



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104789507 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201510206400. 2

(22) 申请日 2015. 04. 27

(71) 申请人 北京农学院

地址 102206 北京市昌平区回龙观镇北农路
7号

(72) 发明人 赵建庄 蔡慧敏 魏朝俊 贾临芳
梁丹

(74) 专利代理机构 北京轻创知识产权代理有限公司 11212

代理人 杨立

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

G02F 3/34(2006. 01)

B09C 1/10(2006. 01)

C12R 1/38(2006. 01)

权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种用于降解苯醚甲环唑的细菌 BMJHZ-01
及其筛选方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于降解苯醚甲环唑的细菌 BMJHZ-01 及其筛选方法, 本发明发现细菌 BMJHZ-01 能以苯醚甲环唑作为碳源并进行增殖, 因此, 细菌 BMJHZ-01 能作为降解苯醚甲环唑的微生物并进行利用, 通过本发明实验证明, 在相应的培养条件下, 细菌 BMJHZ-01 能使苯醚甲环唑浓度为 60-180mg/L 的基础盐液体培养基中的苯醚甲环唑在 7 天之内完全降解。在具体使用的过程中, 可将大量扩培的细菌 BMJHZ-01 制成以其为活性成分的降解剂, 并修复含有苯醚甲环唑农药残留的土壤。

1. 一种用于降解苯醚甲环唑的细菌 BMJHZ-01。
2. 一种含有权利要求 1 所述的细菌 BMJHZ-01 的降解剂。
3. 一种如权利要求 1 所述的细菌 BMJHZ-01 在降解水体和 / 或土壤中的苯醚甲环唑残留的应用。
4. 一种如权利要求 2 所述的含有细菌 BMJHZ-01 的降解剂在降解水体和 / 或土壤中的苯醚甲环唑残留的应用。
5. 一种用于降解苯醚甲环唑的细菌 BMJHZ-01 的筛选方法, 其特征在于, 包括:
 - 1) 取苯醚甲环唑生产厂废水排水道中的泥样, 将泥样置于第一基础盐液体培养基中, 泥样与第一基础盐液体培养基的质量比为 1:20, 摇床培养后得到第一混和菌液, 摇床培养的温度为 30℃, 转速为 200 转 / 分钟, 时间为 7 天;
 - 2) 将 1) 得到的第一混合菌液接种到第二基础盐液体培养基中, 接种量为第一混合菌液体积量的 5%, 进行传代培养, 培养的温度为 30℃, 转速为 200 转 / 分钟, 时间为 7 天, 得到第二混合菌液;
 - 3) 取 2) 得到的第二混合菌液 1mL 用质量浓度 0.9% 的无菌生理盐水稀释 10⁵ 倍, 然后取 100uL 涂布到基础盐固体培养基中, 30℃ 暗培养 2 天, 分别收集平板上长出的单菌落, 并利用 LB 培养基划线纯化, 30℃ 暗培养 2 天, 得到多个纯化后的单菌落, 所述 LB 培养基, 包括如下原料: 蛋白胨 9-11g、酵母膏 4-6g、氯化钠 9-11g、琼脂 19-21g 和水 1000g;
 - 4) 取 3) 得到的多个纯化后的单菌落, 每个单菌落接种到一个第三基础盐液体培养基中摇床培养, 摇床培养的温度为 30℃, 转速为 200 转 / 分钟, 时间为 7 天, 得到多个单菌菌液;
 - 5) 取 4) 得到的多个单菌菌液, 每个单菌菌液用一个第四基础盐液体培养基摇床培养, 每个单菌菌液的接种量为其体积量的 5%, 摇床培养的温度为 30℃, 转速为 200 转 / 分钟, 时间为 7 天, 摇床培养后, 分别测定第四基础盐液体培养基中苯醚甲环唑的残留浓度, 并筛选出使苯醚甲环唑浓度降低的单菌菌液, 利用标准的菌种鉴定手段鉴定所得单菌菌液, 得到细菌 *Pseudomonas nitroreducens*。
6. 根据权利要求 5 所述的筛选方法, 其特征在于, 在 1) 中所述第一基础盐液体培养基、2) 中所述第二基础盐液体培养基、4) 中所述第三基础盐液体培养基和 5) 中所述第四基础盐液体培养基, 为相同的基础盐液体培养基, 均包括如下原料:

氯化钠 0.9-1.1g、磷酸二氢钠 1.4-1.6g、磷酸氢二钠 0.4-0.6g、硫酸镁 0.1-0.3g、硫酸亚铁 0.01-0.02g、氯化钙 0.01-0.03g、硫酸铵 0.9-1.1g 和水 1000g, 每升上述原料还含有苯醚甲环唑 180mg。
7. 根据权利要求 5 或 6 所述的筛选方法, 其特征在于, 在 3) 中, 所述基础盐固体培养基, 包括如下原料:

氯化钠 0.9-1.1g、磷酸二氢钠 1.4-1.6g、磷酸氢二钠 0.4-0.6g、硫酸镁 0.1-0.3g、硫酸亚铁 0.01-0.02g、氯化钙 0.01-0.03g、硫酸铵 0.9-1.1g、琼脂 19-21g 和水 1000g, 每升上述原料还含有苯醚甲环唑 180mg。

一种用于降解苯醚甲环唑的细菌 BMJHZ-01 及其筛选方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于降解苯醚甲环唑的细菌 BMJHZ-01 及其筛选方法,属于微生物领域。

背景技术

[0002] 苯醚甲环唑,英文通用名为 Difenoconazole,分子式为 $C_{19}H_{17}C_{12}N_3O_3$,其分子量为 406.26。苯醚甲环唑纯品为无色固体,熔点 $76^{\circ}C$,沸点 $220^{\circ}C/4Pa$,蒸气压 $120nPa(20^{\circ}C)$ 。溶解性 ($20^{\circ}C$):水 3.3 毫克/升,易溶于有机溶剂。 $\leq 300^{\circ}C$ 稳定,在土壤中移动性小,缓慢降解。

[0003] 研究表明,三唑类杀菌剂是内吸性杀菌剂,对植物体无害,但对致病真菌具有极高的生物毒性。其杀菌机理是三唑类化合物的结构中含氮杂环部分的氮原子与细胞色素 P-450 的铁离子结合,表现出抗菌活性和植物生长调节活性。R. Gadners 以酵母和鼠肝均浆为酶,麦角甾醇生物合成过程中,三唑类化合物明显地与细胞色素 P-450 结合;接着 T. E. Wiggins 用鼠肝微粒体和酵母细胞色素 P-450 研究证实了三唑类化合物作为生长调节剂阻碍植物中赤霉素的生物合成,在抑制植物生长的同时,有抗菌活性。

[0004] 另外,相关研究表明,苯醚甲环唑对罗非鱼为高毒药物,24、48、72、96h 半数致死浓度分别为 6.29、5.46、4.70、4.31mg/L。苯醚甲环唑对蜜蜂为低毒。苯醚甲环唑微乳剂对家蚕进行急性毒性试验,96h LC50 值为 $46.5-154mg \cdot L^{-1}$,属于中毒级;在农业生产中,杀菌剂等化学农药的施用一直是保证粮食作物增产稳产有效的手段之一。尤其是随着苯醚甲环唑的大量使用,使得土壤中残存的苯醚甲环唑逐渐累积,进而造成严重的土壤污染;另外,苯醚甲环唑农药生产过程中产生的废水废气也通过排放以及流失等方式积累到土壤中,进一步的加剧了土壤的污染。但是,苯醚甲环唑在土壤中降解较慢,半衰期分别为:51.3d-125.8d,43.6d-69.3d,47.5-63.6d。显然不能有效解决土壤中苯醚甲环唑逐渐累积的现状。

[0005] 目前,微生物为农田中农药残留(包括苯醚甲环唑)的主要降解者,逐渐成为农药污染土壤生物修复的热点。因此,提供一种能够降解苯醚甲环唑的微生物,并将其应用到苯醚甲环唑农药土壤的修复中是本领域技术人员亟待解决的一个技术问题。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种用于降解苯醚甲环唑的细菌 BMJHZ-01 及其筛选方法,本发明发现细菌 BMJHZ-01 能以苯醚甲环唑作为碳源并进行增殖,因此,其能作为降解苯醚甲环唑的微生物并进行利用,通过实验证明,在相应的培养条件下, BMJHZ-01 能使苯醚甲环唑浓度为 60-180mg/L 的基础盐培养基中的苯醚甲环唑在 7 天之内完全降解。在具体使用的过程中,可将大量扩培的 BMJHZ-01 制成以其为活性成分的降解剂,并修复含有苯醚甲环唑农药残留的土壤。

[0007] 本发明解决上述技术问题的技术方案如下:一种用于降解苯醚甲环唑的细菌 BMJHZ-01, *Pseudomonas nitroreducens* 为此细菌的英文名,中文名硝基还原假单胞菌,

BMJHZ-01 为本发明对该细菌命名的简称。细菌 *Pseudomonas nitroreducens* 已经被专利 200610046646.9 保藏, 2005 年 10 月 10 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, 保藏号为 CGMCC No. 1488, 菌株的具体生理生化特征见专利 200610046646.9。

[0008] 细菌 *Pseudomonas nitroreducens* 为革兰氏阴性, 有鞭毛, 无芽孢的杆菌, 菌落较大为白色、隆起, 边缘规则, 表面光滑, 严格好氧, 化能异养。明胶不能液化, 硝酸盐可以还原成亚硝酸盐, 氧化酶阳性; 接触酶阳性; 不产硫化氢, 不能淀粉水解; 能够利用葡萄糖、葡萄糖酸盐、2-酮类葡萄糖酸盐、乙醇、琥珀酸盐、柠檬酸盐等碳源, 不能利用水杨酸、安息香酸盐、龙胆酸盐和氨基苯甲酸盐。

[0009] 本发明还提供一种含有上述细菌 BMJHZ-01 的降解剂, 由于细菌 BMJHZ-01 能以苯醚甲环唑为碳源进行繁殖, 因此, 以细菌 BMJHZ-01 为活性成分并制成相应的降解剂, 能修复含有大量苯醚甲环唑的土壤。

[0010] 本发明还提供一种如上述的细菌 BMJHZ-01 在降解水体和 / 或土壤中的苯醚甲环唑残留的应用。

[0011] 本发明还提供一种如上述的含有细菌 BMJHZ-01 的降解剂在降解水体和 / 或土壤中的苯醚甲环唑残留的应用。

[0012] 本发明还提供一种用于降解苯醚甲环唑的细菌 BMJHZ-01 的筛选方法, 包括:

[0013] 1) 取苯醚甲环唑生产厂废水排水道中的泥样, 将泥样置于第一基础盐液体培养基中, 泥样与第一基础盐液体培养基的质量比为 1:20, 摇床培养后得到第一混和菌液, 摇床培养的温度为 30℃, 转速为 200 转 / 分钟, 时间为 7 天, 在该培养条件下, 细菌繁殖迅速, 大量的微生物呈现对数期生长, 为后续的传代培养提供了保障;

[0014] 本步骤将泥样与第一基础盐液体培养基混合, 由于在第一基础盐液体培养基中仅包含了苯醚甲环唑作为微生物的碳源, 所以在培养过程中, 能够分解并利用苯醚甲环唑的微生物则正常增殖, 不能利用苯醚甲环唑的微生物则会死亡, 进而初步筛选出了第一混和菌液。

[0015] 2) 将 1) 得到的第一混合菌液接种到第二基础盐液体培养基中, 接种量为第一混合菌液体积量的 5%, 进行传代培养, 培养的温度为 30℃, 转速为 200 转 / 分钟, 时间为 7 天, 得到第二混合菌液;

[0016] 第一混合菌液在增殖过程中会消耗第一基础盐液体培养基中大量的养分 (苯醚甲环唑或各种无机盐), 因此, 得到第一混合菌液后, 需要将其再次接种, 并进行传代培养, 获得进一步筛选的第二混合菌液。

[0017] 由于第一混合菌液中的微生物生理活性旺盛, 因此, 需要对其接种量进行有效控制, 接种量太大会导致后续的营养不能保证其繁殖所需, 接种量太小则会影响其筛选效果。由于目前还未见该菌的报道, 因此, 本发明对其接种量的控制 (5%) 是通过大量的探索和研究获得的;

[0018] 3) 取 2) 得到的第二混合菌液 1mL 用质量浓度 0.9% 的无菌生理盐水稀释 10⁵ 倍, 然后取 100uL 涂布到基础盐固体培养基中, 30℃ 暗培养 2 天, 分别收集平板上长出的单菌落, 并利用 LB 培养基划线纯化, 30℃ 暗培养 2 天, 得到多个纯化后的单菌落,

[0019] 为了保证单菌落快速繁殖, 获得活性较高的单菌落, 因此, 所述 LB 培养基, 包括如下原料: 蛋白胨 9-11g、酵母膏 4-6g、氯化钠 9-11g、琼脂 19-21g 和水 1000g;

[0020] 基于 2) 同样的理由, 获得第二混合菌液后, 为了获得纯的单菌落, 需对其利用基础盐固体培养基培养, 培养温度稍高或稍低以及培养时间超过 3 天则会出现微生物死亡的现象, 在培养过程中, 使用基础盐固体培养基暗培养, 不同的微生物会长出不同的菌落, 然后分别挑选出多个单菌落, 将其利用 LB 培养基划线纯化, 得到多个纯化后的单菌落。

[0021] 4) 取 3) 得到的多个纯化后的单菌落, 每个单菌落接种到一个第三基础盐液体培养基中摇床培养, 摇床培养的温度为 30℃, 转速为 200 转/分钟, 时间为 7 天, 得到多个单菌菌液;

[0022] 纯化后的单菌落接种到第三基础盐液体培养基中, 保证其正常繁殖, 并得到多个单菌菌液, 多个单菌菌液通过后续的培养以及测定其对含有苯醚甲环唑的第四基础盐液体培养基的降解效果进而分离出所需的细菌。

[0023] 5) 取 4) 得到的多个单菌菌液, 每个单菌菌液用一个第四基础盐液体培养基摇床培养, 每个单菌菌液的接种量为其体积量的 5%, 摇床培养的温度为 30℃, 转速为 200 转/分钟, 时间为 7 天, 摇床培养后, 分别测定第四基础盐液体培养基中苯醚甲环唑的残留浓度, 并筛选出使苯醚甲环唑浓度降低的单菌菌液, 利用标准的菌种鉴定手段鉴定所得单菌菌液, 得到细菌 *Pseudomonas nitroreducens*, 本发明将其简称为细菌 BMJHZ-01。

[0024] 将单菌菌液分别摇床培养的过程中, 会消耗第四基础盐培养基中的苯醚甲环唑, 因此, 分别测定第四基础盐液体培养基中苯醚甲环唑的残留浓度, 并筛选出使得苯醚甲环唑浓度降低的单菌菌液, 进而获得目标细菌。

[0025] 在培养的过程中也会获得一些降解效果不理想的微生物, 其可能是实验误差或微生物本身耐性较强等原因导致, 因此, 排出筛选范围, 而获得细菌 BMJHZ-01 能以使苯醚甲环唑浓度为 180mg/L 的基础盐培养基中的苯醚甲环唑在 7 天之内完全降解, 降解效果非常显著。

[0026] 在上述技术方案的基础上, 本发明还可以做如下改进。

[0027] 进一步, 在 1) 中所述第一基础盐液体培养基、2) 中所述第二基础盐液体培养基、4) 中所述第三基础盐液体培养基和 5) 中所述第四基础盐液体培养基, 为相同的基础盐液体培养基, 均包括如下原料:

[0028] 氯化钠 0.9-1.1g、磷酸二氢钠 1.4-1.6g、磷酸氢二钠 0.4-0.6g、硫酸镁 0.1-0.3g、硫酸亚铁 0.01-0.02g、氯化钙 0.01-0.03g、硫酸铵 0.9-1.1g 和水 1000g, 每升上述原料含有苯醚甲环唑 180mg。

[0029] 进一步, 在 3) 中, 所述基础盐固体培养基, 包括如下原料:

[0030] 氯化钠 0.9-1.1g、磷酸二氢钠 1.4-1.6g、磷酸氢二钠 0.4-0.6g、硫酸镁 0.1-0.3g、硫酸亚铁 0.01-0.02g、氯化钙 0.01-0.03g、硫酸铵 0.9-1.1g、琼脂 19-21g 和水 1000g, 每升上述原料还含有苯醚甲环唑 180mg。

[0031] 本发明的有益效果是:

[0032] 本发明提供一种用于降解苯醚甲环唑的细菌 BMJHZ-01 及其筛选方法, 本发明采用了富集分离的培养方式从供试泥样中筛选了出能以苯醚甲环唑为唯一碳源生长的菌群, 具有针对性强, 筛选结果理想的效果, 以期周期短、见效快的含苯醚甲环唑的土壤修复提供保障。

附图说明

[0033] 图 1 为本发明实施例 1 得到的菌种的系统发育树图。

[0034] 图 2 为实施例 2 中不同培养温度下,苯醚甲环唑降解率的结果图;

[0035] 图 3 为实施例 2 中不同 pH 值的基础盐液体培养基下,苯醚甲环唑降解率的结果图。

具体实施方式

[0036] 以下本发明的原理和特征进行描述,所举实例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。

[0037] 本实施例所得细菌 *Pseudomonas nitroreducens* 已经被专利 200610046646.9 保藏,2005 年 10 月 10 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,保藏号为 CGMCC No. 1488,菌株的具体生理生化特征见专利 200610046646.9。

[0038] 实施例 1

[0039] 1) 为了找到能够耐受苯醚甲环唑,并含有大量被筛选细菌的供试样本,进而获得较高的筛选效果;在本实施例中,选用苯醚甲环唑生产厂的废水排水道作为取样地点,由于该地点苯醚甲环唑的浓度很大,所以能够存活的微生物其可能会较大程度地利用苯醚甲环唑,因此,取自苯醚甲环唑生产厂的废水排水道使得供试样本的目的性更强,有助于分离筛选的顺利进行。

[0040] 取苯醚甲环唑生产厂污水区的泥样,将泥样置于第一基础盐液体培养基中,泥样与第一基础盐液体培养基的质量比为 1:20,摇床培养后得到第一混和菌液 100ml,摇床培养的温度为 30℃,转速为 200 转/分钟,时间为 7 天,所述第一基础盐液体培养基,包括如下原料:

[0041] 氯化钠 1.0g,磷酸二氢钠 1.5g,磷酸氢二钠 0.5g,硫酸镁 0.2g,硫酸亚铁 0.01g,氯化钙 0.02g,硫酸铵 1.0g,水 1L,每升上述原料含有苯醚甲环唑 180mg;

[0042] 2) 将 1) 得到的第一混合菌液接种到第二基础盐液体培养基中,接种量为第一混合菌液体积量的 5%,进行传代培养,培养的温度为 30℃,转速为 200 转/分钟,时间为 7 天,得到第二混合菌液 100ml,所述第二基础盐液体培养基,包括如下原料:

[0043] 氯化钠 1.0g,磷酸二氢钠 1.5g,磷酸氢二钠 0.5g,硫酸镁 0.2g,硫酸亚铁 0.01g,氯化钙 0.02g,硫酸铵 1.0g,水 1L,每升上述原料含有苯醚甲环唑 180mg;

[0044] 3) 取 2) 得到的第二混合菌液 1mL 用质量浓度 0.9% 的无菌生理盐水稀释 10^5 倍,然后取 100uL 涂布到基础盐固体培养基中,30℃ 暗培养 2 天,分别收集平板上长出的单菌落,并利用 LB 培养基划线纯化,30℃ 暗培养 2 天,得到多个纯化后的单菌落;

[0045] 所述基础盐固体培养基,包括如下原料:

[0046] 氯化钠 1.0g、磷酸二氢钠 1.5g、磷酸氢二钠 0.5g、硫酸镁 0.2g、硫酸亚铁 0.01g、氯化钙 0.02g、硫酸铵 1.0g、琼脂 20g 和水 1000g,每升上述原料含有苯醚甲环唑 180mg;

[0047] 所述 LB 培养基,包括:蛋白胨(购自北京信德科兴科学器材有限责任公司)10.0g,酵母膏(购自北京信德科兴科学器材有限责任公司)5.0g,氯化钠 10.0g,琼脂 20.0g 和水 1L;

[0048] 4) 取 3) 得到的多个纯化后的单菌落,每个单菌落接种到一个第三基础盐液体培

培养基中摇床培养,摇床培养的温度为 30℃,转速为 200 转/分钟,时间为 7 天,得到多个单菌菌液,每个单菌菌液 100ml;

[0049] 所述第三基础盐液体培养基,包括如下原料:

[0050] 氯化钠 1.0g、磷酸二氢钠 1.5g、磷酸氢二钠 0.5g、硫酸镁 0.2g、硫酸亚铁 0.01g、氯化钙 0.02g、硫酸铵 1.0g 和水 1000g,每升上述原料含有苯醚甲环唑 180mg;

[0051] 5) 取 4) 得到的多个单菌菌液,每个单菌菌液用一个第四基础盐液体培养基摇床培养,每个单菌菌液的接种量为其体积量的 5%,摇床培养的温度为 30℃,转速为 200 转/分钟,时间为 7 天,摇床培养后,分别测定第四基础盐液体培养基中苯醚甲环唑的残留浓度,并筛选出使苯醚甲环唑浓度降低的单菌菌液,得到一个单菌菌液,所述第四基础盐液体培养基,包括如下原料:

[0052] 氯化钠 1.0g、磷酸二氢钠 1.5g、磷酸氢二钠 0.5g、硫酸镁 0.2g、硫酸亚铁 0.01g、氯化钙 0.02g、硫酸铵 1.0g 和水 1000g,每升上述原料含有苯醚甲环唑 180mg。

[0053] 对提取获得的单菌菌液(本发明将此样品命名为 BMJHZ-01),委托北京三博远志微生物技术有限责任公司进行了细菌 16s rDNA 全部基因序列正义链的测序,用 MEGA 4 构建分子进化树,采用 Neighbor. Joining 法的 Complete Deletion 模式建树,Bootstrap 进行检验,并重复 1000 次,菌种的系统发育树如图 1,序列如 SEQ ID NO:1 所示,鉴定结果如表 1,菌种鉴定的测序峰型图结果如表 2,鉴定结果为细菌 *Pseudomonas nitroreducens*,本发明就将此细菌的样品名称 BMJHZ-01 作为此细菌的简称了。

[0054] 表 1 鉴定结果

[0055]

样品名称	扩增序列	参考物种	Accession No.	分类	同源度
BMJHZ-01	16SrDNA	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	KJ410680	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; <i>Pseudomonas</i> .	99%

[0056] 表 2 菌种鉴定的测序峰型图结果

[0057]

样品编号	测序引物名称	测序编号	结果
BMJHZ-01	27F	02031080	正常
	1492R	02031081	正常

[0058] 实施例 2 在不同培养温度和不同 pH 值的基础盐液体培养基的条件下苯醚甲环唑的降解率

[0059] 为了获得优选的培养条件,本发明对实施例 1 制备的 BMJHZ-01 单菌菌液利用含苯

醚甲环唑的基础盐液体培养基摇床培养过程中的条件进行了优选。

[0060] 将实施例 1 获得的 BMJHZ-01 单菌菌液设定不同的培养温度,并对含有苯醚甲环唑的基础盐液体培养基的 pH 值设定不同的梯度,测定相应条件下,苯醚甲环唑的降解率,进而优选出其培养参数,具体步骤如下。

[0061] 取 5 个相同的基础盐液体培养基,接种实施例 1 制备的 BMJHZ-01 单菌菌液,摇床培养,接种量为 BMJHZ-01 单菌菌液体积量的 5%,即 5ml,所用基础盐液体培养基包括如下原料:氯化钠 1.0g、磷酸二氢钠 1.5g、磷酸氢二钠 0.5g、硫酸镁 0.2g、硫酸亚铁 0.01g、氯化钙 0.02g、硫酸铵 1.0 和水 1000g,每升上述原料含有苯醚甲环唑 180mg。摇床培养的温度分别为 20℃、25℃、30℃、35℃和 40℃,转速为 200 转 / 分钟,时间为 7 天,测定不同摇床培养温度下苯醚甲环唑的降解率,结果如图 2。

[0062] 通过图 2 看出,细菌 BMJHZ-01 在不同摇床培养温度下的生长情况不同,摇床培养温度为 25℃时,苯醚甲环唑的降解率达到 56-60%;摇床培养温度为 35℃时,苯醚甲环唑的降解率达到 63.67%,但摇床培养温度为 30℃时,苯醚甲环唑的降解率达到 97.78%,因此,本申请实施例 1 中所涉及的摇床培养温度优选为 30℃。

[0063] 取 5 个相同的基础盐液体培养基,所用基础盐液体培养基包括如下原料:氯化钠 1.0g、磷酸二氢钠 1.5g、磷酸氢二钠 0.5g、硫酸镁 0.2g、硫酸亚铁 0.01g、氯化钙 0.02g、硫酸铵 1.0 和水 1000g,每升上述原料含有苯醚甲环唑 180mg,用 0.1mol/L 的 NaOH 和 0.1mol/L 的 HCl 来调整基础盐液体培养基的 pH 值,使 5 个基础盐液体培养基的 pH 值分别为 5、6、7、8 和 9,向 5 个不同 pH 值的基础盐液体培养基中接种实施例 1 制备的 BMJHZ-01 单菌菌液,摇床培养,接种量为实施例 1 制备的 BMJHZ-01 单菌菌液体积量的 5%,即 5ml,摇床培养的温度为 30℃,转速为 200 转 / 分钟,时间为 7 天,测定不同 pH 值下苯醚甲环唑的降解率,结果如图 3。

[0064] 通过图 3 看出,细菌 BMJHZ-01 在不同 pH 值的基础盐液体培养基中,苯醚甲环唑的降解情况,细菌 BMJHZ-01 在基础盐液体培养基的 pH 值为 7 时,苯醚甲环唑的降解率最高,达到 94%。

[0065] 因此,在实施例 1 中,摇床培养的温度为 30℃、转速为 200 转 / 分钟、时间为 7 天,含有苯醚甲环唑的基础盐液体培养基的 pH 值为 7(实施例 1 中基础盐液体培养基配方的设定以及苯醚甲环唑的浓度即可保证基础盐液体培养基的 pH 值为 7)。

[0066] 实施例 3 细菌 BMJHZ-01 降解苯醚甲环唑的效果实验

[0067] 本实施例对实施例 1 获得的细菌 BMJHZ-01 的降解效果进行了验证,通过将含有苯醚甲环唑的基础盐液体培养基设定不同的浓度,检测培养基中苯醚甲环唑的残留量,进而证实细菌 BMJHZ-01 具有高效降解苯醚甲环唑的功效。

[0068] 具体方法如下:

[0069] 实验分成两组:试验组和对照组,每组有四个含有不同浓度苯醚甲环唑的基础盐液体培养基,所用基础盐液体培养基,包括如下原料:氯化钠 1.0g、磷酸二氢钠 1.5g、磷酸氢二钠 0.5g、硫酸镁 0.2g、硫酸亚铁 0.01g、氯化钙 0.02g、硫酸铵 1.0 和水 1000g,每升上述原料含有苯醚甲环唑 60mg、160mg、300mg、600mg。

[0070] 从试验组四个含有不同浓度苯醚甲环唑的基础盐液体培养基中各取 100mL,接种入 5mL 实施例 1 制备的 BMJHZ-01 单菌菌液,摇床培养,对照组 4 个基础盐液体培养基中不

接入 BMJHZ-01 单菌菌液,摇床培养的温度为 30℃,转速为 200 转 / 分钟,于第 0、1、2、3、5、7 天分别取样,测定苯醚甲环唑残留量。具体数据请参考表 3:

[0071] 表 3 细菌 BMJHZ-01 对不同浓度苯醚甲环唑培养液的降解效果

[0072]

		残留浓度 Residue concentration (mg/L)					
		0day	1day	2days	3days	5days	7days
试验组 Inoculated	60	60.2±2.3	42.3 ±7.2	32.5 ±4.1	12.5±7.8	0.0±0.0	—
	180	180.2±10.4	135.8±17.0	89.9±15.2	31.8±5.5	0.0±0.0	—
	300	310.7±32.7	282.0±31.7	270.6±19.7	222.8±16.9	110.3±20.5	75.6 ±13.8
	600	601.8±38.3	600.9±53.9	600.9±76.2	514.2±56.8	492.4±41.4	422.4±28.1
对照组 control	60	61.7±3.5	52.5±3.4	48.6±3.5	50.8±3.4	51.9±3.5	48.0±1.5
	180	180.5±14.5	180.1±5.9	180.4±10.0	180.9±10.8	180.5±9.5	180.8±8.7
	300	297.3±21.5	285.8±7.0	308.9±14.0	309.6±22.6	309.7±20.4	305.3±15.6
	600	613.2±21.8	603.7±15.3	601.7±20.5	610.2±17.9	625.9±31.1	604.9±21.5

[0073] 通过表 3 可以看出,细菌 BMJHZ-01 在不同浓度苯醚甲环唑基础盐液体培养基中对苯醚甲环唑具有降解效果;含有苯醚甲环唑的基础盐液体培养基包括 60 至 600mg/L 总共 4 个梯度。当初始苯醚甲环唑浓度为 60 或 180mg/L 时, BMJHZ-01 菌在 5 天之内能完全从培养基中除去苯醚甲环唑(100%)。

[0074] 采用专利 200610046646.9 保藏的细菌 *Pseudomonas nitroreducens*, 重复本发明实施例 2 和实施例 3 的实验,经检测,同样能达到跟本发明一样的技术效果。

[0075] 综上所述,采用本发明实施例 1 得到的细菌 BMJHZ-01 单菌菌液或专利 200610046646.9 保藏的细菌 *Pseudomonas nitroreducens*, 都能用于降解苯醚甲环唑,通过大量的扩培养,并以其为活性成分制成相应的降解制剂,用于含有苯醚甲环唑土壤的修复中。

[0076] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,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。

[0077]

<110> 北京农学院

<120> 一种用于降解苯醚甲环唑的细菌 BMJHZ-01 及其筛选方法

<160> 1

<210> 1

<212> DNA

<400> 1

AGCTACCATGCAGTCGAGCGGAGATGGGAGCTTGCTCCCGGATTCAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGACAACGTTTCGAAAG
GAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTT
GCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTAC
CAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGA
GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGG
CGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTA
GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTA
CCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGG
GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGGTA
AGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCATAACTGCCTG
ACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACT
GAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAA
CGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACCTCAAATGAA
TTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC
GAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCCGGAACCTTGCAGAGATGCGAGGGTG
CCTTCGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA

[0078]

GATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCAC
GTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGA
TCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGT
AATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC
CCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGG
GACGTAA

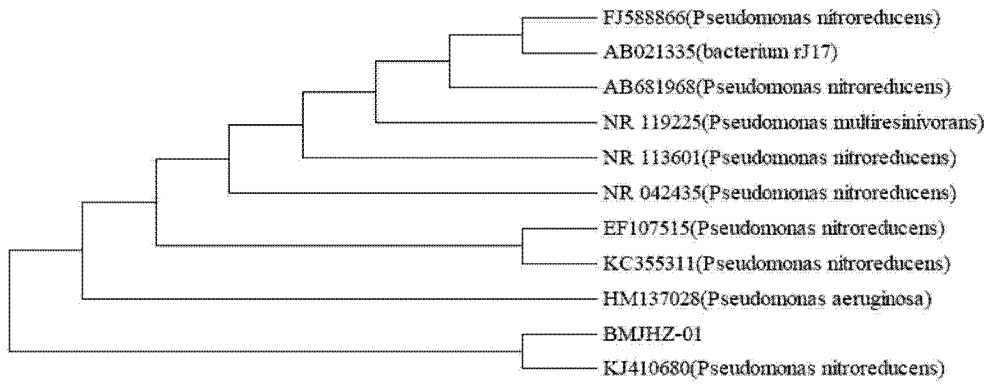


图 1

不同温度下的降解率

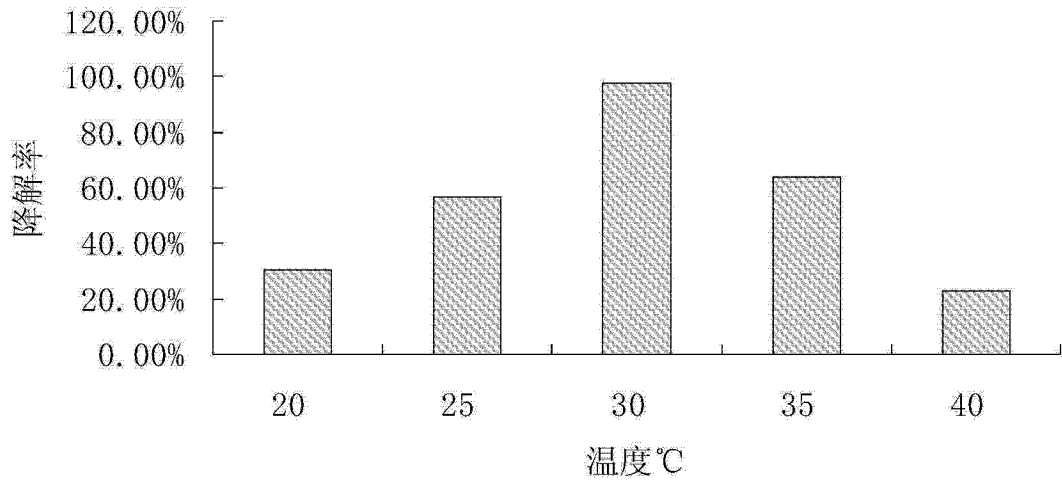


图 2

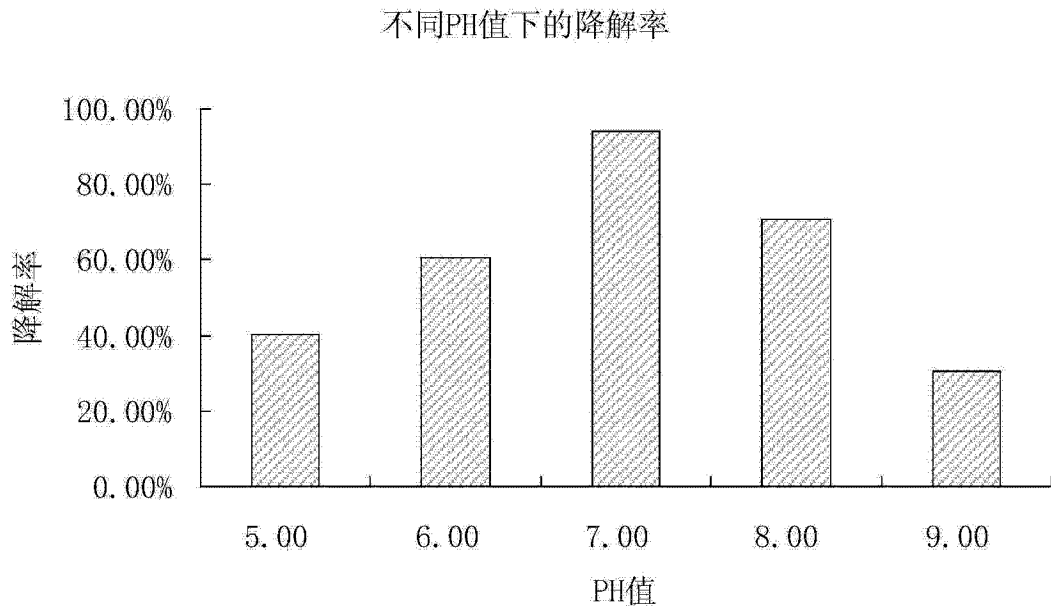


图 3