



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106947719 B

(45)授权公告日 2020.02.18

(21)申请号 201710256662.9

(22)申请日 2017.04.19

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106947719 A

(43)申请公布日 2017.07.14

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:M2017103 2017.03.09

(73)专利权人 华南理工大学

地址 510640 广东省广州市天河区五山路
381号

(72)发明人 卢桂宁 黄婷 连文洁 党志

尹华 杨琛 易筱筠 郭楚玲

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有

限公司 44245

代理人 罗啸秋

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C02F 3/34(2006.01)

B09C 1/10(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

C02F 101/36(2006.01)

审查员 全弘扬

权利要求书1页 说明书4页

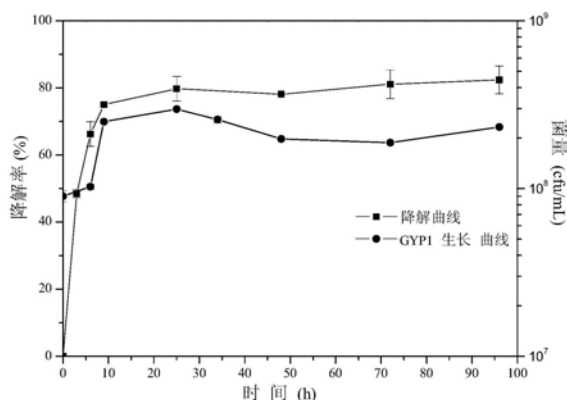
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

一种伯克霍尔德菌GYP1及其在降解溴代阻
燃剂中的应用

(57)摘要

本发明属于环境污染生物处理技术领域，公开了一种伯克霍尔德菌GYP1及其在降解溴代阻燃剂中的应用。所述伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)GYP1,已于2017年3月9日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏编号为CCTCC NO:M 2017103。本发明菌株*Burkholderia cepacia* GYP1在pH为4.0~7.0、温度为30℃,150r/min振荡培养4天,对初始浓度为1mg/L的2,2',4,4'-四溴联苯醚降解率可达80%以上。该菌可用于被多溴联苯醚污染的水体和土壤的生物修复。



1. 一株伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cepacia*) 菌株GYP1, 所述菌株GYP1已于2017年3月9日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为CCTCC NO:M 2017103。

2. 权利要求1所述的伯克霍尔德菌菌株GYP1在降解溴代阻燃剂2,2',4,4'-四溴联苯醚中的应用。

3. 根据权利要求2所述的伯克霍尔德菌菌株GYP1在降解溴代阻燃剂2,2',4,4'-四溴联苯醚中的应用, 其特征在于: 所述应用过程为: 将伯克霍尔德菌菌株GYP1用培养液配制成菌悬液, 在pH值为4.0~7.0, 温度为15~35℃的条件下对2,2',4,4'-四溴联苯醚进行降解。

4. 根据权利要求3所述的伯克霍尔德菌菌株GYP1在降解溴代阻燃剂2,2',4,4'-四溴联苯醚中的应用, 其特征在于: 所述伯克霍尔德菌菌株GYP1对2,2',4,4'-四溴联苯醚进行降解的条件为pH值为7.0, 温度为30℃。

5. 根据权利要求3所述的伯克霍尔德菌菌株GYP1在降解溴代阻燃剂2,2',4,4'-四溴联苯醚中的应用, 其特征在于: 所述培养液组成为: 90mg/L Na_2HPO_4 、10mg/L KH_2PO_4 、40mg/L NaCl 、30mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、40mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.1mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.1mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 其余为蒸馏水; 培养液的pH值为6.8~7.0。

6. 根据权利要求3所述的伯克霍尔德菌菌株GYP1在降解溴代阻燃剂2,2',4,4'-四溴联苯醚中的应用, 其特征在于: 所述对2,2',4,4'-四溴联苯醚进行降解时, 2,2',4,4'-四溴联苯醚的初始浓度为0.5~3mg/L。

7. 根据权利要求6所述的伯克霍尔德菌菌株GYP1在降解溴代阻燃剂2,2',4,4'-四溴联苯醚中的应用, 其特征在于: 所述对2,2',4,4'-四溴联苯醚进行降解时, 2,2',4,4'-四溴联苯醚的初始浓度为0.5~1mg/L。

一种伯克霍尔德菌GYP1及其在降解溴代阻燃剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于环境污染生物处理技术领域,具体涉及一种伯克霍尔德菌GYP1及其在降解溴代阻燃剂中的应用。

背景技术

[0002] 多溴联苯醚(PBDEs)作为一种性能优越的溴代阻燃剂,已广泛用于电子电器设备、自动控制设备、建筑材料和纺织品等商品化产品中,是环境中广泛存在的全球性有机污染物。其具有结构稳定、难以降解、环境持久性、迁移性、水溶性低、不易降解、生物富集性等特性,很难通过常规的物理、化学方法去除。

[0003] 在209种多溴联苯醚同系物中,由于2,2',4,4'-四溴联苯醚的毒性最高,且2,2',4,4'-四溴联苯醚在土壤中的含量仅次于十溴联苯醚(BDE-209),是许多高溴代联苯醚的次级代谢产物,因而受到越来越多研究者的关注。然而,目前所获得的微生物中,能够降解2,2',4,4'-四溴联苯醚的微生物并不多且降解效果不显著。因此,寻找2,2',4,4'-四溴联苯醚的高效降解菌株是对多溴联苯醚污染进行环境治理和修复研究的热点问题。

[0004] 目前,利用微生物降解法解决环境中的多溴联苯醚污染问题已被广泛接受,微生物降解具有效果好、费用低、二次污染少等优点,是一类低耗高效和环境安全的生物修复技术,而筛选出能够高效降解2,2',4,4'-四溴联苯醚的微生物菌株是该项技术的关键环节。

发明内容

[0005] 为了解决现有降解溴代阻燃剂2,2',4,4'-四溴联苯醚存在的难题,本发明的首要目的在于提供一种伯克霍尔德菌GYP1。

[0006] 本发明的另一目的在于提供上述伯克霍尔德菌GYP1在降解溴代阻燃剂中的应用。

[0007] 本发明目的通过以下技术方案实现:

[0008] 一种伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*) GYP1,已于2017年3月9日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),地址为湖北省武汉市武昌区八一路珞珈山,武汉大学,中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M 2017103。

[0009] 所述伯克霍尔德菌GYP1的形态为:菌落光滑、球型,边缘平整,呈黄色,属革兰氏阴性菌,电子显微镜下观察该菌体的形态为杆状。

[0010] 该伯克霍尔德菌GYP1来源于广东省汕头市贵屿镇被多溴联苯醚重度污染的电子拆解厂周边的农田土壤,经人工富集培养、分离纯化得到。菌株GYP1的16S rDNA在GeneBank的登录号为KY697917。

[0011] 上述伯克霍尔德菌GYP1在降解溴代阻燃剂中的应用。

[0012] 上述伯克霍尔德菌GYP1在降解溴代阻燃剂2,2',4,4'-四溴联苯醚(BDE-47)中的应用,所述应用过程为:将伯克霍尔德菌GYP1用培养液配制成菌悬液,在pH值为4.0~7.0,温度为15~35℃的条件下对2,2',4,4'-四溴联苯醚进行降解。

[0013] 优选地,所述伯克霍尔德菌GYP1对2,2',4,4'-四溴联苯醚进行降解的条件为pH值

为7.0,温度为30℃。

[0014] 优选地,所述培养液组成为:90mg/L Na_2HPO_4 、10mg/L KH_2PO_4 、40mg/L NaCl 、30mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、40mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.1mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.1mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,其余为蒸馏水;培养液的pH值为6.8~7.0。

[0015] 优选地,所述对2,2',4,4'-四溴联苯醚进行降解时,2,2',4,4'-四溴联苯醚的初始浓度为0.5~3mg/L;更优选2,2',4,4'-四溴联苯醚的初始浓度为0.5~1mg/L。

[0016] 本发明的菌株及应用具有如下优点及有益效果:

[0017] 本发明菌株*Burkholderia cepacia* GYP1在pH为4.0~7.0、温度为30℃,150r/min振荡培养4天,对初始浓度为1mg/L的2,2',4,4'-四溴联苯醚降解率可达80%以上。该菌可用于被多溴联苯醚污染的水体和土壤的生物修复。

附图说明

[0018] 图1和图2是伯克霍尔德菌GYP1的形态观察图,其中,图1为平板菌落形态图,图2为扫描电镜图。

[0019] 图3为伯克霍尔德菌GYP1对2,2',4,4'-四溴联苯醚的降解曲线图。

[0020] 图4为不同2,2',4,4'-四溴联苯醚初始浓度条件下伯克霍尔德菌GYP1的降解率对比图。

[0021] 图5为不同温度条件下伯克霍尔德菌GYP1的降解率对比图。

[0022] 图6为不同pH条件下伯克霍尔德菌GYP1的降解率对比图。

[0023] 图7为外加碳源条件下伯克霍尔德菌GYP1的降解率对比图。

具体实施方式

[0024] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。对于未特别注明的工艺参数,可参经常规技术进行。

[0025] 实施例

[0026] *Burkholderia cepacia* GYP1的分离与降解2,2',4,4'-四溴联苯醚的应用:

[0027] 现场采集广东省汕头市贵屿镇被多溴联苯醚重度污染的电子拆解厂周边的农田土壤,采用以2,2',4,4'-四溴联苯醚(BDE-47)为唯一碳源的纯无机盐体系驯化降解菌,体系中按梯度逐渐升高BDE-47的浓度,使得BDE-47的最终浓度为5mg/L。无机盐培养液(MSM)成分:90mg Na_2HPO_4 、10mg KH_2PO_4 、40mg NaCl 、30mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、40mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.1mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.1mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,蒸馏水1L,pH值为6.8~7.0。经转接6代反复驯化后,富集培养液在含BDE-47的固体无机盐培养基表面上进行涂布,待菌落长好后,选择具有透明圈且形态特征不同的菌落,在营养肉汤(NB)固体培养基中划线纯化培养,得到多株纯菌,纯菌进一步接种至含BDE-47的MSM培养液中检验其降解BDE-47的能力,最后获得一株BDE-47的高效降解菌伯克霍尔德菌GYP1。平板观察该菌落的形态(如图1所示),其呈黄色,球形,边缘平整,菌落表面光滑湿润。电子显微镜下观察该菌体的形态为杆状(如图2所示),大小约为 $1.29 \times 0.46 \mu\text{m}$ 。经16S rDNA测序(上海生物工程股份有限公司),得到的基因片段序列参见序列表。

[0028] 通过NCBI BLAST比对,其与伯克霍尔德菌属(*Burkholderia cepacia*)相似同源性

达99%，因此推定该菌为伯克霍尔德菌，其GeneBank的登录号为KY697917，并于2017年3月9日保藏于中国典型培养物保藏中心，简称CCTCC，保藏编号为CCTCC NO:M 2017103。

[0029] 本实施例所得伯克霍尔德菌GYP1在降解溴代阻燃剂2,2',4,4'-四溴联苯醚(BDE-47)中的应用：

[0030] 用MSM培养液将菌株GYP1配制成菌悬液(菌浓度约为 9×10^7 CFU)，按10% (V/V)的比例将该菌悬液接种至含BDE-47 1mg/L的MSM培养基中，在150r/min、30℃摇床中避光振荡培养，在3h、6h、9h、25h、48h、72h、96h分别取样测定培养液中BDE-47的剩余量，结果见图3。由图3结果可知，在0h~25h，GYP1对BDE-47的降解速率较快；25h~96h，GYP1对BDE-47的降解速率趋于缓慢并逐渐达到平衡，在96h时降解率达到82.38%。说明分离驯化所得到的降解菌GYP1可利用BDE-47作为唯一碳源和能源进行生长繁殖，并且具有高效降解BDE-47的能力。

[0031] 不同条件对所得伯克霍尔德菌GYP1降解溴代阻燃剂2,2',4,4'-四溴联苯醚(BDE-47)的性能影响测试：

[0032] (1) BDE-47初始浓度对菌株GYP1降解BDE-47的影响

[0033] 用MSM培养液将菌株GYP1配制成菌悬液(菌浓度约为 10^7 CFU)，按10% (V/V)的比例将该菌悬液接种至BDE-47浓度分别为0.5、1、2、3、4和5mg/L的MSM培养液中，pH=6.8~7.0，以不含有菌株GYP1的含BDE-47MSM培养液为空白，在150r/min、30℃摇床中避光振荡培养4天后测定培养液中BDE-47的剩余量，结果如图4所示。由图4可知，菌株GYP1对各BDE-47初始浓度的降解率分别为86.94%、85.34%、83.98%、80.97%、76.06%和67.54%。菌株GYP1对BDE-47初始浓度小于3mg/L的降解效率都在80%以上，其最佳初始浓度为0.5mg/L。当BDE-47浓度 ≥ 4 mg/L时，其降解效能受到一定的抑制，这可能是因为高浓度BDE-47在降解过程中产生了某种有毒有害的中间产物，对微生物产生了一定的毒害作用。上述BDE-47的降解率已扣除空白中的少量挥发，所得的降解率仅仅是微生物对BDE-47的降解率。降解率的计算公式如下式所示：

$$[0034] \quad \text{降解率} = \left(1 - \frac{M_{\text{实验组 BDE-47 的剩余量}}}{M_{\text{空白组 BDE-47 的剩余量}}} \right) \times 100\%。$$

[0035] 上述结果表明菌株GYP1可在较宽的浓度范围内(0.5~5mg/L)较好地降解四溴联苯醚BDE-47，并且效果显著，为多溴联苯醚污染环境的生物修复提供了保证。

[0036] (2) 温度对菌株GYP1降解BDE-47的影响

[0037] 用MSM培养液将菌株GYP1配制成菌悬液(菌浓度约为 10^7 CFU)，按10% (V/V)的比例将该菌悬液接种至BDE-47浓度1mg/L的MSM培养液中，pH=6.8~7.0，以不含有菌株GYP1的含BDE-47MSM培养液为空白，分别置于10、15、20、25、30、35、40℃的摇床中，在150r/min条件下避光振荡培养4天后测定培养液中BDE-47的剩余量，结果如图5所示。由图5结果可以看出，菌株GYP1降解BDE-47的最适宜温度为30℃，降解率达到85.44%。且在15~35℃范围内能较好的降解BDE-47，为其在实际环境温度中的应用提供了基础和保证。

[0038] (3) pH值对菌株GYP1降解BDE-47的影响

[0039] 研究在pH值为4.0~9.0条件下对菌株GYP1降解BDE-47的影响，用MSM培养液将菌株GYP1配制成菌悬液(菌浓度约为 10^7 CFU)，按10% (V/V)的比例将该菌悬液接种至BDE-47

浓度1mg/L的MSM培养液中,以不含有菌株GYP1的含BDE-47MSM培养液为空白,置于30℃的摇床中,在150r/min条件下避光振荡培养4天后测定培养液中BDE-47的剩余量,结果如图6所示。由图6可知,GYP1在pH=4.0~7.0酸性条件下,降解性能相差不大,降解率均能达80%以上。当pH=7.0时,降解效果最佳,降解率达到84.19%。但是在pH=8.0~9.0碱性条件下降解率显著降低,说明碱性条件不利于该菌对BDE-47的降解,这为其在不同pH环境中的应用提供了依据。

[0040] (4) 外加碳源对菌株GYP1降解BDE-47的影响

[0041] 用MSM培养液制备菌悬液(菌浓度约为 10^7 CFU),按10%(V/V)的比例分别接种至含葡萄糖、乳糖、蔗糖、酵母粉、联苯、联苯醚(浓度均为5mg/L)及1mg/L BDE-47的MSM培养液中,以不含有菌株的含1mg/L BDE-47的MSM培养液为空白,置于30℃的摇床中,在150r/min条件下避光振荡培养4天后测定培养液中各种BDE-47的剩余量,结果如图7所示。图7结果显示,外加碳源会轻微抑制菌株GYP1对BDE-47的降解,其中联苯醚的抑制效果最明显。这可能的是菌体优先利用了容易被利用的葡萄糖、乳糖等外加碳源,从而导致了体系中BDE-47的利用率降低。上述结果说明外加碳源会抑制菌株GYP1对四溴联苯醚BDE-47的降解,这为实际环境中菌株GYP1降解BDE-47的性能影响条件提供了理论依据。

[0042] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其它的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

[0001]	SEQUENCE LISTING	
[0002]	<110> 华南理工大学	
[0003]	<120> 一种伯克霍尔德菌GYP1及其在降解溴代阻燃剂中的应用	
[0004]	<130> 1	
[0005]	<160> 1	
[0006]	<170> PatentIn version 3.5	
[0007]	<210> 1	
[0008]	<211> 1383	
[0009]	<212> DNA	
[0010]	<213> Artificial Sequence	
[0011]	<220>	
[0012]	<223> CCTCC NO:M 2017103的16S RDNA基因片段序列	
[0013]	<400> 1	
[0014]	agtttgatca tggtcagat tgaacgctgg cggcatgcct tacacatgca agtcgaacgg	60
[0015]	cagcacgggt gcttgacact ggtggcgagt ggcgaacggg tgagtaatac atcggaacat	120
[0016]	gtcctgtagt gggggatagc cggcgaaaag ccggattaat accgcatacg atctacggat	180
[0017]	gaaagcgggg gaccttcggg cctcgcgcta tagggttggc cgatggctga ttagctagtt	240
[0018]	ggtggggtaa aggcctacca aggcgacgat cagtagctgg tctgagagga cgaccagcca	300
[0019]	cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtgggga attttgaca	360
[0020]	atgggcgaaa gcctgatcca gcaatgccgc gtgtgtgaag aaggccttcg ggttgtaaag	420
[0021]	cacttttgtc cggaagaaa tccttggtc taatacagtc gggggatgac ggtaccgga	480
[0022]	gaataagcac cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggt gcaagcgta	540
[0023]	atcggaatta ctgggcgtaa agcgtgcgca ggcggtttgc taagaccgat gtgaaatccc	600
[0024]	cgggctcaac ctgggaactg cattggtgac tggcaggcta gattatggca gaggggggta	660
[0025]	gaattccacg ttagcagtg aatgcgtag agatgtggag gaataccgat ggcgaaggca	720
[0026]	gccccctggg ccaatactga cgctcatgca cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat	780
[0027]	accctggtag tccacgccct aaacgatgtc aactagttgt tggggattca tttccttagt	840
[0028]	aacgtagcta acgcgtgaag ttgaccgcct ggggagtagc gtcgcaagat taaaactcaa	900
[0029]	aggaattgac ggggacccgc acaagcgggt gatgatgtgg attaatcga tgcaacgca	960
[0030]	aaaaccttac ctacccttga catggctgga atcccgtga gaggtgggag tgctcgaaag	1020
[0031]	agaaccggcg cacaggtgct gcatggctgt cgtcagctcg tgcgtgaga tgttgggtta	1080
[0032]	agtcccgcaa cgagcgcaac ccttgctcct agttgctacg caagagcact ctaaggagac	1140
[0033]	tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaag tcctcatggc cttatgggt	1200
[0034]	agggttcac acgtcataca atggtcgga cagagggtt ccaaccgcg agggggagct	1260
[0035]	aatcccagaa aaccgatcgt agtccggtt gcactctgca actcgagtgc atgaagctgg	1320
[0036]	aatcgctagt aatcgcggt cagcatgccg cggatgaatac gttccgggt cttgtacaca	1380
[0037]	ccg	1383

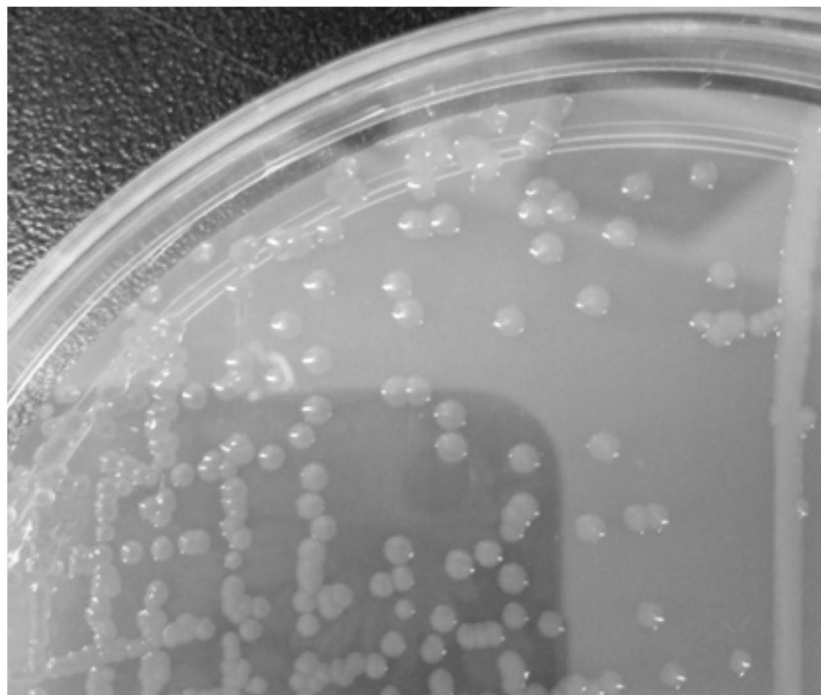


图1

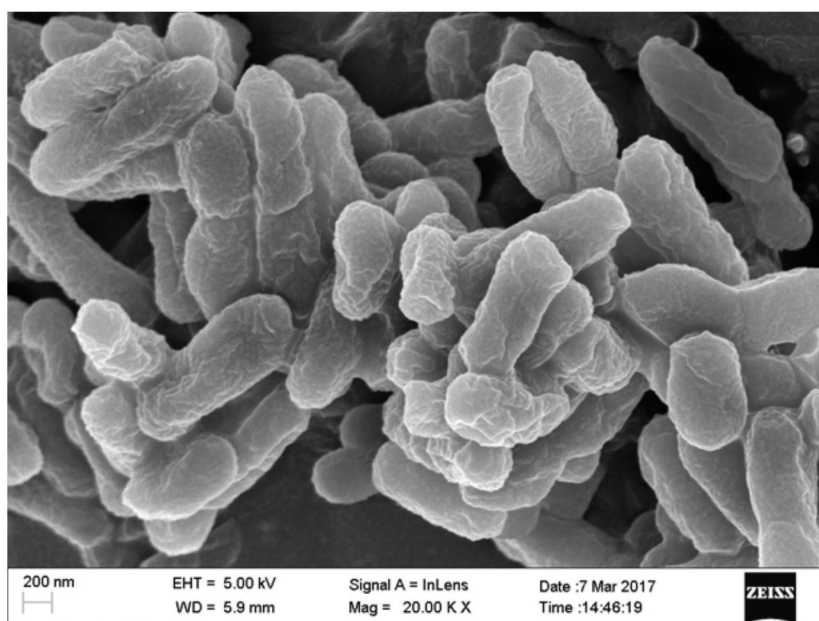


图2

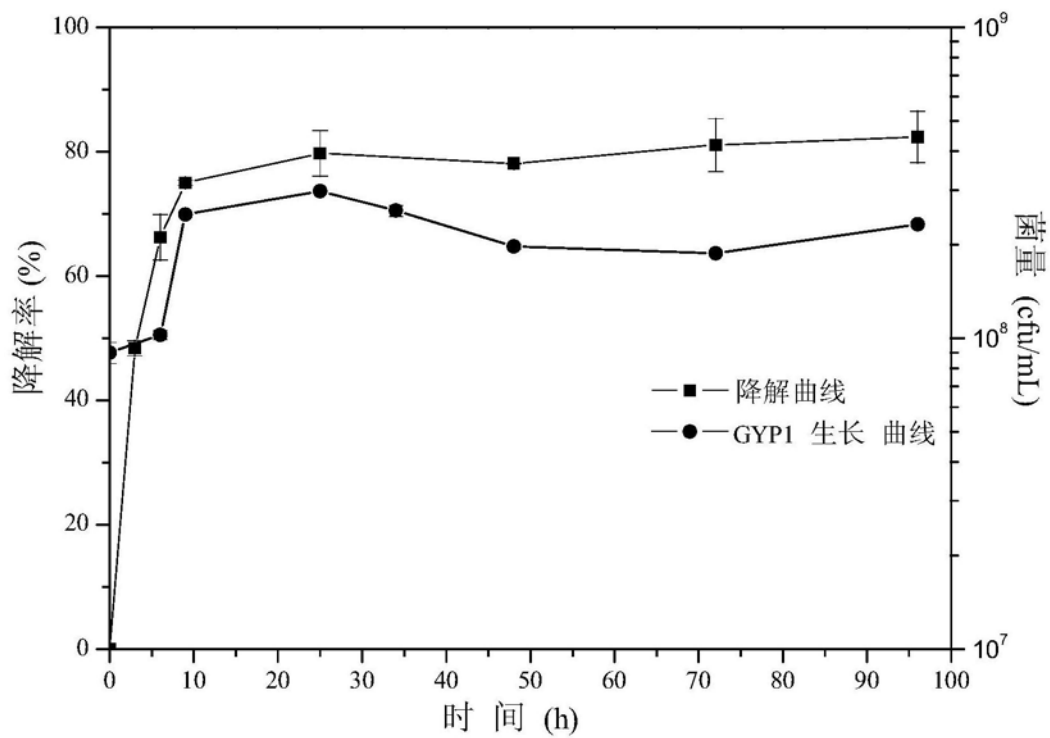


图3

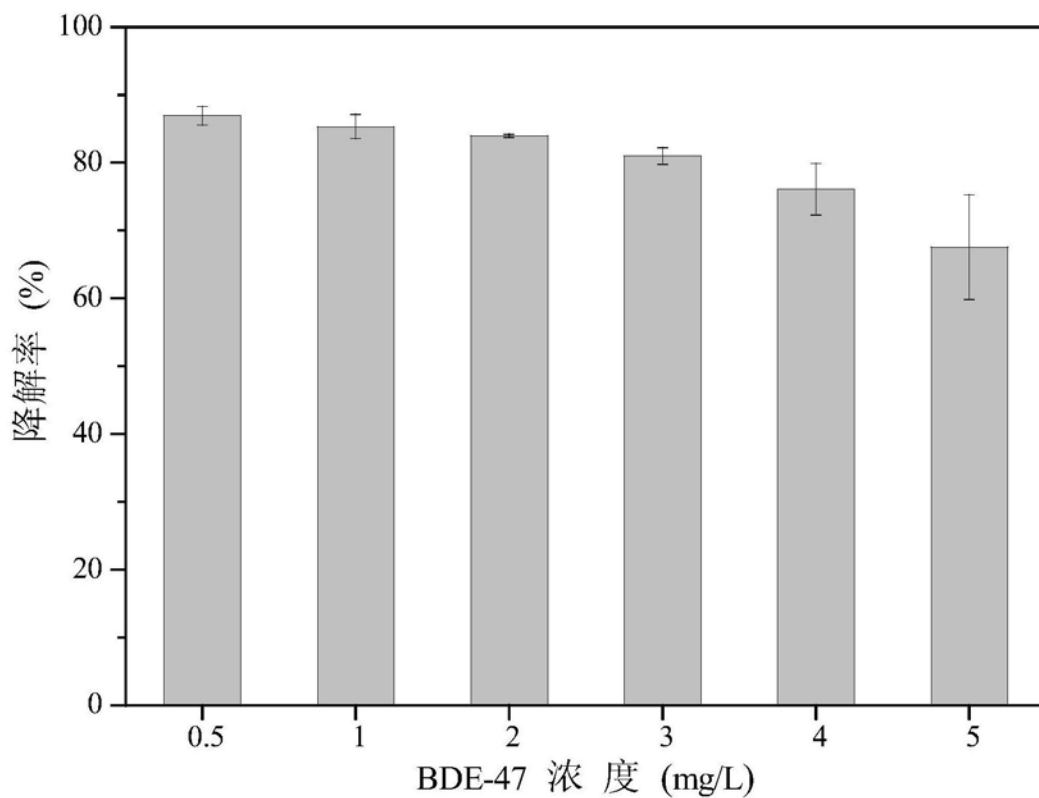


图4

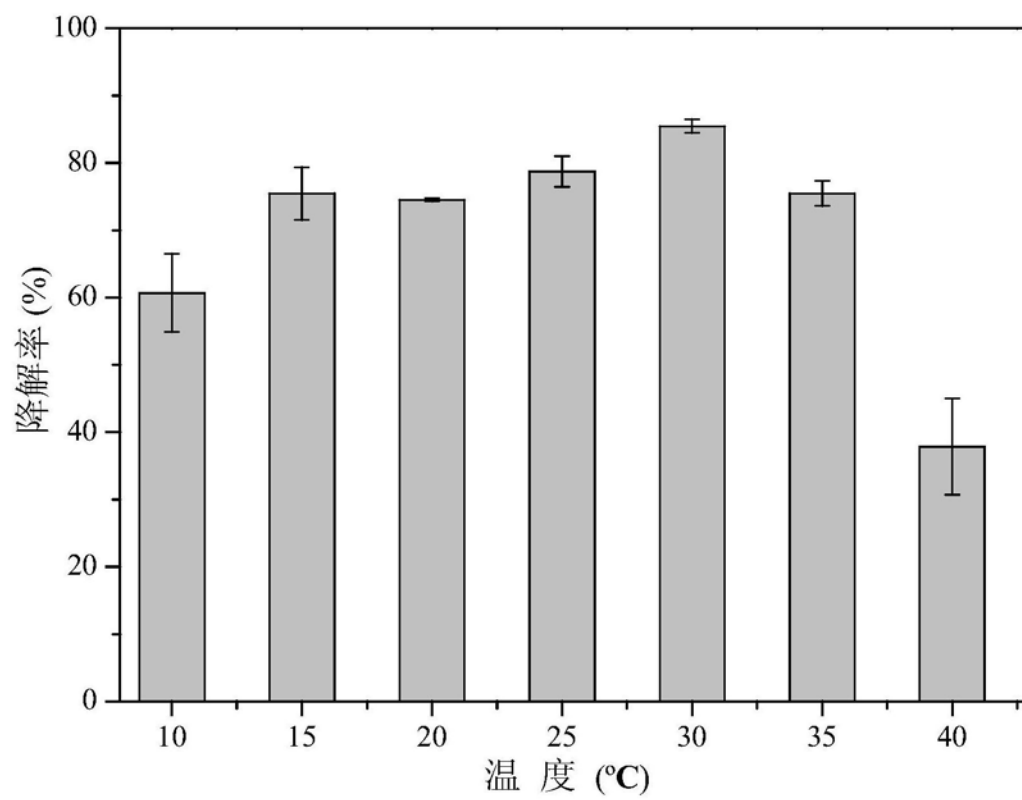


图5

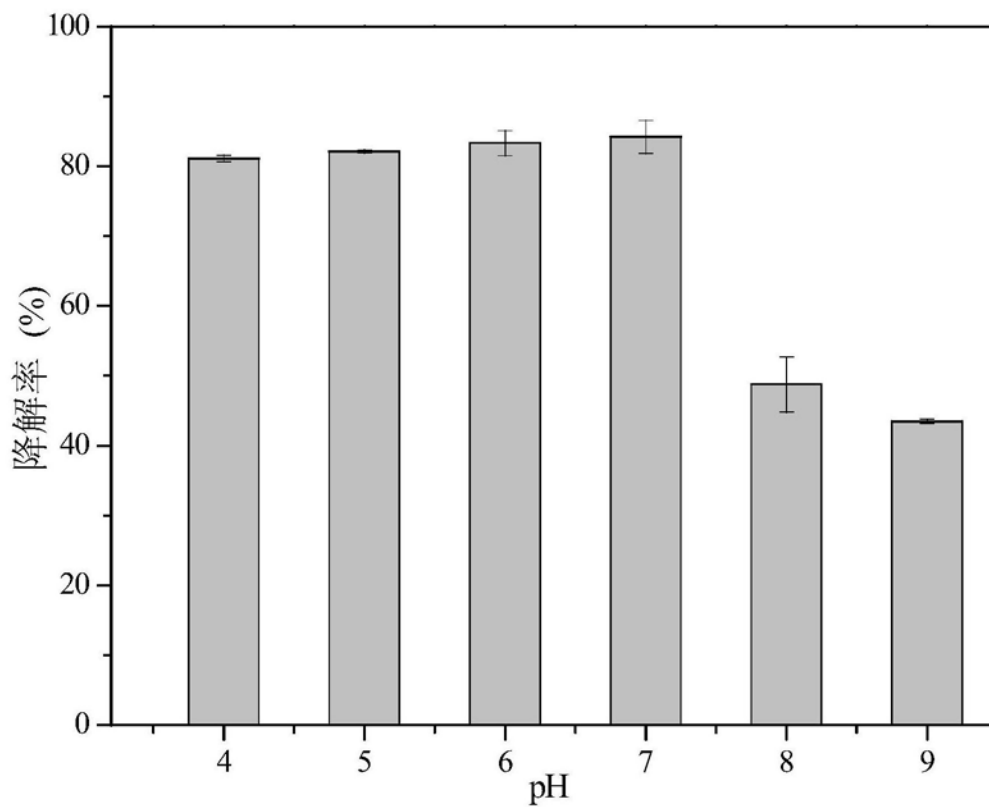


图6

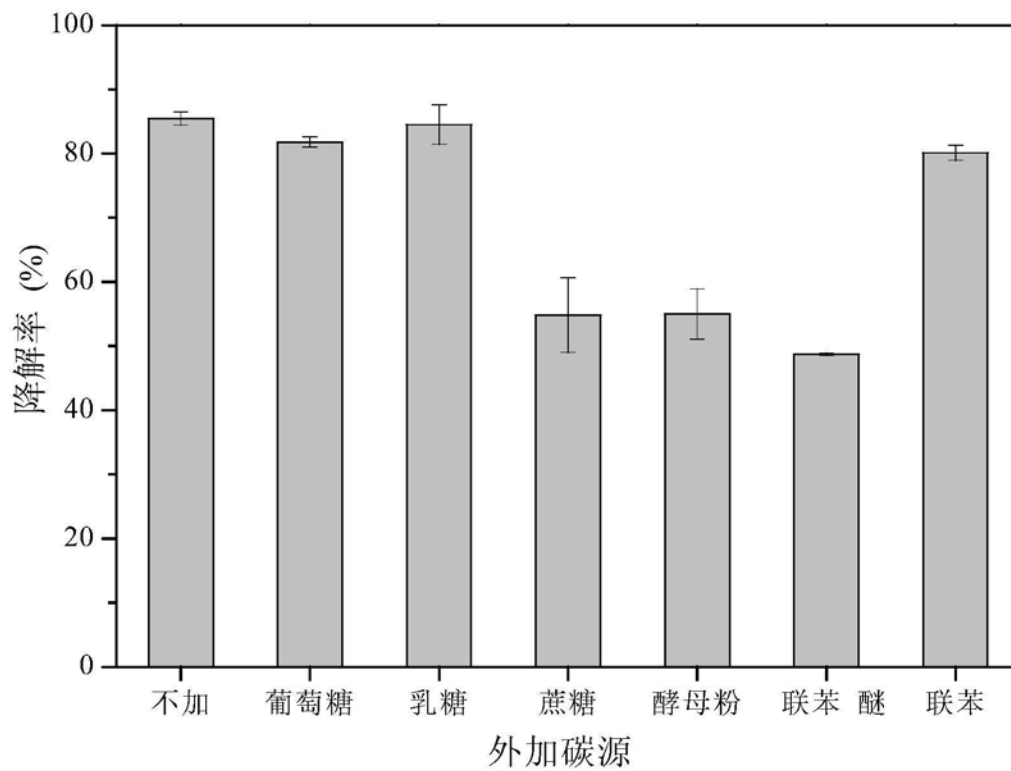


图7