋白质含量用液相色谱分离层析仪自带的紫外检测器检测,作图。洗脱体积一般为柱体积的5-10倍。将有漆酶活性的管收集,尽量收集漆酶活性相对较高的几管,弃掉刚出现漆酶活性的几管和最后有漆酶活性的几管,可以使得到的漆酶组分相对更纯。将得到的漆酶组分合并后,透析除盐,一般透析4-5h,换3-4次缓冲液即可,冷冻干燥浓缩,置于-20℃保存,待用。

[0062] (5) 凝胶电泳检测

[0063] 将获得的漆酶进行凝胶电泳检测,可知纯化得到的漆酶分子量在70kDa左右(参见图1)。

[0064] 应用例1

[0065] 固态发酵降解菌剂对土壤中丁草胺残留的降解

[0066] (1) 配制丁草胺残留土壤

[0067] 取20ml干土于100ml小烧杯中,并加入5ml无菌蒸馏水湿润土壤,然后每个样品加1ml丁草胺原液,并做喷雾1ml无菌蒸馏水处理。于每天添加上述实施例的固态培养机制经浸提过滤后获得的粗酶液1-2ml,连续添加15天后取样测定土壤中丁草胺浓度。同时设置每天添加等量无菌蒸馏水作为对照。每组实验设计5个重复。

菌种类型	编号	浓度 ug/ml
Ck	1	21.7
	2	33.7
	3	27.9
	4	28.6
	5	31.4
	平均浓度	28.66
IFP00751	1	3.2
	2	4.1
	3	1.6
	4	2.3
	5	1.9
	平均浓度	2.62
	降解率	90.86%

[0069] 应用例2

[0070] 纯化漆酶对丁草胺的降解

[0071] 按照分离获得的漆酶50mg溶解于1ml双蒸水中作为原液,而后按照不同浓度采用双蒸水进行稀释:原液、5倍、10倍、100倍的浓度,分别添加不同质量的丁草胺原液,制成100ppm浓度的反应混合液,每个浓度进行3个重复,同时设置将丁草胺原液加入蒸馏水作为空白对照,28℃恒温摇床震荡24小时后测定丁草胺浓度。

[0072]	菌种类型	编号	丁草胺浓度 ppm	平均降解率 (%)
	CK	CK-1	99.62	0.38%±0.22%
		CK-2	99.35	
		CK-3	99.89	
	IFP00751 纯漆酶	原液-1	2.53	96.73%±0.59%
		原液-2	3.98	
		原液-3	3.29	
[0073]	IFP00751	稀释 5 倍-1	9.12	90.72%±0.59%
		稀释 5 倍-2	8.64	
		稀释 5 倍-3	10.07	
	IFP00751	稀释 10 倍-1	23.41	77.92%±1.18%
		稀释 10 倍-2	20.53	
		稀释 10 倍-3	22.29	
	IFP00751	稀释 100 倍-1	46.72	51.36%±1.41%
		稀释 100 倍-2	50.08	
		稀释 100 倍-3	49.13	

序列表

- <110> 中国科学院沈阳应用生态研究所
 <120> 一种粗毛硬毛盖齿菌及其应用
 <160> 1
 <170> SIPOSequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 664
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 1

```

tagaggaagt aaaagtcgta acaaggtttc cgtaggtgaa cctgcggaag gatcattatc 60
gagttttgaa atgggttgta gctggcttct ccggaggcat gtgcacgccc tgctcatcca 120
ctctacacct gtgcacttac tgtgggtatc gggaggtgtc gcgtcgttta cggcgaggcg 180
ttaaccgtgc ctacgtttta ctacaaacga ttcagtatca gaatgtgtat tgcgatgtaa 240
cgcattctata tacaactttc agcaacggat ctcttggtc tcgcatcgat gaagaacgca 300
gcgaaatgcg ataagtaatg tgaattgcag aattcagtga atcatcgaat ctttgaacgc 360
accttgcgct ccttgggtatt ccgaggagca tgctgtttg agtgtcatga aattctcaaa 420
cccataagtc tttgcgggct tacgggcttt ggacttgag gcttgtcggc gaccgtgagg 480
tcacatcgac tcctctcaaa tgcattagct tgattccttg cggatcggct ctcggtgtga 540
taattgtcta cgccgtgacc gtgaagcgtt ttggcaagct tctaaccgtc tctaacgaga 600
cagcttactt tgacctctga cctcaaatca ggtaggacta cccgctgaac ttaagcatat 660
caaa 664

```

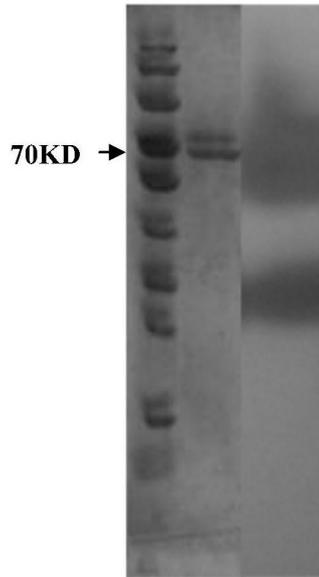


图1