

石油烃类的微生物降解

李习武* 刘志培

(中国科学院微生物研究所 北京 100080, China)

Microbial Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons

Li Xiwu Liu Zhipei

(The Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

关键词: 石油烃类, 微生物降解, 生物乳化剂, 降解酶基因

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)06-0764-04

石油作为重要能源之一已被世界各国广泛使用,由于在石油的开采、储存、运输、加工和石化产品生产等过程中的漏油以及突发性泄油事故致使大量的石油进入环境造成污染。石油污染的危害主要表现在对土壤生态系统的结构和功能的破坏,严重影响土壤的透气性和渗水性,导致土壤板结、肥力下降;在水体表面形成油膜,致使水中溶氧量急剧下降,造成水生生物的大量死亡,破坏水生生态环境和渔业资源;还可进入地下水系,直接污染地下水源,影响居民用水和农田灌溉;石油中的一些致畸致癌物质还可通过食物链的生物富集作用而直接危害人类健康。随着人们对环境问题的日益关注,石油烃类的微生物降解研究工作也不断得以深入。近十年来这一领域又有许多研究和相关报道,本文对相关工作进行了综述。

1 降解石油烃类的微生物

许多微生物能以烃类为唯一碳源和能源生长且在自然界分布广泛,约有 30 属 100 多种的微生物能利用烃类,主要有 *Pseudomonas*、*Achromobacter*、*Arthrobacter*、*Micrococcus*、*Nocardia*、*Vibrio*、*Acinetobacter*、*Brevibacterium*、*Corynebacterium*、*Flavobacterium*、*Candida*、*Rhodotorula* 和 *Sporobolomyces* 等属。在细菌、藻类、酵母和丝状真菌等分类群中皆发现了能降解石油烃类的种属。

Michael 等^[1]利用 rDNA 限制性酶切片段多态分析(RFLP)对一被烃类污染的含水土层的微生物区系组成进行了调查,结果表明,在已确定的 104 个序列类型中,94 个属于细菌,10 个属于古细菌。Varga 等^[2]调查了铁还原条件下被石油污染的含水土层中氧化苯的微生物区系组成,发现 *Geobacter* 占优势,并利用 16S rDNA 的变性梯度胶电泳(DGGE)比较了污染土层和相邻地点未污染土层的区系组成,发现了显著差异。在真菌降解石油烃类的研究中,白腐菌受到极大的关注。Bezalel 等^[3]报道了 *Pleurotus ostreatus* 对儿茶酚、苯蒽、苯芘、蒽、芘和芴的降解。

2 石油烃类的微生物降解

2.1 石油烃类及其可降解性

石油是一种成分极其复杂的混合物,并且不同来源的原油成分可以有很大的区别。石油中的烃类

一般可分为两类:饱和烃类(直链烷烃、支链烷烃、环烷烃)和不饱和烃类(烯烃、炔烃、单环芳烃、多环芳烃、杂环芳烃)。

一般认为,不同烃类的微生物可降解性次序如下:小于 C_{10} 的直链烷烃 $> C_{10} \sim C_{24}$ 或更长的直链烷烃 $>$ 小于 C_{10} 的支链烷烃 $> C_{10} \sim C_{24}$ 或更长的支链烷烃 $>$ 单环芳烃 $>$ 多环芳烃 $>$ 杂环芳烃。芳烃类化合物由于其水难溶性,某些多环芳烃还有毒性,更难被微生物降解,近年在这方面的研究最多,对于杂环化合物,则对噻吩作了一些研究工作,对于氧杂环或氮杂环化合物的降解几乎没有报道。

2.2 石油烃类的乳化及生物乳化剂

石油烃类在水中的溶解度非常小,难以提供足够的量来维持微生物的生长繁殖,为此微生物进化出了两种对策以提高与烃类的接触:特异性的附着机制和烃类的乳化。前一种机制中,微生物通过菌毛或细胞膜表面的脂类或蛋白使细胞形成疏水表面而附着于水中的油滴上,在此不作详述。后一种机制中,微生物可释放出乳化剂使油滴乳化成许多细小颗粒,以增大油滴可利用的表面积,有利于微生物的直接接触和利用。由于乳化剂或表面活性剂对微生物降解的广泛影响,近年来相关的研究很多。

乳化剂由一个疏水基团和一个亲水基团构成,具有两亲性质。其疏水基团为饱和、不饱和或羟化的脂肪酸,其亲水基团更加多样化,可简单如脂肪酸的羧基,也可复杂如糖脂的多聚糖基。疏水基团和亲水基团的结合可通过酯键、酰胺键或糖苷键。生物乳化剂根据亲水基团的性质可分为:糖脂、脂蛋白、脂肪酸、磷脂和中性脂。许多降解烃类的微生物能产生生物乳化剂,尤以 *Pseudomonas*、*Acinetobacter*、*Achromobacter*、*Arthrobacter*、*Brevibacterium*、*Corynebacterium*、*Candida* 和 *Rhodotorula* 等属为最。有的微生物只在利用烃类等疏水性碳源时形成生物乳化剂,有一些微生物则只在利用水溶性碳源时才形成生物乳化剂,还有一些微生物则在两类碳源上都可合成乳化剂。

最早受到广泛研究的一种生物乳化剂是由 *Acinetobacter calcoaceticus* 生长在乙醇或烷烃中产生的,命名为 Emulsan。近年来陆续报道了有关微生物产生乳化剂的研究。Venezia 等^[4]从 *Acinetobacter radioresistens* KA53 中得到一种新的生物乳化剂 Alasan,并研究了其性质。Alasan 是高分子聚糖和蛋白质的复合物,其乳化活性成分主要是蛋白质,在已分离出的 3 种分子量分别为 16、31 和 45kD 的蛋白质中,45kD 蛋白质乳化能力最强;Alasan 能明显提高菲、萤葱和芘的水溶性,且能促进菲和萤葱的降解。

生物乳化剂的合成与菌株、所用基质及生长条件有关。一般产生于指数生长后期或稳定期的早期,这是微生物对不利环境限制所做出的一种反应,是一种次生代谢。但也有一些乳化剂的结构与细胞壁成分类似,被认为与细胞壁的合成有关,这方面的工作还有待进一步深入。

乳化剂对于微生物降解烃类的影响,目前存在着截然相反的报道。一方面,乳化剂可以增大烃类在水中的溶解度或将烃类乳化成细小颗粒以增大表面积而有利于烃类的降解;另一方面,由于某些乳化剂对一些微生物的毒害作用或作为碳源被优先利用或其他一些不明原因而抑制烃类的降解。近十年来也有不少关于乳化剂对烃类降解影响的研究,研究表明,乳化剂对烃类降解的影响涉及所使用降解菌株的种类、烃类以及乳化剂类型和乳化剂浓度等诸多因素,在不同的条件下有不同的结果。Foght 等^[5]试验了生物乳化剂 Emulsan 对原油降解的影响,Emulsan 使纯培养或混合菌株对饱和烃类的降解减少了 50%~90%,也使混合菌株对芳香化合物的降解减少了 90%,但对纯培养降解芳香化合物影响很小。许多研究表明,乳化剂的临界胶团浓度(Critical Micelle Concentration, CMC)是一个重要参数,乳化剂浓度在临界胶团浓度以上和以下对烃类的降解常有不同的影响。Laha 和 Luthy^[6]发现非离子型表面活性剂 $C_{12}E_4$ 、 $C_8PE_{9.5}$ 和 $C_9PE_{10.5}$ 在临界胶团浓度以上时能抑制菲的降解,当稀释至临界胶团浓度以下时这种抑制不复存在。

近年来对与生物乳化剂合成有关基因的研究进行了报道。Nakar 和 Gutnick^[7]研究了与 Emulsan 合成有关的基因的特点,整个序列约 27kb,由 20 个开放阅读框组成,其中 17 个由同一方向转录,位于上游 607 个 bp 的另外三个开放阅读框由另一方向转录。

2.3 石油烃类的降解

根据烃类的化学结构特点,烃类的降解途径主要可分两部分:链烃的降解途径和芳香烃的降解途径。

直链烷烃的降解方式主要有三种:末端氧化、亚末端氧化和 ω 氧化。此外,烷烃有时还可在脱氢酶作用下形成烯烃,再在双键处形成醇进一步代谢。

关于芳香烃的降解途径,在好氧条件下先被转化为儿茶酚或其衍生物,然后再进一步被降解。近十年来未见有新的降解途径的报道,倒是芳香烃的厌氧降解有诸多研究,目前的研究主要是调查和确认芳香烃在厌氧条件下的可降解性。

研究表明,微生物在厌氧条件下也可降解石油烃类。Seyfried等^[8]研究发现,在反硝化条件下,甲苯的降解是由甲基的直接氧化起始的,可检测到苯甲醛和苯甲酸的积累。

2.4 降解酶类和相关基因

Kniemeyer和Heider^[9]从一株反硝化菌 *Azoarcus* 分离出一种钼/铁硫/正铁血蛋白,155kD,由 α 、 β 、 γ 三种亚基组成,亚基分子量分别为69、43和23kD,其 α 亚基N-末端氨基酸序列与其它钼蛋白类似。Maeng等^[10]从一株 *Acinetobacter* sp. 菌中纯化得到一种正烷烃氧化酶,该酶是双加氧酶,能催化正烷烃为正烷烃的氢过氧化物,该反应需 O_2 ,但不需NAD(P)H。该酶为分子量为134kD的同二聚体,含有等摩尔的黄素腺嘌呤二核苷酸,酶的活性需要 Cu^{2+} 的存在,可催化10~30个碳原子的烯烃以及一些芳香烃的取代烷基,但不可作用于支链烷烃、醇和醛等。Iwabuchi和Harayana^[11]从菲降解菌 *Nocardioides* sp. KP7 中纯化得到了2-羟基苯醛脱氢酶,由4个相同的亚基组成,每个亚基53kD。编码该酶的基因为1455bp,与该基因相邻的7个开放阅读框中,有编码1-羟基-2-萘酸双加氧酶的基因 *phdL*、编码反-2-羟基苯唑丙酮酸醛缩酶的基因 *phdJ*、编码2-羧基苯醛脱氢酶的基因 *phdK*,此外,有一个开放阅读框的编码产物类似于 *Pseudomonas putida* PRS2000 中的芳香烃转移基因 *pcaK* 的编码产物,另一个开放阅读框的编码产物则与细胞色素 P-450 相似。

近年来也确定了不少与石油烃类降解相关的基因。Fong等^[12]发现了 *Pseudomonas putida* ML2 中与苯降解有关的双加氧酶基因 *bedC₁ C₂ BA* 和依赖于 NAD^+ 的脱氢酶基因 *bedD*。Kim和Zylstra^[13]发现了 *Beijerinckia* sp. 联苯降解中两个关键基因 *bphC* 和 *xylE*,其中 *bphC* 编码产物为催化2,3-二羟基联苯间位裂解的双加氧酶,*xylE* 编码产物为催化儿茶酚的间位裂解的双加氧酶,这两个基因相距5.5kb,以相反方向转录。Kahng等^[14]则研究了 *Ralstonia Pickettii* PK01 涉及苯、甲苯和烷基芳香烃代谢的调节子 *tbu* 的特点。这个调节子的第一个操纵子含有编码 *tbu* 途径起始酶甲苯-3-单加氧酶的基因和编码整个调节子的转录增强子的基因 *tbuT*,此外还发现了与 *tbuT* 处于相异链上的另一基因 *tbuX*,该基因位于 *tbuT* 终止子下游63bp处,可能与烃类的摄入有关。Coschigano和Young^[15]则发现了一株反硝化菌中与甲苯代谢有关的调节基因 *tutB* 和 *tutC*,这是首次报道与芳香烃类厌氧降解有关的基因。Arengi等^[16]研究了 *Pseudomonas stutzeri* OX1 中编码甲苯、邻二甲苯单加氧酶基因簇 *touABCDEF* 的调节基因 *touR* 的特点,*touR* 位于 *tou* 基因簇的下游,是一个类似于 *NtrC* 家族的转录增强子,效应物为甲基苯酚或二甲基苯酚,甲基苯酚不起作用。

2.5 微生物、烃类以及它们之间的相互作用

在自然环境中,微生物对石油烃类的降解是一个极其复杂的过程,是整个微生物区系对环境各种可利用的底物混合物综合起作用的过程,这其中就必然涉及到各微生物之间、底物之间以及微生物和底物之间的相互作用。

对于微生物间的相互作用,目前的研究工作主要集中于多种微生物对底物的协同代谢上。Dangmann等^[7]研究了 *Hydrogenophaga palleronii* S1 和 *Agrobacterium radiobacter* S2 对4-氨基苯磺酸盐的代谢协同。菌株 S1 可将4-氨基苯磺酸盐转化为儿茶酚-4-磺酸盐而作为菌株 S2 的生长基质。在以4-氨基苯磺酸盐作为唯一碳源、氮源、能源和硫源的液体批次处理培养中,两种菌体数量之比保持恒定,介于1/3到

3 之间。

对于底物之间的相互作用,研究较多的是共代谢作用和备用物现象。备用物现象是指当多种可降解的底物同时存在时,微生物优先利用其中的某一种底物,而其他种底物的降解受到抑制,只有当优先利用的底物利用完后才能降解利用其他备用底物的现象。这两种现象在石油烃的降解中比较普遍。

2.6 环境因子的影响

在自然环境中,石油烃类降解与否以及快慢都是与其所处的环境密切相关。

液态的石油烃类在水中会形成水油界面,微生物正是在这一水油界面上降解烃类的,降解速率与水油界面的面积密切相关,能产生生物乳化剂的微生物正是乳化剂增大水油界面的面积而促进微生物对烃类的降解。

石油烃类的微生物降解可在很大的温度范围内发生,在 $0^{\circ}\text{C} \sim 70^{\circ}\text{C}$ 的环境中均发现有降解石油烃类的微生物。大多数微生物在常温下较易降解石油烃类,且由于某些对微生物有毒害的低分子量石油烃类在低温下难挥发,会对石油烃类的降解有一定的抑制作用,所以低温下石油烃类较难降解。

在自然环境中,大多数的石油烃类是在好氧条件下被降解的,这是因为许多烃类的降解需要加氧酶和分子氧。但也有一些烃类能在厌氧条件下被降解。

在自然条件下,氮源和磷源经常成为微生物降解烃类的限制因子。在天然水体中,为了促进石油烃类的降解而添加水溶性的氮源和磷源也受到限制,因为有限添加的氮源和磷源在水体中被高倍稀释而难以支持微生物的生长,所以近年来生物整治研究致力于开发亲油性的氮源和磷源,使其在水体中附着于石油烃类而维持菌体的持续生长。

石油烃类的微生物降解一般处于中性 pH 值,极端的 pH 值环境不利于微生物的生长。不过也有微生物能在极端的 pH 值条件下降解石油烃类,Stapleton^[18]等发现在 pH2.0 的一处土样中,萘和甲苯仍然被降解为 CO_2 和 H_2O 。其他环境条件,如 Fe^{2+} 浓度、盐度和压力也会影响微生物对石油烃类的降解。

参 考 文 献

- [1] Dojka M A, Hugenholtz P, Hack S K, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64** (10) : 3869 ~ 3877.
- [2] Varga R J N, Anderson R T, Fraga J L, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (7) : 3056 ~ 3063.
- [3] Bezalel L, Hadar Y, Cerniglia C E. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62** (1) : 292 ~ 295.
- [4] Venezia N S, Zosim Z, Gottlieb A, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61** (9) : 3240 ~ 3244.
- [5] Foght J M, Gutnick D L, Westlake D W S. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55** (1) : 36 ~ 42.
- [6] Laha S, Luthy R G. *Environ Sci Technol*, 1991, **25** (11) : 1920 ~ 1930.
- [7] Nakar D, Gutnick D L. *Microbiology*, 2001, **147** : 1937 ~ 1946.
- [8] Seyfried B, Glod G, Schocher R, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60** (11) : 4047 ~ 4052.
- [9] Knimeyer O, Heider J. *J Biol Chem*, 2001, **276** : 21381 ~ 21386.
- [10] Maeng J H, Sakai Y, Tani Y, et al. *J Bacteriol*, 1996, **178** (13) : 3695 ~ 3700.
- [11] Iwabuchi T, Hrayama S. *J Bacteriol*, 1997, **179** (20) : 6488 ~ 6494.
- [12] Fong K P, Goh C B, Tan H M. *J Bacteriol*, 1996, **178** (19) : 5592 ~ 5601.
- [13] Kim E, Zylstra G J. *J Bacteriol*, 1995, **177** (11) : 3095 ~ 3103.
- [14] Kahng H Y, Byrne A M, Olsen R H, et al. *J Bacteriol*, 2000, **182** (5) : 1232 ~ 1242.
- [15] Coschigano P W, Young L Y. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63** (2) : 652 ~ 660.
- [16] Arengi F L G, Pinti M, Galli E, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (9) : 4057 ~ 4063.
- [17] Dangmann E, Stolz A, Kuhm A E, et al. *Biodegradation*, 1996, **7** : 223 ~ 229.
- [18] Stapleton R D, Savage D C, Saylor G S, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64** (11) : 4180 ~ 4184.