



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115992068 A

(43) 申请公布日 2023.04.21

(21) 申请号 202211314258.X

C12R 1/01 (2006.01)

(22) 申请日 2022.10.25

(83) 生物保藏信息

GDMCC 62916 2022.10.21

(71) 申请人 上海市农业科学院

地址 201100 上海市闵行区北翟路2901号

(72) 发明人 杨瑞恒 李彩红 李燕 郭婷

鲍大鹏

(74) 专利代理机构 北京超凡宏宇专利代理事务

所(特殊普通合伙) 11463

专利代理师 陈秋梦

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A01G 18/20 (2018.01)

A01G 18/00 (2018.01)

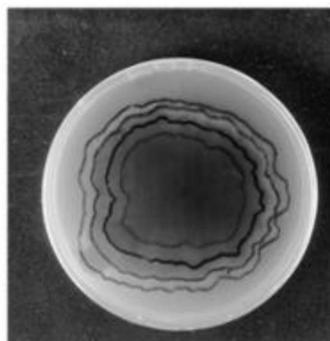
权利要求书1页 说明书5页  
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

一种多噬伯克霍尔德氏菌及其在促进食用  
菌生长中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种多噬伯克霍尔德氏菌及其在促进食用菌生长中的应用。该多噬伯克霍尔德氏菌保藏于广东微生物研究所保藏中心;保藏编号为:GDMCC NO:62916;保藏时间为:2022年10月21日。本发明在暗褐网柄牛肝菌的覆土材料中分离到了多种克霍尔德氏菌的类群,通过16S进一步鉴定物种,构建与暗褐网柄牛肝菌共培养的方法,获得了一株能够明显促进菌丝生长的细菌,首次明确了暗褐网柄牛肝菌与克霍尔德氏菌之间的互作关系,并筛选能够促进暗褐网柄牛肝菌生长的菌株,有利于对生产起到提效增质的作用。



1. 一种多噬伯克霍尔德氏菌,其特征在于,所述多噬伯克霍尔德氏菌为Burkholderia multivorans 18-C,保藏于广东微生物研究所保藏中心;保藏编号为:GDMCC NO:62916;保藏时间为:2022年10月21日。

2. 根据权利要求1所述的多噬伯克霍尔德氏菌,其特征在于,所述多噬伯克霍尔德氏菌株的培养方法包括将所述多噬伯克霍尔德氏菌接种到牛肉膏蛋白胨培养基中,摇瓶培养。

3. 根据权利要求2所述的多噬伯克霍尔德氏菌,其特征在于,所述摇瓶培养的培养条件为在28-32℃环境下培养48-72h。

4. 一种微生物菌剂,其特征在于,所述微生物菌剂含有权利要求1-3任一项所述的多噬伯克霍尔德氏菌。

5. 如权利要求1所述的多噬伯克霍尔德氏菌或权利要求4所述的微生物菌剂在促进食用菌生长中的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述食用菌包括牛肝菌;优选地,所述牛肝菌包括暗褐网柄牛肝菌。

7. 一种促进食用菌生长的方法,其特征在于,包括将权利要求1所述的多噬伯克霍尔德氏菌或权利要求4所述的微生物菌剂添加到所述食用菌的培养环境中进行共培养。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述培养环境为培养基时,所述培养基为含有乳糖的马铃薯葡萄糖琼脂培养基。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述培养基中乳糖的含量为1-3%,优选地,所述培养基中乳糖的含量为2%。

10. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述共培养的条件为在28-32℃环境下培养10-12d;优选地,所述共培养的条件为在30℃环境下培养12d。

## 一种多噬伯克霍尔德氏菌及其在促进食用菌生长中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,具体而言,涉及一种多噬伯克霍尔德氏菌及其在促进食用菌生长中的应用。

### 背景技术

[0002] 暗褐网柄牛肝菌*Phlebopus portentosus* (Berk.&Broome) Boedijn隶属于担子菌门(Basidiomycota)、牛肝菌目(Boletales)、小牛肝菌科(Boletinellaceae)、脉柄牛肝菌属(*Phlebopus*),是第一个也是唯一一个工厂化栽培成功的牛肝菌(Ji, et al., 2011)。暗褐网柄牛肝菌商品名为黑牛肝菌,其个体肥大、口感清脆、味道鲜美、营养丰富是备受人们喜爱的名贵珍稀食用菌。

[0003] 在暗褐网柄牛肝菌栽培模式探索过程中发现,只有经过覆土步骤才能够刺激子实体形成和提高单位产量,覆土措施是一些食用菌提高产量和品质的重要途径之一,能够为食用菌生长提供营养、补充基质水分、辅助因子或活化剂外,其中的微生物也能够为食用菌提供必需的物质,促进菌丝体生长,刺激子实体生长和发育等。对比了覆土不同处理方法对暗褐网柄牛肝菌子实体发育的影响,结果发现不覆土以及高温灭菌覆土材料的处理不能够正常的形成子实体,而正常的覆土能够形成子实体,同时测定这些覆土材料的氮磷钾等生理生化指标并没有发现差异,确定了覆土中的微生物因子对子实体发育的影响。通过培养实验发现短杆菌属、芽孢杆菌属、放线菌等对暗褐网柄牛肝菌菌丝和子实体的生长起着不同程度的促进作用,但是目前针对暗褐网柄牛肝菌覆土微生物的研究还处于初级阶段,进一步筛选到能够促进子实体发育的微生物对于暗褐网柄牛肝菌提效增质具有重要作用。在暗褐网柄牛肝菌生长过程中覆土材料的*Burkholderia*相对丰度最高,但是两者之间的相互关系还不确定,确定*Burkholderia*的具体功能,对于进一步筛选能够促进暗褐网柄牛肝菌生长发育具有重要作用,对于暗褐网柄牛肝菌产业起到提效增质的作用。

[0004] 鉴于此,特提出本发明。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种多噬伯克霍尔德氏菌及其在促进食用菌生长中的应用。

[0006] 本发明是这样实现的:

[0007] 第一方面,本发明提供了一种多噬伯克霍尔德氏菌,该多噬伯克霍尔德氏菌为*Burkholderia multivorans* 18-C,保藏于广东微生物研究所保藏中心,保藏地址为广州市先烈中路100号大院59号楼5楼,广东省微生物研究所;保藏编号为:GDMCC NO:62916;保藏时间为:2022年10月21日;该菌株的分类学名称为*Burkholderia multivorans*。

[0008] 本发明从香蕉园采集了暗褐网柄牛肝菌的覆土材料,并从中分离到了众多微生物菌株,再经过筛选后获得了110株伯克霍尔德氏菌属菌种,以此为基础,再通过共培养筛选到了1株具有促进暗褐网柄牛肝菌生长的伯克霍尔德氏菌,将其命名为:*Burkholderia*

multivorans 18-C。经过进一步研究,该伯克霍尔德氏菌的16S rDNA序列如SEQ ID NO:1所示,属于Burkholderia multivorans菌株。

[0009] 在一些实施方式中,上述多噬伯克霍尔德氏菌的培养方法包括将多噬伯克霍尔德氏菌接种到牛肉膏蛋白胨培养基中,摇瓶培养。

[0010] 具体地,牛肉膏蛋白胨培养基的成分包括牛肉膏:3.0g;蛋白胨:10.0g;NaCl:5.0g;琼脂:15-25g;水:1000ml;pH:7.4-7.6。

[0011] 在一些实施方式中,摇瓶培养的培养条件为在28-32℃环境下培养48-72h。较为优选地,摇瓶培养的培养条件为在30℃环境下培养72h。

[0012] 第二方面,本发明提供了一种微生物菌剂,该微生物菌剂含有上述的多噬伯克霍尔德氏菌。

[0013] 第三方面,本发明提供了上述多噬伯克霍尔德氏菌在促进食用菌生长中的应用。

[0014] 在一些实施方式中,上述食用菌包括牛肝菌;优选地,牛肝菌包括暗褐网柄牛肝菌。

[0015] 本申请的发明人经过大量研究后发现,当Burkholderia multivorans 18-C菌株接种于暗褐网柄牛肝菌培养基时,其能够促进暗褐网柄牛肝菌菌丝的生长,通过共培养实验证明Burkholderia multivorans 18-C菌株能够对暗褐网柄牛肝菌生产起到提效增质的作用。

[0016] 第四方面,本发明提供了一种促进食用菌生长的方法,其包括将上述的多噬伯克霍尔德氏菌或微生物菌剂添加到食用菌的培养环境中进行共培养。

[0017] 在一些实施方式中,当培养环境为培养基时,该方法包括将食用菌接种到培养基上,然后接种多噬伯克霍尔德氏菌与食用菌的菌丝共培养。

[0018] 具体地,先将食用菌接种到适宜的培养基上,培养一段时间后,再将多噬伯克霍尔德氏菌的菌液接种到食用菌菌丝边缘,使多噬伯克霍尔德氏菌与食用菌的菌丝共培养。

[0019] 在一些实施方式中,接种的多噬伯克霍尔德氏菌的接种量为 $10^6$ /ml。

[0020] 在一些实施方式中,上述培养基为含有乳糖的马铃薯葡萄糖琼脂培养基。

[0021] 具体地,马铃薯葡萄糖琼脂培养基的成分包括马铃薯:200g葡萄糖:20g;琼脂15-20g;蒸馏水1000mL。

[0022] 在一些实施方式中,上述培养基中乳糖的含量为1-3%。较优选地,培养基中乳糖的含量为2%。

[0023] 在一些实施方式中,共培养的条件为在28-32℃环境下培养10-12d,较优选地,共培养的条件为在30℃环境下培养12d。

[0024] 本发明具有以下有益效果:

[0025] 本发明通过对大量的覆土微生物的分离,鉴定获得了伯克霍尔德氏菌,是第一次将伯克霍尔德氏菌与暗褐网柄牛肝菌甚至是食用菌领域共培养的互作结果,与传统认识的一种延伸,将微生物促进剂的类群从短杆菌属、芽孢杆菌属、放线菌等,扩大到伯克霍尔德氏菌属。对于促进暗褐网柄牛肝菌生长发育以及产业提效增质的起到促进作用,具有一定的应用前景。

## 附图说明

[0026] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,应当理解,以下附图仅示出了本发明的某些实施例,因此不应被看作是对范围的限定,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

[0027] 图1为实施例1中多噬伯克霍尔德氏菌的共培养结果;

[0028] 图2为对比例中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的共培养结果;

[0029] 图3为实验例中的菌丝生长情况对比图。

## 具体实施方式

[0030] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0031] 以下结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0032] 实施例1

[0033] 多噬伯克霍尔德氏菌的筛选与鉴定

[0034] 1. 覆土材料的采集

[0035] 本实施例中使用的覆土材料源于工厂化生产的材料,采集于西双版纳东风农场香蕉园中。

[0036] 2. 筛选

[0037] (1)取2g土壤溶于18ml无菌水中,在120r/min的振动筛上摇动混合,待土壤沉淀后将上清液梯度稀释成 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 倍的土壤悬液。

[0038] (2)每个梯度取200微升,用涂布棒均匀涂布在牛肉膏蛋白胨培养基上,30℃培养3d,进行单菌落的挑取,通过分离培养共分离到了110株细菌。

[0039] (3)将暗褐网柄牛肝菌接种到PDA+2%乳糖培养基上,30℃培养1周后,将上述的细菌菌液10微升点在菌丝的边缘,并划线至培养皿边缘,每组三个平行,每四天画线测定生长速度一次,记录4次,共12天。

[0040] (4)对比这些细菌与暗褐网柄牛肝菌共生长的情况,发现有一株菌株与真菌菌丝的交界处有一个菌丝的隆起,证明其对暗褐网柄牛肝菌的菌丝均有明显的促生长作用。共培养结果如图1所示。

[0041] 3. 菌株的分类鉴定

[0042] (1) 菌株形态特征

[0043] 细菌菌落边缘整齐,菌落形状不规则,呈现乳白色半透明状,菌落表面有光泽,质地粘稠,菌落切面凸起。

[0044] (2) 菌株16S rDNA序列分析

[0045] 基于引物27f/1492r进行16S rDNA扩增,经过序列核实,获得了一条长度为1378bp的序列(OP677990),该伯克霍尔德氏菌的16S rDNA序列OP677990如下:

[0046] AGCACGGGTGCTTGACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAG

TGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCG  
CGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGT  
CTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGG  
ACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGG  
AAAGAAATCCCTGGCTCTAAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAG  
CAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTCTGTAAAG  
ACAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTA  
GAATTCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATA  
CTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAA  
CTAGTTGTTGGGGATTCATTTCCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAG  
ATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAA  
CCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGAAGAGATTCGGGAGTGCTCGAAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCT  
GCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGC  
TACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCC  
TTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAG  
AAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC  
ATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGG  
CTAGTCTAACCGCAAGGA。

[0047] 通过blast在NCBI数据库中比对,发现其与Burkholderia multivorans菌株Struelens的16S rDNA相似度达到了100%。通过16S鉴定分离的上述细菌,结果发现该细菌属于Burkholderia属,该细菌的分类学名称为Burkholderia multivorans,并将其命名为Burkholderia multivorans 18-C。

[0048] 实施例2

[0049] 本实施例为Burkholderia multivorans 18-C菌株的培养方法,包括:

[0050] 将实施例1中筛选到的菌株在牛肉膏蛋白胨的培养基中摇瓶培养,培养条件为30℃培养3d,培养结束后,通过分光光度计将所有的菌株样品稀释至 $10^6$ /ml用于后续的实验。

[0051] 对比例

[0052] 本对比例筛选获得的Burkholderia gladioli A菌株为唐菖蒲伯克霍尔德氏菌,其筛选与鉴定方法如下:

[0053] 1. 覆土材料的采集

[0054] 本实施例中使用的覆土材料源于工厂化生产的材料,采集于香蕉园中。

[0055] 2. 筛选

[0056] (1)取2g土壤溶于18ml无菌水中,在120r/min的振动筛上摇动混合,待土壤沉淀后将上清液梯度稀释成 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 倍的土壤悬液。

[0057] (2)每个梯度取200微升,用涂布棒均匀涂布在牛肉膏蛋白胨培养基上,30℃培养3d,进行单菌落的挑取,通过分离培养共分离到了110株细菌。

[0058] (3)将暗褐网柄牛肝菌接种到PDA+2%乳糖培养基上,30℃培养1周后,将上述的细菌菌液10微升点在菌丝的边缘,并划线至培养皿边缘,每组三个平行,每四天画线测定生长速度一次,记录4次,共12天。

[0059] (4) 对比这些细菌与暗褐网柄牛肝菌共生长的情况,发现有一株菌株与真菌菌丝的交界处形成了一个抑制圈,证明其对暗褐网柄牛肝菌的菌丝均有明显的抑制作用。共培养结果如图2所示。

[0060] 3. 菌株的分类鉴定

[0061] (1) 菌株形态特征

[0062] 细菌菌落边缘整齐,菌落直径约2mm,形状呈圆形,呈现乳黄色半透明状,菌落表面有光泽,质地粘稠,菌落凸起。

[0063] (2) 菌株16S rDNA序列分析

[0064] 基于引物27f/1492r进行16S rDNA扩增,经过序列核实,获得了一条长度为1381bp的序列,通过blast在NCBI数据库中比对,发现其与Burkholderia gladioli菌株TB5的16S rDNA OM720134相似度达到了100%。通过16S鉴定分离的上述细菌,结果发现该细菌属于Burkholderia属,该细菌的分类学名称为Burkholderia gladioli,并将其命名为Burkholderia gladioli A。

[0065] 实验例

[0066] 本实验例为Burkholderia gladioli A菌株与暗褐网柄牛肝菌关系的验证实验,为了对比Burkholderia multivorans 18-C菌株对暗褐网柄牛肝菌的促生长作用,将对比例中筛选获得的Burkholderia gladioli A菌株也进行验证实验,步骤如下:

[0067] (1) 将暗褐网柄牛肝菌菌丝接种到乳糖液体培养基中,在30℃、200rpm的摇床上培养一周。

[0068] (2) 一周后将培养好的菌球用均质仪破碎,在新的乳糖培养基中每100ml加入1ml暗褐网柄牛肝菌菌液,接种后继续在摇床中培养一周。

[0069] (3) 一周后再将提前摇好的Burkholderia multivorans 18-C菌株以及Burkholderia gladioli A菌株悬液分别向每瓶暗褐网柄牛肝菌菌液中加入1ml( $10^6$ /ml),另设一组空白对照组,该空白对照组为无接种的培养基。继续培养,一周后称量其菌丝干重。

[0070] 实验结果如图3所示。从图3中可以看出,相比于空白组以及对比例中筛选获得的菌株,实施例1中筛选获得的Burkholderia multivorans 18-C菌株对暗褐网柄牛肝菌菌丝的生长有明显的促进作用,将菌丝的生长速度提升了56.56%。

[0071] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。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。

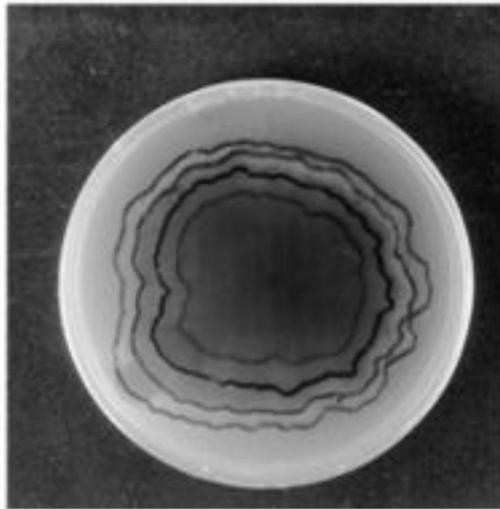


图1

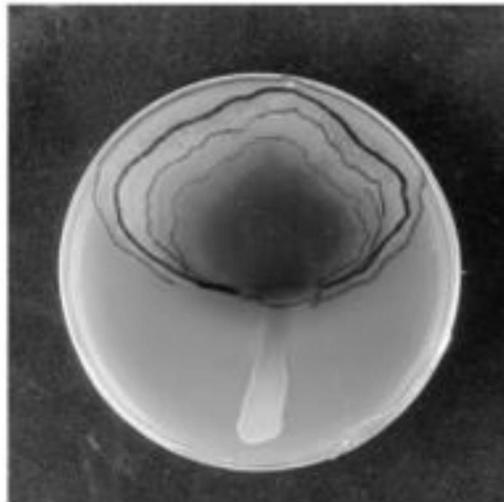


图2

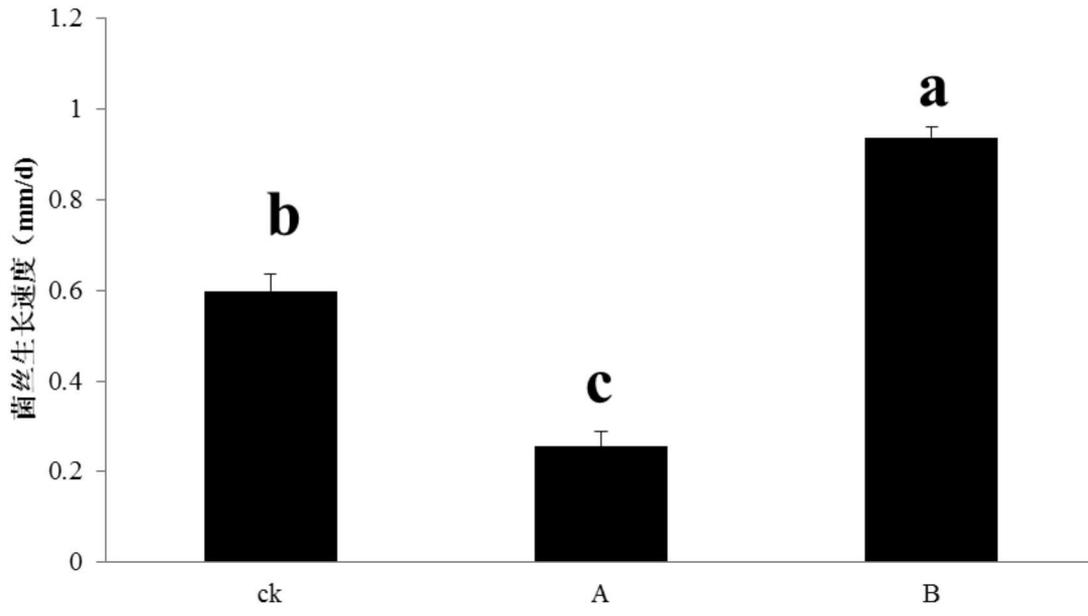


图3