

# 新型复合生物乳化剂的性质及其在多环芳烃降解中的作用

李习武 刘志培\* 刘双江

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 对一株能利用多种石油烃的 Em1 菌株产生的生物乳化剂,采用柱层析方法进行分离纯化,其表面活性组分存在于氯仿、甲醇、浓盐酸混合物(V/V/V = 5:1:0.01)的洗脱液中,挥发洗脱溶剂即为纯化的生物乳化剂。该生物乳化剂可使蒸馏水的表面张力由 72 mN/m 降至 30 mN/m,其临界胶团浓度(CMC)为 75 mg/L。它不含糖类、蛋白、中性脂、磷酸基团和  $\alpha$ -氨基酸,采用红外光谱(IR)、气质联用(GC/MS)和核磁共振(NMR)测定其化学组成和结构,表明其主要由十六烷酸、脂肪醇类、酯类和脂肪酰胺类等组成,这些物质的协同作用是该生物乳化剂高表面活性的关键。该生物乳化剂可明显促进菌株对多环芳烃的降解作用,可将降解率提高 20%,其促进降解的机制主要是提高多环芳烃在水中的溶解度,平均可提高约 10 倍的溶解度。

**关键词** 石油污染 芳烃降解 生物乳化剂 协同作用

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)03-0373-05

石油污染是我国面临的主要污染源之一,其中所含的多环芳烃(PAHs)是一类具有三致效应的有机污染物,对环境和人类健康构成极大威胁,其中多数早在 1978 年就被美国环保局(EPA)列为首要污染物。因此在石油污染的治理研究中,主要集中在多环芳烃降解的研究,国外对多环芳烃的微生物降解研究起步较早,近十年来又分离出了一些新的降解菌株<sup>[1-3]</sup>,并总结归纳了几种多环芳烃的降解途径<sup>[4,5]</sup>。由于石油烃类化合物的水不溶性,限制了活性微生物与底物的作用,使得能提高石油烃类与活性微生物作用效率的生物乳化剂的研究与应用成为石油污染治理中的又一研究热点。生物乳化剂应用于环境污染(尤其是石油污染)的生物治理,在国外已有一些成功的先例<sup>[6]</sup>。

生物乳化剂是一类由生物产生的具有表面活性的化合物,其分子结构由一个疏水部分和一个亲水部分构成,疏水部分为饱和、不饱和或羟化的烃链;亲水部分更加多样化,可简单如脂肪酸的羧基,也可复杂如糖脂的多聚糖基。疏水部分和亲水部分的结合可通过酯键、酰胺键或糖苷键<sup>[7]</sup>。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<sup>[8]</sup>。生物乳化剂的表面活性作用以及对热、pH 的稳定性均与化学合成的乳化剂相当,更具有一般的化学合成乳化剂所无法媲美的优点——与

环境的兼容性,即它没有毒性,并可被生物降解,不对环境造成不利的影响,因此生物乳化剂在石油开采、环境治理以及食品饮料、化妆品生产等领域具有广阔的应用前景。但目前国内对生物乳化剂及其产生菌的研究还较少<sup>[9]</sup>。

本实验室从胜利油田土壤样品中分离得到一株能降解多种石油芳烃且能利用正十六烷为碳源产生生物乳化剂的细菌 Em1 菌株<sup>[10]</sup>,本文主要研究了该菌株所产乳化剂的化学组成和性质及其对蒽、菲、芘降解的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和培养基

实验所用菌株赤红球菌(*Rhodococcus ruber*) Em1<sup>[10]</sup>为本实验室自胜利油田原油污染土壤中分离纯化所得。降解实验所用培养基为无机盐培养液,其组成为  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  1g,  $KH_2PO_4$  1g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g,  $NH_4NO_3$  1g,  $CaCl_2$  0.02g,  $FeCl_3$  0.001g,定容至 1L,初始 pH 为 7。蒽、菲、芘以粉末形式直接加入培养基。产乳化剂培养基见文献<sup>[10]</sup>。

### 1.2 菌株生长的测定

菌株生长以 721 型分光光度计所测得的培养液在波长 460nm 处的浊度表示。

基金项目:国家 863 计划(2002AA601150);中国科学院知识创新项目(KSCX2-SW-113)

\* 通讯作者。Tel 86-10-62554043;E-mail liuzhipei@hotmail.com

作者简介:李习武(1978-)男,湖北省武汉市人,中国科学院微生物研究所 2000 级硕士生。

收稿日期:2003-07-23 修回日期:2003-10-08

### 1.3 葱、菲、芘的测定

将待测样品的 pH 调至 2 ,以等体积的正己烷萃取 2 min ,待分层后取上层有机相做 HPLC。所用的色谱柱为 HP-Extender-C18 反相柱 ,色谱条件为乙腈 :水 = 60:40 ,流动相流速为 1 mL/min ,葱、菲、芘的监测波长分别为 254 nm、251 nm 和 240 nm。根据标准曲线计算葱、菲、芘的量。

### 1.4 表面张力的测定

采用山东淄博科森公司的 Auto-tensiometer ZL-2 型表面张力测定仪(圆环法)测定其表面张力。

### 1.5 乳化剂的分离纯化<sup>[11]</sup>

将乳化剂发酵液 250 mL 于分液漏斗中静置 1h ,取上层约 50 mL 培养液以等体积的甲醇、氯仿混合物(V/V = 1:1)萃取 2 min ,10000 r/min 离心 10 min ,取有机相真空抽吸使溶剂挥发 ,将剩余物溶于少量正己烷做柱层析。采用  $\phi 26\text{ mm} \times 300\text{ mm}$  的层析柱 ,填料为硅胶 GF<sub>254</sub> ,洗脱程序为 :正己烷 100 mL→氯仿 100 mL→氯仿、甲醇、浓盐酸混合物(V/V/V = 5:1:0.01)100 mL→氯仿、甲醇混合物(V/V = 5:2)200 mL ,收集 4 种洗脱组分 ,真空抽吸使溶剂挥发 ,分别取 4 种剩余物少许溶于 20 mL 蒸馏水中至终浓度 100 mg/L ,测表面张力以确定有表面活性的组份。

### 1.6 生物乳化剂临界胶团浓度(CMC)的测定

按参考文献[12]进行。

### 1.7 生物乳化剂化学性质的测定

糖类组份的定性检测采用  $\alpha$ -萘酚法<sup>[13]</sup> ;蛋白质的检测采用 Bradford 法<sup>[14]</sup>。中性脂的检测采用异羟肟酸铁试验<sup>[13]</sup>。 $\alpha$ -氨基酸的检测采用茚三酮法<sup>[14]</sup>。

采用 Bruker Tensor 27 红外光谱仪溴化钾薄片法测样品的红外光谱。气质联用所用的仪器及条件为美国 PE 公司(Perkin Elmer)的 TurboMass GC/MS (气相色谱/质谱联用仪) ,SE-54 石英毛细管柱 ,柱长 30m ,程序升温条件 :80℃ ~ 300℃(10℃/min) ;采用 Bruker DMX-300(WB)型核磁共振仪 ,以 TMS 为内标( $\delta = 0$ ) ,CDCl<sub>3</sub> 作溶剂 ,测定样品的<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C核磁共振谱。

## 2 结果和讨论

### 2.1 菌株 Em1 对石油烃类的降解

通过正交实验试验了菌株 Em1 降解葱、菲、芘的最佳条件 ,结果表明 ,在近似于最佳条件下 ,即底物浓度 100 mg/L ,摇床转速 200 r/min 时培养 18d ,对葱、菲、芘的降解率分别为 48.0%、57.4%和 32.0%。事实上 ,菌株 Em1 具有很广的底物降解范围 ,除葱、菲、芘外 ,对所试验的正十六烷、苯和萘皆能降解 ,以上述底物为唯一碳源的无机盐培养液 30℃ 200r/min 下培养 18d (以正十六烷为底物时培养 5d)的 OD<sub>460</sub> 见表 1。

表 1 菌株 Em1 对石油烃的降解

Table 1 Biodegradation of petroleum hydrocarbons						
Concentration of Chemicals( mg/L )	Hexadecane ( 2000 )	Benzene ( 400 )	Naphthalene ( 300 )	Anthracene ( 100 )	Phenanthrene ( 100 )	Pyrene ( 100 )
OD <sub>460</sub>	0.28	0.15	0.17	0.12	0.07	0.07

### 2.2 乳化剂的分离纯化和 CMC 测定

通过柱层析分离纯化可以获得 4 种不同的组分 ,测定 4 种组份的表面活性 ,结果表明 ,表面活性物质存在于氯仿、甲醇、浓盐酸混合物(V/V/V = 5:1:0.01)的洗脱液中 ,挥发洗脱剂 ,得到纯化的生物乳化剂。该乳化剂可使蒸馏水的表面张力由 72 mN/m 下降至约 30 mN/m ,经测定 ,其 CMC 为 75 mg/L ,远低于一般化学合成表面活性剂 ,如 Tween 20 的 CMC 为 600 mg/L ,在生物乳化剂中也是比较低的<sup>[15]</sup>。

### 2.3 乳化剂化学性质和结构的测定

生物乳化剂的  $\alpha$ -萘酚试验、Bradford 试验、异羟肟酸铁试验及茚三酮试验结果皆为阴性 ,说明生物乳化剂中不含糖类、蛋白、中性脂类和  $\alpha$ -氨基酸 ,其红外吸收光谱结果见图 1 ,在 721.40 cm<sup>-1</sup>[( - CH<sub>2</sub>

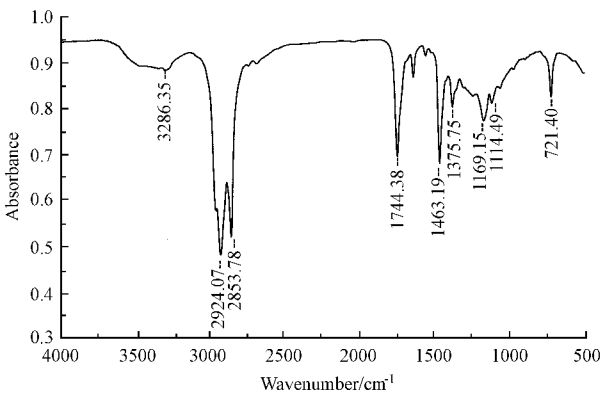


图 1 生物乳化剂的红外吸收图谱

Fig. 1 Infrared spectra of the bioemulsifier

- )<sub>n</sub> ] 1114.49 cm<sup>-1</sup>( - C - OH ) 1169.15 cm<sup>-1</sup>( - C - C - ) 1375.75 cm<sup>-1</sup>、1463.19 cm<sup>-1</sup>、2853.78 cm<sup>-1</sup>、2924.07 cm<sup>-1</sup>( - C - H )、1744.38 cm<sup>-1</sup>( - C = O )

3286.35  $\text{cm}^{-1}$  ( - NH )等处有相应基团的吸收峰,但并无磷酸基团的相应吸收峰,说明该乳化剂不含磷脂。现今发现的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,故推测生物乳化剂中有表面活性的物质应为脂肪酸。生物乳化剂的气质联用气相色谱图如图 2 所示。质谱结果表明,十六烷为底物在经过 Em1 菌株的作用下,形成了不同的产物。在 16.89 min 处的物质为十六烷酸,在生物乳化剂中所占比重也较大,然而纯十六烷酸只能使水的表面张力下降至 53.6 mN/m,远远高于生物乳化剂的 30 mN/m,其余在 11.08 min、11.30min、12.35min、12.97min、14.62min、15.43min 等处的物质为烷烃或脂肪醇类,不具有表面活性,15.79 min 和 17.24 min 处的物质为酯类,但在生物乳化剂中所占比重较小。生物乳化剂的核磁共振  $^1\text{H}$  谱结果见图 3。 $^1\text{H}$ :0.878 mg/L ( -  $\text{CH}_3$  ), 1.255 mg/L [ ( -  $\text{CH}_2$  - )<sub>n</sub> ],1.606 mg/L ( -  $\text{CH}_2$  - ), 2.317 mg/L ( -  $\text{CH}_2\text{CO}$  ),3.389 mg/L ( -  $\text{CH}_2$  - ), 4.142 mg/L ( - NH or - OH )。该结果与红外及气质联用结果也是一致的,说明在生物乳化剂的混合物中,主要组分为烷烃、脂肪醇类和脂肪酸,还含有酯类和脂肪酰胺。

根据以上实验结果,Em1 菌株产生的生物乳化剂为多组份的生物乳化剂,其有效成分主要为十六烷酸、脂肪醇类、酯类和脂肪酰胺等,是这些组份的

协同作用表现出很强的表面活性。不同系组分的协同作用在化学合成的表面活性剂中早有报道,如  $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{SO}_4\text{Na}-\text{C}_8\text{H}_{17}\text{OH}$  体系( 9:1 )水溶液的表面张力可降至 22 mN/m<sup>[16]</sup>,而  $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{OH}$  饱和水溶液的表面张力及  $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{SO}_4\text{Na}$  水溶液的最低表面张力皆高于 30 mN/m。在协同作用中,表面张力降低的效率( 降低溶剂表面张力至一定值时,所需表面活性剂的浓度 )和能力( 表面张力降低所能达到的最大程度 )都有可能得到提高,而如果是同系的混合物,则表面张力降低的效率和能力将是各组份的平均值。在生物乳化剂中曾有同系混合物的报道<sup>[17]</sup>,尚未见到这种非同系物多组份协同作用的生物乳化剂的报道,因此可以认为 Em1 菌株所产生的生物乳化剂是一种新型生物乳化剂,这对于拓展生物乳化剂资源、研究生物乳化剂的作用机理等都均有重要意义。

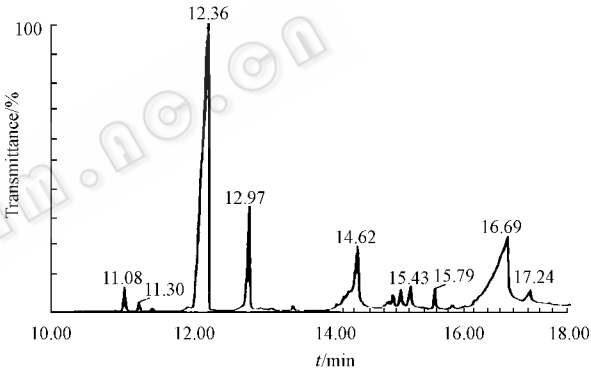


图 2 生物乳化剂气质联用的气相色谱结果  
Fig. 2 Gas chromatograph of the bioemulsifier

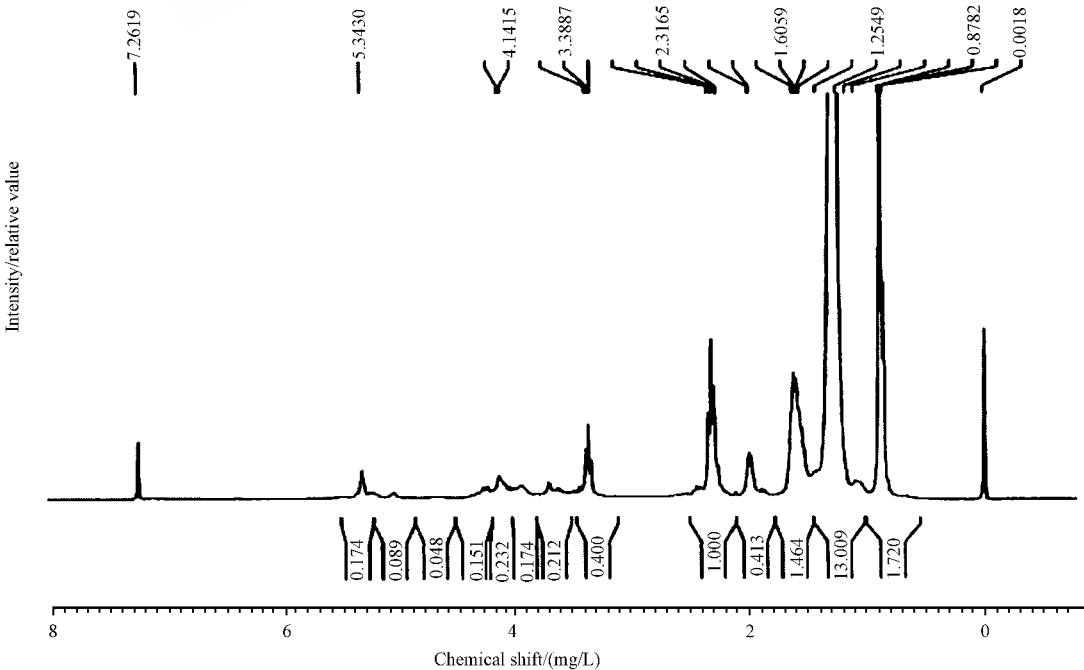


图 3 生物乳化剂的  $^1\text{H}$  谱

Fig. 3  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectra of the bioemulsifer

### 2.4 菌株 Em1 所产乳化剂对其降解蒽的影响

采用正交实验所得的降解蒽的最佳条件 ,测定了乳化剂对菌株 Em1 降解蒽的影响。在未加乳化剂时 ,菌株 Em1 对蒽的降解率在 3、7、10、14 d 分别为 19%、22.3%、20.5%、24.3% ,而在加入 1/30 的乳化剂对照组中 ,其降解率分别为 46.3%、36.6%、55%、49.3% ,该结果表明 ,在试验的条件下 ,乳化剂对菌株 Em1 降解蒽有明显的促进作用 ,可将降解率提高约 20%。

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<sup>[1 2]</sup>。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。乳化剂促进微生物降解烃类的机理 ,所报道的主要有两种 ,即吸附和乳化<sup>[7 8]</sup>。前一种机制下 ,微生物所产生的乳化剂主要都位于菌体表面 ,而不释放到培养液中 ,位于菌体表面的乳化剂可以介导菌体与油滴的吸附 ,增大菌体与油滴接触的机会 ,在菌体利用完油滴中可利用的烃类后 ,又使菌体与油滴解吸附 ,而去吸附新的油滴。后一种机制下 ,乳化剂主要释放到培

养液中 ,将烃类乳化成细小的颗粒(假溶) ,以增大菌体与烃类的接触面积。为探讨生物乳化剂促进菌株对蒽降解的机理 ,试验了该乳化剂对蒽、菲、芘在水中的增溶作用 ,取六支 50 mL 的容量管加入 25 mL 蒸馏水 ,再分别加入蒽、菲、芘至终浓度为 50 mg/L ,每种底物 2 管 ,一管加入 5 mL 乳化剂发酵液 ,另一管加入 5 mL 蒸馏水作对照 ,于摇床上振荡过夜 ,10000 r/min 离心 ,取 10 mL 上清调 pH 至 2 ,以等体积的正己烷萃取 ,测定其中的蒽、菲、芘浓度。表 2 的结果表明 ,菌株 Em1 所产的生物乳化剂能显著增大蒽、菲、芘在水中的溶解度 ,平均增大 10 倍。由此可以初步认为 ,该生物乳化剂对菌株降解多环芳烃的促进作用主要是由于提高了多环芳烃在水中的溶解度。

以上实验结果表明 ,Em1 菌株不仅可以降解石油污染中的烷烃和芳烃类化合物 ,还可以利用其中的烷烃产生多种组份协同作用的高活性的新型生物乳化剂 ,可提高多环芳烃在水中溶解度约 10 倍 ,以此提高活性微生物与底物的作用效率 ,从而促进多环芳烃的降解作用 ,说明 Em1 菌株在石油污染治理中具有较高的应用价值。

表 2 菌株 Em1 所产乳化剂对蒽、菲、芘的增溶作用

Table 2 Accretion of solubility of anthracene , phenanthrene and pyrene by accession of bioemulsifier produced by strain Em1

Chemicals	Standard solubility of chemicals( mg/L )	Solubility of chemicals when no bioemulsifier included( mg/L )	Solubility of chemicals when 1/30 bioemulsifier included( mg/L )	Multiple of solubility augment
Anthracene	0.075 <sup>[18]</sup>	0.06	0.83	12.8
Phenanthrene	1.1 <sup>[19]</sup>	0.84	9.97	10.9
Pyrene	0.15 <sup>[18]</sup>	0.30	2.32	6.7

### 3 结论

对一株能降解多种石油烃同时又能产生生物乳化剂的 Em1 菌株所产的生物乳化剂 ,采用柱层析方法进行分离纯化 ,其表面活性组分主要存在于氯仿、甲醇、浓盐酸混合物( V/V/V = 5 : 1 : 0.01 )的洗脱液中 ,使蒸馏水的表面张力由 72mN/m 降至 30mN/m ,其 CMC 为 75 mg/L。

该生物乳化剂不含糖类、蛋白、中性脂和  $\alpha$ -氨基酸 ,采用红外光谱( IR )、气质联用( GC/MS )和核磁共振( NMR )测定该生物乳化剂的化学组成和结构 ,表明其主要由十六烷酸、脂肪醇类、酯类和脂肪酰胺类

等组成 ,这些物质的协同作用是该生物乳化剂高表面活性的关键。

该生物乳化剂可明显促进菌株对多环芳烃的降解作用 ,可将降解率提高约 20% ,其促进降解的机制主要是提高多环芳烃在水中的溶解度 ,平均可提高约 10 倍的溶解度。

致谢 中国科学院化学研究所唐亚林研究员在样品的红外吸收、气质联用和核磁共振测定及结果的分析方面、中国科学院过程工程研究所刘会洲研究员在表面张力的测定方面给予了很大的帮助 ,在此一并致谢。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Bezalel L, Hadar Y, Fu P P, *et al.* Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorine and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**( 7 ): 2554 – 2559.
- [ 2 ] Moody J D, Freeman J P, Doerge D R, *et al.* Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**( 4 ): 1476 – 1483.
- [ 3 ] Hamme K E, Green B, Gai W Z. Ring fission of anthracene by a eukaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, **88**: 10605 – 10608.
- [ 4 ] Cerniglia C E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 1992, **3**: 351 – 368.
- [ 5 ] Smith M R. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation*, 1990, **1**: 191 – 206.
- [ 6 ] Harvey S, Elashvili I, Valdes J J, *et al.* Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. *Biotechnology*, 1990, **8**( 3 ): 228 – 230.
- [ 7 ] Haferburg D, Hommel R, Claus R, *et al.* Extracellular microbial lipids as biosurfactants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1986, **33**: 53 – 93.
- [ 8 ] Hommel R K. Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. *Biodegradation*, 1990, **1**: 107 – 119.
- [ 9 ] 张翠竹, 张心平, 梁凤来, 等. 一株地衣芽孢杆菌产生的生物表面活性剂. 南开大学学报( 自然科学 ) 2000 **33**( 4 ): 41 – 46.
- [ 10 ] 李习武, 刘志培, 刘双江. 生物乳化剂产生菌及其产乳化剂条件初步研究. 微生物学通报 2003 **30**( 6 ): 39 – 43.
- [ 11 ] Kretschmer A, Bock H, Wagner F. Chemical and physical characterization of interfacial – active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *Appl Environ Microbiol*, 1982, **44**( 4 ): 864 – 870.
- [ 12 ] MacDonald C R, Cooper D G, Zajic J E. Surface-active lipids from *Nocardia erythropolis* grown on hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol*, 1981, **41**( 1 ): 117 – 123.
- [ 13 ] 北京大学化学系有机化学教研室编. 有机化学试验. 北京: 北京大学出版社, 1990 293 – 296.
- [ 14 ] 李建武等, 合编. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994.
- [ 15 ] 陈 坚, 华兆泽, 伦世仪. 生物表面活性剂在环境生物工程中的应用. 环境科学, 1996, **17**( 4 ): 84 – 87.
- [ 16 ] 赵国玺, 编著. 表面活性剂物理化学. 北京: 北京大学出版社, 1984, 86.
- [ 17 ] Mata-Sandoval J C, Karns J, Torrents A. High – performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. *Journal of Chromatography A*, 1999, **864**: 211 – 220.
- [ 18 ] Thibodeaux L J. Environmental Chemodynamics. 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley, 1996.
- [ 19 ] Schwarzenbach R P, Gschwend P M, Imboden D M. Environmental Organic Chemistry. New York: John Wiley, 1993.

## Character of A New Bioemulsifier and Its Influence on Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ( PAHs )

LI Xi-Wu LIU Zhi-Pei\* LIU Shuang-Jiang

( Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China )

**Abstract** : A bioemulsifier was purified by column chromatograph, which was produced by *Rhodococcus ruber* strain Em1 that could degrade various petroleum hydrocarbons. Bioemulsifier exists in the fraction washed by  $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH} - \text{HCl}$  ( V/V/V = 5:1:0.01 ). This bioemulsifier could decrease the surface tension of water from 72 mN/m to about 30 mN/m, the critical micelle concentration ( CMC ) of the bioemulsifier was 75 mg/L. This bioemulsifier did not contain saccharide, protein, neutral fat and  $\alpha$ -amino acid, and it was verified that the cooperation of hexadecanoic acid with fatty alcohol, ester and fatty acyl amine should mainly answer for the surface activity of the bioemulsifier by the results of infrared spectra, gas chromatograph-mass spectra and nuclear magnetic resonance. It was also demonstrated that the bioemulsifier could obviously improve the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons ( PAHs ) by strain Em1 and remarkably increase solubility of PAHs in water, the average increment multiple was about 10.

**Key words** : Petroleum contamination, Biodegradation of PAHs, Bioemulsifier, Cooperation

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development ( 2002AA601150 ); Knowledge Innovation Programs of Chinese Academy of Science ( KSCX2-SW-113 )

\* Corresponding author. Tel: 86-10-62554043; E-mail: liuzhipei@hotmail.com

Received date: 07-23-2003