

强婧, 尹华, 彭辉, 等. 2009 铜绿假单胞菌 S6 分泌的生物表面活性剂特性 [J]. 环境科学学报, 29(1): 102-110

Qiang J Y, Hu Y, Peng H, et al. 2009 Characteristics of a biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 29(1): 102-110

铜绿假单胞菌 S6 分泌的生物表面活性剂特性

强婧, 尹华*, 彭辉, 叶锦韶, 秦华明, 张娜, 何宝燕

暨南大学环境工程系, 广州 510632

收稿日期: 2008-02-01 修回日期: 2008-05-12 录用日期: 2008-09-28

摘要: 研究了 1 株铜绿假单胞菌 S6 (*Pseudomonas aeruginosa* S6) 分泌的生物表面活性剂的理化性质. 该生物表面活性剂的临界胶束浓度为 50 mg L^{-1} , 此时其表面张力为 29.3 mN m^{-1} . pH 值对 S6 产表面活性剂有一定影响, 在中性及弱碱性条件下, S6 长势较好且表面活性剂表面张力较低. 该生物表面活性剂对菲具有非常明显的增溶效应, 使水中菲的溶解度增加了约 23 倍. 原油的加入有利于 S6 产表面活性物质. 与原油的相互作用说明该生物表面活性剂能够乳化原油且维持乳液稳定性于 80% 以上; 原油浓度为 6% ~ 8% 时, 能达到最佳乳化效果. HPLC-ESI-MS 分析检出该生物表面活性剂含有 13 种鼠李糖脂同系物.

关键词: 生物表面活性剂; 铜绿假单胞菌; 菲; 原油; 鼠李糖脂

文章编号: 0253-2468(2009)01-102-09 中图分类号: X172 文献标识码: A

Characteristics of a biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6

QIANG Jing, YIN Hua*, PENG Hui, YE Jinshao, QIN Huaming, ZHANG Na, HE Baoyan

Department of Environmental Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632

Received 1 February 2008; received in revised form 12 May 2008; accepted 28 September 2008

Abstract The physicochemical characteristics of a biosurfactant excreted by *Pseudomonas aeruginosa* S6 were studied. The Critical Micelle Concentration (CMC) of this biosurfactant was 50 mg L^{-1} , while its surface tension was 29.3 mN m^{-1} . The pH affected the production of the biosurfactant. Strain S6 grew well under neutral and alkaline conditions and the surface tension was relatively low in this pH range. The biosurfactant increased the solubility of phenanthrene in water by about 23 times compared with control. Addition of crude petroleum favored the production of surface-active substances. Emulsification experiments indicated that the biosurfactant could effectively emulsify crude petroleum, producing an emulsion with a stability of over 80%. The emulsification efficiency was highest when the concentration of crude petroleum was 6% ~ 8%. HPLC-ESI/MS analysis revealed that this biosurfactant contained 13 rhamnolipid congeners.

Keywords biosurfactant; *Pseudomonas aeruginosa*; phenanthrene; crude petroleum; rhamnolipid

1 引言 (Introduction)

生物表面活性剂是微生物在特定条件下, 在其生长过程中分泌的具有表面活性的代谢产物 (Nitschke et al., 2006; Rodrigues et al., 2006; 尹华等, 2005). 与化学表面活性剂一样, 生物表面活性剂也是两亲分子, 具有明显的表面活性, 能显著降低表面张力和界面张力; 除此之外, 生物表面活性剂还显示出良好的环境兼容性: 无毒、易降解、无二次污染, 且具有用量少等优点 (Nitschke et al., 2006; Costa et al., 2006; Thanomsut et al., 2006;

Batista et al., 2006). 生物表面活性剂的这些特性使其适用于石油的生物降粘、提高原油采收率、石油污染土壤的生物修复等领域; 另外, 生物表面活性剂在食品、化工、医药和农业等方面也逐步得到了广泛的应用.

近年来, 随着各国加快对油气资源的开发利用, 由此导致的石油污染事故频繁发生. 生物修复固然是一种环境友好的石油污染治理方式, 但如何提高石油烃的生物修复效率成为关键问题. 生物表面活性剂由于其既具有独特的两亲结构, 能够使污染物分散、增溶、乳化, 提高污染物与石油降解菌的

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 50578070)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 50578070)

作者简介: 强婧 (1984—), 女, E-mail: qjing1984@yahoo.cn * 通讯作者 (责任作者), E-mail: ohjg@jnu.edu.cn

Biography: QIANG Jing (1984—), female, E-mail: qjing1984@yahoo.cn * Corresponding author, E-mail: ohjg@jnu.edu.cn

接触面,进而提高污染物的生物可利用性,促使污染物尽快生物降解;同时,又由于它所具有的优于化学表面活性剂的环境友好性,使其在难溶有机污染物的生物修复方面发挥着越来越重要的作用(Ron *et al.*, 2002; Bordas *et al.*, 2005; 陈来国等, 2004).

微生物产生的表面活性剂包括糖脂、脂肽、多糖-脂类复合物、磷脂、脂肪酸和中性脂等不同种类(Nitschke *et al.*, 2006). 本研究对从含油废水中筛选出的1株铜绿假单胞菌 S6 (*Pseudomonas aeruginosa* S6)分泌的鼠李糖脂表面活性剂的理化特性进行研究,在此基础上特别针对石油烃中所含的三环 PAHs 菲,探讨了该生物表面活性剂对其的增溶作用.与此同时,利用高效液相色谱-电喷雾离子化质谱(HPLC-ESI/MS)具有的能够有效分析结构相近复杂混合物的优势,对生物表面活性剂中性质相似的组分进行分离和鉴定,较全面地分析其中的化学成分,以期生物表面活性剂在石油污染水体生物修复中的应用进一步提供科学依据.

2 材料和方法 (Materials and methods)

2.1 实验菌种

铜绿假单胞菌 S6由本课题组筛选、保藏(贾燕等, 2007).

2.2 实验材料

葡萄糖、 CH_2Cl_2 购自广州化学试剂厂;蛋白胨购自广东环凯生物科技有限公司;酵母粉购自浙江杭富生物制品厂;原油由中国石油化工股份有限公司广州分公司提供;菲购自 Sigma-Aldrich 公司,纯度 > 97%.

2.3 培养基及培养条件

营养培养基:葡萄糖 5g 蛋白胨 2g 酵母粉 1g 水 1000mL, pH = 7.5 培养条件:将斜面保存的菌株接种至营养培养基中, 30°C、165 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下振荡培养.

2.4 S6生长量的测定

取不同时间培养得到的铜绿假单胞菌培养液,于 600nm 处测定吸光度;同时将培养液置于 4°C、12500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10min,取上清液测定吸光度,以二者之差表示菌体的生长量(Lee *et al.*, 2003).

2.5 表面张力测定

将培养液在 4°C、12500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10min,采用 JZHY-180型界面张力仪测定上清液表面张力.

2.6 表面活性物质的分离和纯化

粗提:将培养液在 12500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 30min 去除菌体,上清液用 6mol/L 的盐酸调节 pH 为 2.0 加入等体积乙酸乙酯萃取 2次,合并有机相,用无水 Na_2SO_4 干燥, 40°C 下旋转蒸发浓缩得到绿色浆状物,为表面活性剂粗产品.

精提:将粗品溶于 0.05mol/L 的 NaHCO_3 溶液,过滤后,用盐酸调 pH 为 2.0 4°C 下放置 24h,再在 12500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 15min,去掉上清液,干燥得表面活性剂纯品.称量并计算纯品产率.通过以上 2 步得到生物表面活性剂纯品产量为 0.420 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.7 临界胶束浓度 (CMC) 测定

将表面活性剂纯品配成不同质量浓度的溶液,测定其表面张力,同一浓度平行测定 3次,取其平均值,用浓度对表面张力作图.

2.8 S6生长周期及其表面张力

在不同时间取样,按 2.4.2.5 节所述方法测定吸光度和表面张力.

2.9 不同环境因素对 S6生长和培养液性能的影响

分别考察 pH 值、温度、NaCl 浓度、无机盐离子以及原油的加入对 S6生长和培养液性能的影响.

2.10 生物表面活性剂增溶、乳化性能测试

2.10.1 对菲的增溶作用 配置浓度分别为 0、28.90、50.58、80.92、101.15、168.58 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的表面活性剂溶液,每个浓度 2个平行,以去离子水为对照.取约 0.006g 菲于 10mL 上述表面活性剂溶液中,超声溶解 2h,摇床振荡 24h, 4°C、12500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 30min,取 5mL 上清液,调其 pH 为 2.0,用等体积 CH_2Cl_2 萃取 2次,合并有机相,无水 Na_2SO_4 干燥,浓缩定容至 1mL,以 GC 测定菲的含量(Bordas *et al.*, 2005; Viamajala *et al.*, 2007).

GC 分析条件:上海天美 GC-D790Q 检测器为 FID.毛细管色谱柱 SE-54(30m × 0.25mm);液膜厚度:0.50 μm .进样口温度:250°C;检测器温度:300°C;柱箱温度(程序升温):70°C (1min) → 280°C (升温速率为 35°C $\cdot \text{min}^{-1}$,保持 4min).载气: N_2 ;流速:2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱前压:93.1kPa N_2 输入压力:299.9kPa 采用分流模式,“隔膜清扫”时间为 0.7min,进样量:1 μL .

菲标准曲线绘制:配置浓度为 0.2、4、10、16、20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的菲标准溶液,按以上方法用 GC 测定,以峰面积对浓度作图得到标准曲线.

萃取方法回收率检验:取一定量的菲加入表面

活性剂溶液中,使其终浓度为 1、10、100 mg L⁻¹,每个浓度 3 个平行.用 CH₂Cl₂萃取后 GC 分析.

2.10.2 对原油的乳化能力 取 10 mL 去菌体的 S6 培养液置于玻璃管中,加入一定量原油,使原油浓度分别为 4%、6%、8%、10%、15%、20%,剧烈震荡,充分乳化.每隔 30 min 观察乳化层高度,计算乳化能力,公式如下:

$$E = h_0/h \times 100\% \quad (1)$$

式中, E 为乳化能力, h_0 、 h 分别为乳化层高度与总高度 (cm).

2.11 生物表面活性剂组分分析

本课题组之前的研究结果表明, S6 产的表面活性剂为糖脂类物质 (贾燕等, 2007). 有资料显示, 铜绿假单胞菌产生的表面活性剂为鼠李糖脂 (Mulligan, 2005; Wu et al., 2008; Wei et al., 2005), 其亲水基团一般由 1~2 分子的鼠李糖构成, 憎水基团则由 1~2 分子具有不同碳链长度的脂肪酸构成 (Morkawa et al., 2000). 在生物合成过程中, 这些基团之间可能相互链接生成多种化学结构相近的同系物. 由于这些同系物性质十分相似, 传统的分离方法很难将各个组分分开. 而高效液相色谱-电喷雾离子化质谱 (HPLC-ESI/MS) 集分离和鉴定为一体, 分辨率高, 分析速度快, 可有效分析结构相近的复杂混合物. 因此, 本研究中采用这种方法分析表面活性剂组分.

按 2.6 节所述提取表面活性剂, 但方法略有变动. 在精提阶段, 将粗品溶于去离子水, 过滤后, 用盐酸调 pH 为 2.0, 4℃ 下静置过夜, 离心收集沉淀, 溶于乙腈/水 (1:1, V/V) 混合溶剂中, 离心并过滤后, 利用 HPLC-ESI/MS 分析表面活性剂的组分.

分析方法: 仪器为美国 Agilent 公司高效液相色谱-电喷雾质谱联用仪. 质谱仪为 AB 公司生产, 4000QTARP, 配以 Eclipse Plus C18 反相键合色谱柱 (150 mm × 2.1 mm × 5 μm).

液相色谱条件: 进样量 5 μL, 分流进样, 分流比为 1:4, 流动相为乙腈-水, 采用线性梯度洗脱, 流速: 250 μL · min⁻¹. 梯度洗脱程序见表 1.

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 The program of gradient elution for HPLC-ESI/MS

流动相	不同时间时的流动相体积分数				
	0 min	30 min	65 min	65 min	95 min
水	75%	50%	10%	75%	75%
乙腈	25%	50%	90%	25%	25%

质谱条件: 采用负离子电离, 雾化气和干燥气都为 N₂, 碰撞电压: -70V; 喷雾电压: -4.5 kV; 温度: 400℃; 柱后流出物导入离子源速率: 5 μL · min⁻¹; 质谱扫描质量数范围: 200~1000 m/z. 各组分质量分数的确定采用面积归一化法.

3 结果 (Results)

3.1 临界胶束浓度 CMC

CMC 可作为表面活性剂表面活性的一种量度, 其值越小, 表明此种表面活性剂形成胶团所需浓度越低, 达到表 (界) 面饱和和吸附的浓度就越低. 当表面活性剂的浓度达到 CMC 时, 表面张力最低. 此时, 再提高其浓度, 表面张力不会再下降而是大量形成胶团. 从不同浓度表面活性剂的表面张力变化曲线 (图 1) 求得该生物表面活性剂的 CMC 为 50 mg L⁻¹, 在表面活性剂浓度达到 CMC 时的表面张力为 29.3 mN · m⁻¹. 该表面活性剂的 CMC 值远远低于十二烷基硫酸钠 (SDS), 后者的 CMC 高达 2100 mg L⁻¹ (陈静等, 2006). 由此可见, 该生物表面活性剂的 CMC 比化学表面活性剂低, 从而使其具有更加优越的表面活性.

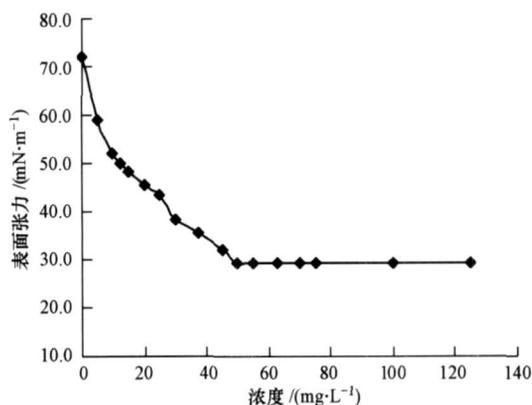


图 1 表面张力随浓度的变化

Fig. 1 Surface tension vs. concentration of pure biosurfactant

3.2 S6 生长周期及其表面张力

图 2 结果显示, 生物表面活性物质的分泌与菌体的生长同步. 由图 2 可知, 从 0~25 h OD₆₀₀ 值随培养时间的延长而迅速上升, 此时 S6 处于对数生长期, 其细胞代谢活性最强、生长快速, 因此, 培养液的表面张力下降很快. 在 24~32 h 时间段, OD₆₀₀ 值较为平稳, 变化不大, 此时 S6 处于稳定期, 表面张力保持稳定且表面活性最佳. 之后, 培养液 OD₆₀₀ 值呈现出逐渐下降的趋势, 此时对应的表面张力也缓慢上升. 这是因为在此时间段 (36~84 h) 菌株开始进

入衰亡期, 细胞死亡率提高; 另外, 由于此时培养液中营养消耗殆尽, 菌株开始利用自身分泌物, 即生物表面活性剂, 作为养料维持生命, 使得培养液表面活性降低, 从而表现为表面张力的升高. 图中反应出 30h 左右培养液的 OD₆₀₀ 值最大, 此时菌体正处于稳定期, 其生长最为旺盛, 同时, 培养液表面张力最小. 因此, 在以后的实验中, 将培养时间都定为 30h 左右.

另外, 从图 2 还可以发现, 培养液表面张力在 15h 之后保持稳定. 产生这种情况的原因在于此时培养液中生物表面活性剂的浓度已经接近甚至超过其临界胶束浓度; 此后, 表面活性剂浓度的继续增加不会引起表面张力的变化, 因此, 表面张力在 15h 后保持稳定.

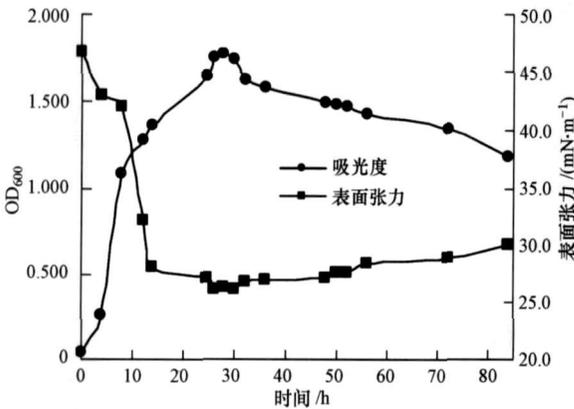


图 2 S6 生长与产表面活性剂的关系

Fig 2 Relationship between the growth of strain S6 and production of biosurfactant

3.3 不同环境因素对 S6 生长的影响

3.3.1 pH 值的影响 设置培养液 pH 值分别为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 在 30℃、165 r min⁻¹ 条件下振荡培养 30h, 取样测 OD₆₀₀、表面张力以及培养液 4 倍稀释液表面张力. 结果如图 3 所示.

在 pH 小于 5 的情况下, S6 无法生长; pH 在 5~7 范围内, 菌液的吸光度逐渐上升, 说明 S6 生长状况逐渐转好; 当 pH 大于 7 时, 吸光度又逐渐下降, 但均高于 pH = 5 时的吸光度值. 在培养过程中, 发现在 pH 为 10、11、12、13、14 的培养液中, 菌液的颜色为褐色; 在其它适于 S6 生长的培养液中, 菌液呈墨绿色. 表面张力方面, 原液表面张力从 pH = 5 开始逐渐下降, 在 pH 为 7、8、9、10 时表面张力达到最低值, 之后又开始上升, 但总体变化程度不高. 4

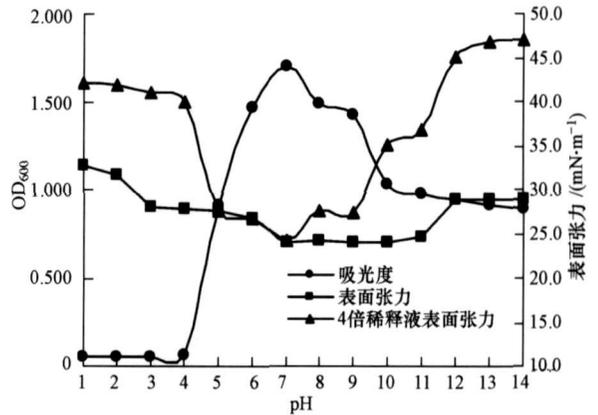


图 3 pH 值对 S6 生长及培养液表面张力的影响

Fig 3 OD₆₀₀ and surface tension vs pH

倍稀释液表面张力变化更加明显: pH 为 10~14 时, 稀释液表面张力均大大高于原液, 说明高碱性条件下 S6 所产的表面活性剂的浓度发生了变化.

上述现象的出现与微生物生长环境中 H⁺ 浓度有关. 环境 H⁺ 会引起细胞膜电荷的变化, 从而影响微生物对营养物质的吸收; 同时, H⁺ 会影响代谢过程中酶的活性, 有些在细菌生命活动中起催化作用的酶在酸性条件下会失活; 另外, pH 会改变营养物质离子化程度. 介质的 pH 不仅影响微生物的生长, 甚至影响微生物的形态. 微生物细胞中很多组分 DNA、ATP 等在强酸性条件下会被破坏. 因此, 过低的 pH 使得菌株无法生长 (马文漪等, 1996).

另外, 虽然 S6 能在强碱性条件下生长, 但此时培养液的颜色、表面张力发生了较大变化. 原因可能是同一种微生物由于培养液 pH 不同, 会积累不同的代谢产物, 故培养液表现出不同的性状.

由以上结果可知, S6 在极酸的条件下不生长; 在中性和弱碱性条件下长势较好; 在强碱条件下生长状态发生改变. 因此, 选择培养基 pH 为 7.5 是合适的.

3.3.2 温度的影响 控制培养温度分别为 30℃、32℃、34℃、36℃、40℃, 在 165 r min⁻¹ 条件下振荡培养 30h, 取样测 OD₆₀₀、表面张力以及培养液 4 倍稀释液表面张力, 结果如图 4 所示.

由图 4 可以看出, 随培养温度的升高, OD₆₀₀ 值逐渐下降, 说明 S6 的生长量逐渐降低. 30℃ 时, S6 生长量达到最高. 观察图 4 可发现, 在 30~40℃ 范围内, 虽然菌体生长量逐渐下降, 但变化幅度很小, 表明 S6 对该温度范围有很好的适应性.

同时, 观察表面张力的变化可见, 表面张力在

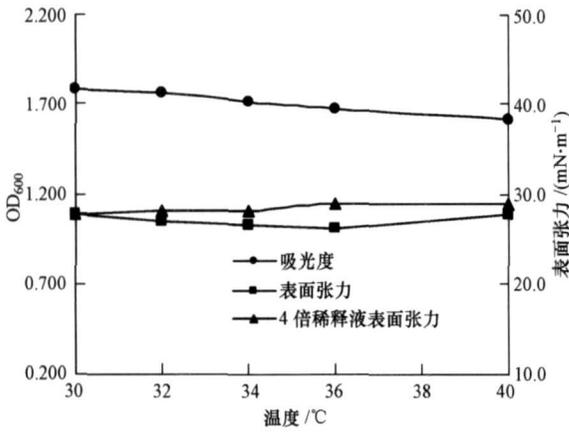


图 4 温度对 S6 生长及培养液表面张力的影响
Fig 4 OD₆₀₀ and surface tension vs. temperature

30~40°C的范围内处于比较稳定的状态; 4倍稀释液的表面张力仅略有上升, 影响幅度不大. 因此, 可以推知, S6产生的表面活性剂在该温度范围内能保持良好的活性.

3.3.3 NaCl浓度的影响 调节培养液不同的 NaCl 浓度, 分别为 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 g·L⁻¹, 在 30°C、165 r·min⁻¹ 条件下振荡培养 30h 取样测 OD₆₀₀、表面张力以及培养液 4倍稀释液的表面张力, 结果如图 5 所示.

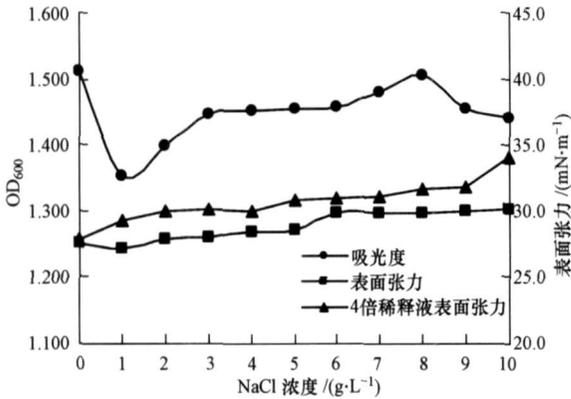


图 5 NaCl 浓度对 S6 生长及培养液表面张力的影响
Fig 5 OD₆₀₀ and surface tension vs. concentration of NaCl

由图 5 可知, 在培养液添加 NaCl 后, S6 的生长量低于不加 NaCl 的对照组; 而培养液表面张力较对照组略有上升. NaCl 主要影响微生物生长环境的渗透压, 微生物的生活环境必须具有与其细胞相适应的渗透压, 不同的渗透压对微生物有不同的影响. 在等渗溶液中, 即细胞内溶质浓度与胞外溶液的溶质浓度相等时, 微生物保持原形, 生命活动最好. 一

般等渗溶液中 NaCl 浓度为 0.85%. 图 5 的曲线中, 在 NaCl 浓度为 8 g·L⁻¹ 时, 生长量最高; 这是因为此时培养液基本上是等渗溶液, 菌体在这种条件下生长最佳. 另外, 在高渗溶液中, 即细胞外溶液溶质浓度大于细胞内溶质浓度时, 微生物细胞就会脱水, 发生质壁分离, 甚至死亡 (周群英等, 2000). 一般高渗溶液中 NaCl 浓度为 5% ~ 30%. 在本实验中, NaCl 浓度最多仅为 10 g·L⁻¹, 即 1%, 在这种情况下, NaCl 浓度的改变对菌体生长没有太大的影响. 在低渗溶液中, 即微生物细胞内溶质浓度大于细胞外环境中溶质浓度时, 微生物细胞会吸水膨胀, 甚至破裂.

3.3.4 无机盐离子的影响 主要考察 2 种无机盐离子 (Mg²⁺、Ca²⁺) 对 S6 生长的影响. 分别设置培养液 MgCl₂ 浓度为 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 g·L⁻¹; CaCl₂ 浓度为 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35 g·L⁻¹. 在 30°C、165 r·min⁻¹ 条件下振荡培养 30h 取样测 OD₆₀₀、表面张力以及培养液 4倍稀释液的表面张力, 结果如图 6 所示.

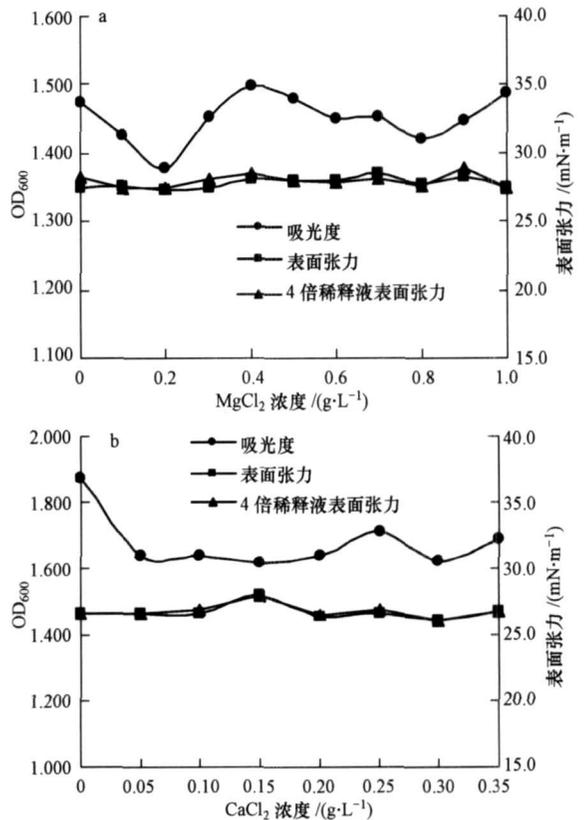


图 6 无机盐浓度对 S6 生长及培养液表面张力的影响 (a MgCl₂, b CaCl₂)

Fig 6 OD₆₀₀ and surface tension vs. concentration of MgCl₂ and CaCl₂

由图 6a可以看出,在所设置的 $MgCl_2$ 浓度范围内, S6均能够较好地生长并产表面活性剂; 其中, $MgCl_2$ 浓度为 $0.4g \cdot L^{-1}$ 和 $1g \cdot L^{-1}$ 时, S6生长最好; 而 $MgCl_2$ 浓度对培养液表面活性影响不大. 这说明, S6能够很好地适应 Mg^{2+} 存在的环境.

图 6b显示了 S6受培养液中 $CaCl_2$ 浓度变化影响的情况. 当培养基中添加了 $CaCl_2$ 后, 菌体的生长量明显低于不添加 $CaCl_2$ 的对照组, 说明 Ca^{2+} 对 S6 的生长有较大的影响. 除了生长量的影响外, 在实验过程中还发现, 添加了 $CaCl_2$ 的培养液的颜色明显不同于对照组. 含有 $CaCl_2$ 的培养液呈现极深的暗绿色, 不含 $CaCl_2$ 的为正常的墨绿色. 虽然 Ca^{2+} 对 S6 的生长有较大影响, 但培养液的表面张力变化幅度较小; 并且原液与 4倍稀释液的表面张力曲线几乎完全重合, 说明添加 Ca^{2+} 不会影响菌体产表面活性剂的性能, 初步证明了菌体在这个 Ca^{2+} 浓度范围内基本上能产相同浓度的表面活性剂.

$NaCl$ 、 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 这 3种物质对 S6生长及培养液的影响都可以归结为渗透压的影响. 比较图 5、图 6可知: S6能够适应一定的渗透压环境, 在此环境中生长并产表面活性剂, 且表面活性剂的性质基本不受渗透压的影响. 其中, 在菌体生长量方面, $CaCl_2$ 对 S6 的影响比 $NaCl$ 、 $MgCl_2$ 的影响稍明显; 而在培养液表面张力方面, $NaCl$ 的影响更大. 另外, 在实验中, $NaCl$ 、 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 这 3种物质的浓度是根据海水盐度范围来选取的. 所选择的 $NaCl$ 、 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 浓度与海水中的浓度基本一致. 因此可以推断, S6 能够适应海水盐度. 这就为生物表面活性剂用于处理近海石油污染提供了可借鉴的实验基础.

3.3.5 原油的加入对培养液表面活性的影响 S6 培养 48h后, 培养液排油直径达到 100mm, 此时无菌条件下加入原油 (在液体中的浓度为 $30g \cdot L^{-1}$) 振荡培养, 以不加原油的培养液为对照, 每隔 30min测一次排油直径, 结果如图 7所示.

由图 7可以看出, 与对照组相比, 在加入了原油的培养液中, 排油直径的变化幅度较小且排油直径较大. 在 1h时二者的排油直径基本一致; 1h之后, 加入原油的培养液的排油直径减小幅度缓慢, 最低为 93mm (3.5h); 而对照组排油直径的减小则较为明显, 一度低至 82mm (3.5h左右). 这说明, 在原油体系中 S6以原油作为碳源, 营养得到补充, 继续产生表面活性物质, 弥补了葡萄糖的消耗给表面活性剂带来的负面影响; 对照组中葡萄糖被耗尽, 缺少新

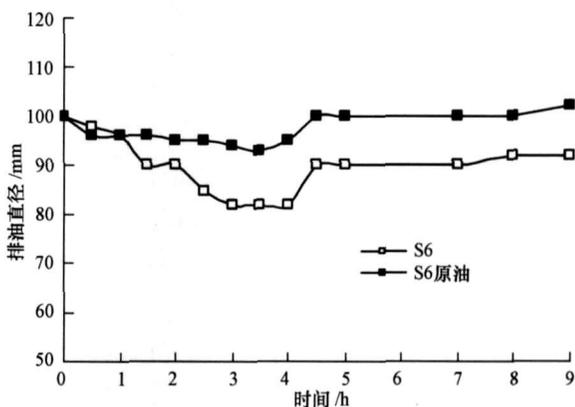


图 7 加入原油对培养液表面活性的影响

Fig 7 Effect of crude petroleum addition on surface activity

的碳源, 菌株利用生物表面活性剂本身为碳源生长, 因此, 其表面活性持续降低. 从 4h开始二者的排油直径开始回升, 但从图 7可明显看出在加了原油的体系中, 排油直径始终大于对照组, 并且其最高值达到 102mm (9h); 相比之下, 对照组的排油直径最高仅为 92mm. 由此可以证明, S6可利用原油为碳源生长, 并且 S6在原油的刺激下可以更好地产表面活性物质.

3.4 生物表面活性剂增溶、乳化性能测试结果

3.4.1 增溶实验结果 菲是石油烃所含组分多环芳烃 (PAHs) 中的一种, 在水中的溶解度很低 ($6.6 \times 10^{-6} mol \cdot L^{-1}$), $lgK_{ow} = 4.46$ 难以生物降解 (Shin *et al.*, 2006), 属于持久性有机污染物. 本研究中选择菲作为 PAHs 的代表物, 考察 S6 所产的表面活性剂对菲的增溶作用. 萃取方法的回收率为 71.16% ~ 88.50%.

从图 8可以看出, 无论在 CMC (该表面活性剂的 $CMC = 50mg \cdot L^{-1}$) 以下或以上, 表面活性剂对菲

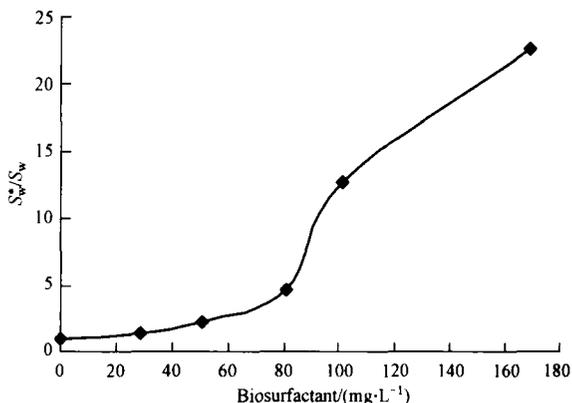


图 8 生物表面活性剂对菲的增溶作用

Fig 8 Solubilization of phenanthrene by biosurfactant

都有增溶作用;但在 CMC 以上,增溶作用显著.这是因为,当溶液中表面活性剂浓度低于 CMC 时,表面活性剂分子以单体形式存在,单分子的表面活性剂对被增溶物的分配作用很弱,因此,菲在水中的溶解度不大或只有轻微增加.而当表面活性剂浓度大于 50mg L^{-1} 时,菲的溶解度增大速度加快.这是由于浓度大于 CMC 时,表面活性剂大量形成胶束,胶束通过提供一个微观的疏水环境使原来不溶或微溶于水的有机物溶解于胶束中,胶束内的疏水性微环境对疏水性有机溶质具有较强的分配作用,可显著增大菲的表观溶解度(余海粟等, 2004). 这种情况也表明了生物表面活性剂对菲的增溶作用主要归因于表面活性剂形成胶束.

龙涛等研究了非离子型表面活性剂吐温 80 对菲的增溶作用(龙涛等, 2003); 研究结果表明,在浓度为 2000mg L^{-1} 的吐温 80 溶液中,菲的溶解度增大了 19.2 倍.在杨建刚等的研究中,当非离子型表面活性剂 Tween20 浓度为 2000mg L^{-1} 时,菲的溶解度增大了 12.9 倍(杨建刚等, 2004). 而本研究中,在生物表面活性剂浓度处于 170mg L^{-1} 时,菲的溶解度增大了 20 倍以上.这表明,在一定程度上生物表面活性剂有优于化学表面活性剂的性能.

3.4.2 生物表面活性剂对原油的乳化能力 测定结果如图 9 所示.由图 9 可以看出,对于不同的油浓度,生物表面活性剂对其产生的乳化能力随时间的变化具有一致性:在短时间内,乳化能力比较稳定;随时间的延长,乳化能力有所下降,但最终都稳定在某一数值.从图中可以得知, S6 产生的生物表面活性剂对原油具有很好的乳化作用;经过一定时间

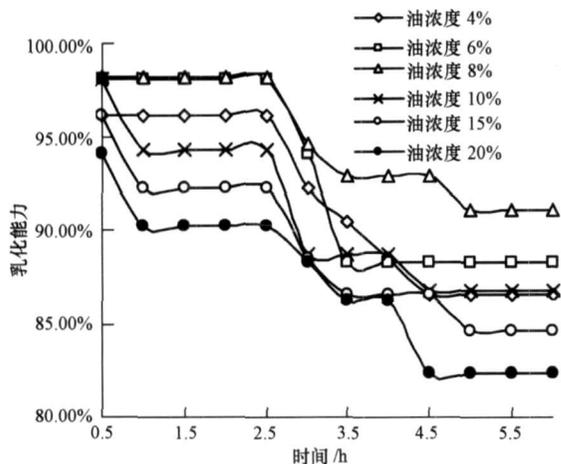


图 9 表面活性剂乳化能力

Fig. 9 Emulsification efficiency of crude petroleum by biosurfactant

后,乳化能力可以维持在 80% 以上.

另外,由图 9 可知,在油浓度为 8% 时,乳化能力最佳(最终稳定在 90% 以上);在油浓度小于 8% 的范围内,乳化能力随油浓度的提高而增强;但当油浓度大于 8% 时,乳化能力随油浓度的升高呈现出逐渐下降的趋势,但是都稳定在 80% 以上.这组实验结果显示,油浓度在 6% ~ 8% 之间时能得到很好的乳化效果.

3.5 生物表面活性剂组分分析结果

按照 2.11 节所述方法进行实验.图 10 是铜绿假单胞菌 S6 所产鼠李糖脂的 HPLC-ESI/MS 分析的总离子流图.各组分的保留时间、分子离子峰、相对丰度如表 2 所示.

表 2 S6 所产鼠李糖脂同系物中各组分的结构及相对丰度
Table 2 Structures and relative abundances of rhamnolipid congeners produced by strain S6

鼠李糖脂结构	保留时间 /min	分子离子 (m/z)	相对丰度
Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀	31.69	621.7	3.2964%
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈	32.76	621.7	0.6339%
Rha-C ₈ -C ₁₀	36.93	475.4	10.5793%
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	39.56	649.5	8.5053%
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12.1}	43.12	675.8	14.6753%
Rha-Rha-C _{12.1} -C ₁₀	44.17	675.8	0.8068%
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	45.99	503.3	10.8519%
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	47.71	677.8	4.6648%
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₀	48.97	677.8	1.6101%
Rha-C ₁₀ -C _{12.1}	51.63	529.6	5.1886%
Rha-C _{12.1} -C ₁₀	52.87	529.6	13.4312%
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	55.82	531.7	3.1618%
Rha-C ₁₂ -C ₁₀	57.45	531.7	0.6005%

注: Rha 表示一个鼠李糖分子; C_n 表示一个碳链长度为 n 的烷基脂肪酸分子; C_n 表示一个碳链长度为 n 的含一个不饱和键的烷基脂肪酸分子.

由表 2 可以看出, S6 所产的生物表面活性剂中至少含有 13 种鼠李糖脂同系物,均由 1~2 分子的鼠李糖和 1~2 个碳链长度为 8~12 的脂肪酸组成.其中,含量最高的 4 种组分分别为 Rha-Rha-C₁₀-C_{12.1}、Rha-C_{12.1}-C₁₀、Rha-C₁₀-C₁₀ 和 Rha-C₈-C₁₀,其含量分别为 14.6753%、13.4312%、10.8619% 和 10.5793%.另外,在 13 种同系物中,有 4 种组分含不饱和脂肪酸,含不饱和脂肪酸组分的总含量达 30.77%.梁生康等(2005)在对假单胞菌产生的生物表面活性剂的组分进行分析时,发现表面活性剂中有 21 种鼠李糖脂同系物;其中不饱和脂肪酸组分

含量为 52.38%。这与本实验结果不尽相同。鼠李糖脂组分及不饱和脂肪酸含量的不同,一方面是由于生物表面活性剂产生菌不同,培养条件不同;另一方面也有可能是分析方法有差别,从而导致了产物组成的差异。然而,尽管鼠李糖脂组分及脂肪酸含

量不同,生物表面活性剂本身的理化性质差别却不大。在梁生康等的研究中,鼠李糖脂溶液能将水的表面张力降低至 $28.6 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$,这与本研究的结果 ($29.3 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) 非常接近。

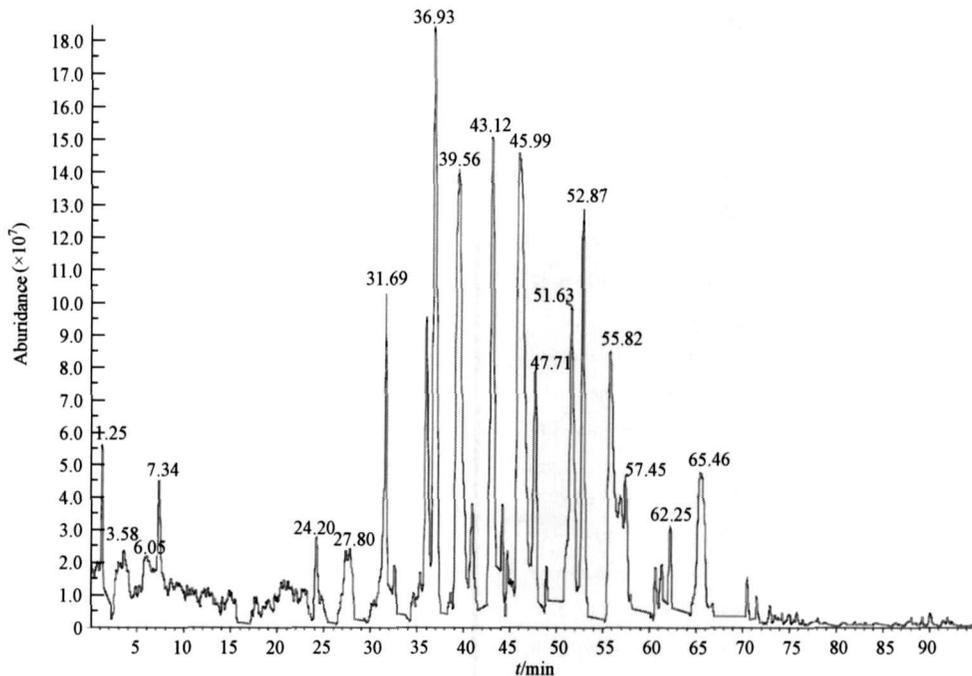


图 10 S6所产鼠李糖脂同系物 HPLC-ESI/MS 分析总离子流图

Fig 10 TIC spectra of rhamnolipid congeners produced by strain S6 as analyzed by HPLC-ESI/MS

4 结论 (Conclusions)

1) 铜绿假单胞菌 S6 产生的表面活性剂的 CMC 为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 此时表面张力为 $29.3 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 。

2) pH 对 S6 的生长及培养液表面活性有较大影响, 在中性和弱碱性时生长较好。在 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 范围内, S6 均能正常生长且其分泌的表面活性剂在该温度范围内能保持良好的活性。培养液 NaCl 、 MgCl_2 、 CaCl_2 浓度对 S6 的生长有一定程度的影响, 但对其分泌的生物表面活性剂的性质无明显影响。S6 能以原油为碳源生长并产生生物表面活性剂, 且原油能更好地刺激菌株产表面活性物质。

3) 该生物表面活性剂对菲具有良好的增溶性; 在 CMC ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 以上, 增溶效果更为显著。同时, 其对原油具有良好的乳化能力, 且维持乳液稳定性于 80% 以上; 油浓度为 6% ~ 8% 时, 能达到最佳乳化效果。

4) HPLC-ESI/MS 分析显示, 该表面活性剂结构中含有 13 种鼠李糖脂同系物, 其中含量最多的 4 种

组分为 Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ 1、Rha-C₁₂ 1-C₁₀、Rha-C₁₀-C₁₀ 和 Rha-C₈-C₁₀。

责任作者简介: 尹华 (1960—), 女, 博士, 教授, 主要研究方向: 水污染控制理论与技术。联系电话: 020-85220564, E-mail: ohjg@jnu.edu.cn

参考文献 (References):

- Batista S B, Mounteer A H, Amorim F R, *et al*. 2006. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites [J]. *Bioresource Technology*, 97 (6): 868-875
- Bordas F, Lafrance P, Villmur R. 2005. Conditions for effective removal of pyrene from an artificially contaminated soil using *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ rhamnolipids [J]. *Environmental Pollution*, 138 (1): 69-76
- 陈来国, 冉勇. 2004. 多环芳烃生物修复中的表面活性剂 [J]. *生态环境*, 13 (1): 88-91
- Chen L G, Ran Y. 2004. Surfactants in the bioremediation of PAHs [J]. *Ecology and Environment* 13 (1): 88-91 (in Chinese)
- 陈静, 王学军, 胡俊栋, 等. 2006. 表面活性剂对白腐真菌降解多环芳烃的影响 [J]. *环境科学*, 27 (1): 154-159

- Chen J, Wang X J, Hu J D, *et al*. 2006. Effect of surfactant on biodegradation of PAHs by White-Rot Fungi [J]. *Environmental Science* 27 (1): 154-159 (in Chinese)
- Costa S G, Nitschke M, Haddad R, *et al*. 2006. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils [J]. *Process Biochemistry*, 41 (2): 483-488
- 贾燕, 尹华, 彭辉, 等. 2007. 一株生物表面活性剂产生菌的筛选及其特性研究 [J]. *微生物学通报*, 34(6): 1066-1070
- Jia Y, Yin H, Peng H, *et al*. 2007. Isolation and characteristics of biosurfactant-producing microorganism [J]. *Microbiology*, 34 (6): 1066-1070 (in Chinese)
- Lee K, Park J W, Ahn I S. 2003. Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7 [J]. *Journal of Hazardous Materials* 105 (1-3): 157-167
- 梁生康, 王修林, 陆金仁, 等. 2005. 假单胞菌 O-2-2 产鼠李糖脂的结构表征及理化性质 [J]. *精细化工*, 22(7): 499-502
- Liang S K, Wang X L, Lu J R, *et al*. 2005. Structure characterization and physico-chemical properties of rhamnolipid produced by *Pseudomonas* O-2-2 [J]. *Fine Chemical* 22 (7): 499-502 (in Chinese)
- 龙涛, 刘翔, 杨建刚, 等. 2003. 非离子型表面活性剂吐温 80 增溶条件下菲的生物降解 [J]. *环境污染治理技术与设备*, 4(5): 1-4
- Long T, Liu X, Yang J G, *et al*. 2003. Study on biodegradation of phenanthrene enhanced by nonionic surfactant Tween-80 [J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control* 4 (5): 1-4 (in Chinese)
- 马文漪, 杨柳燕. 1996. *环境微生物工程* [M]. 南京: 南京大学出版社, 40-42
- Ma W Y, Yang L Y. 1996. *Engineering of Environmental Microbiology* [M]. Nanjing: Nanjing University Press, 40-42 (in Chinese)
- Mulligan C N. 2005. Environmental applications for biosurfactants [J]. *Environmental Pollution*, 133 (2): 183-198
- Morkawa M, Hirata Y, Inanaka T. 2000. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants [J]. *Biochimica et Biophysica Acta* 1488 (3): 211-218
- Nitschke M, Pastier G M. 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater [J]. *Bioresource Technology* 97 (2): 336-341
- Rodrigues L R, Teixeira J A, Mei H C, *et al*. 2006. Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus* A [J]. *Colloids and Surfaces (B: Biointerfaces)*, 53 (1): 105-112
- Ron Z E, Rosenberg E. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation [J]. *Environmental Biotechnology* 13 (3): 249-252
- Shin K H, Kim K W, Ahn Y. 2006. Use of biosurfactant to remediate phenanthrene-contaminated soil by the combined solubilization-biodegradation process [J]. *Journal of Hazardous Materials* 137 (3): 1831-1837
- Thanomsu B, Puneechockchai W, Limtrakul A, *et al*. 2006. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste [J]. *Bioresource Technology*, 97 (18): 2457-2461
- Vimajala S, Peyton B M, Richards L A, *et al*. 2007. Solubilization solution equilibria and biodegradation of PAH's under thermophilic conditions [J]. *Chemosphere*, 66 (6): 1094-1106
- Wei Y H, Chou C L, Chang J S. 2005. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater [J]. *Biochemical Engineering Journal* 27 (2): 146-154
- Wu J Y, Yeh K L, Lu W B, *et al*. 2008. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site [J]. *Bioresource Technology*, 99 (5): 1157-1164
- 杨建刚, 刘翔, 余刚, 等. 2004. 非离子表面活性剂 Tween20 对菲生物降解的影响 [J]. *环境科学*, 25(1): 53-56
- Yang J G, Liu X, Yu G, *et al*. 2004. The influence on the biodegradation of phenanthrene by nonionic surfactant tween20 [J]. *Environmental Science* 25 (1): 53-56 (in Chinese)
- 尹华, 谢丹平, 彭辉, 等. 2005. 假单胞菌 XD-1 (*Pseudomonas* XD-1) 的产表面活性剂性能研究 [J]. *环境科学学报*, 25(2): 220-225
- Yin H, Xie D P, Peng H, *et al*. 2005. Study on the *Pseudomonas* XD-1 releasing biosurfactants [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae* 25 (2): 220-225 (in Chinese)
- 余海粟, 朱利中. 2004. 混合表面活性剂对菲和芘的增溶作用 [J]. *环境化学*, 23(5): 485-489
- Yu H S, Zhu L Z. 2004. Water solubility enhancement of phenanthrene and pyrene by mixed anionic-nonionic surfactant solutions [J]. *Environmental Chemistry* 23 (5): 485-489 (in Chinese)
- 周群英, 高廷耀. 2000. *环境工程微生物学* [M]. 北京: 高等教育出版社, 131-132
- Zhou Q Y, Gao T Y. 2000. *Microbiology of Environmental Engineering* [M]. Beijing: Higher Education Press, 131-132 (in Chinese)