

鼠李糖脂与疏水底物及其降解菌的相互作用

姜萍萍¹, 郭楚玲^{1,2,3*}, 党志^{1,2}, 卢桂宁¹, 易筱筠^{1,2}, 杨琛^{1,2}

(1. 华南理工大学环境科学与工程学院, 广州 510006; 2. 工业聚集区污染控制与生态修复教育部重点实验室, 广州 510006; 3. 污染控制与生态修复广东省普通高等学校重点实验室, 广州 510006)

摘要:通过鼠李糖脂对假单胞菌 GP3A 菌株降解芘的增溶和降解实验,研究了在鼠李糖脂作用下,菌体细胞表面疏水性和脂多糖含量的变化、菌体表面基团与生物表面活性剂分子的键合作用以及相应疏水底物的增溶和降解。结果表明,当鼠李糖脂浓度高于其临界胶束浓度($60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时,能显著增加疏水底物芘的表观溶解度;生物表面活性剂能通过溶出细胞壁的成分脂多糖,来增加菌体表面疏水性;当细胞表面疏水性由 12% 增大到 55% 时,菌体 6 d 的生物量由 $4.4 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 增大到 $1.2 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,芘的生物降解率由 16% 增大到 44%;生物表面活性剂也能与菌体形成氢键,有利于菌体与底物的亲和,进一步促进疏水底物降解。在未加生物表面活性剂的体系 10 d 芘的平均残留率为 81%,而添加浓度为 20、50、200 和 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鼠李糖脂的体系芘的平均残留率分别下降为 57%、41%、33% 和 26%,生物表面活性剂的加入显著缩短了芘生物降解的半衰期,提高了芘的生物降解效率。

关键词:鼠李糖脂;细胞表面疏水性;脂多糖;芘;生物降解

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)07-2144-08

Interrelationships of Rhamnolipids, Hydrophobic Substrate and Degrading Bacteria

JIANG Ping-ping¹, GUO Chu-ling^{1,2,3}, DANG Zhi^{1,2}, LU Gui-ming¹, YI Xiao-yun^{1,2}, YANG Chen^{1,2}

(1. College of Environmental Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. Key Laboratory of Pollution Control and Ecosystem Restoration in Industry Clusters, Ministry of Education, Guangzhou 510006, China; 3. Key Laboratory of Environmental Protection and Eco-Remediation of Guangdong Regular Higher Education Institutions, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The effect of rhamnolipids on pyrene degradation by *Pseudomonas* sp. GP3A was investigated to explore the interrelationships of biosurfactant, hydrophobic substrate and degrading bacteria. The cell surface hydrophobicity, lipopolysaccharide, hydrogen bond, bacterial biomass and pyrene degradation were determined. The results showed that the apparent solubility of pyrene was enhanced significantly when the concentration of rhamnolipids was higher than critical micelle concentration (CMC) of $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Biosurfactant can increase the cell surface hydrophobicity by releasing the component of the cell wall-lipopolysaccharide; With the increase of cell surface hydrophobicity from 12% to 55%, bacterial biomass increased from $4.4 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ to $1.2 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, corresponding with the increase of pyrene degradation from 16% to 44%. Meanwhile, hydrogen bond was formed between biosurfactant and bacteria, which was beneficial to hydrophobic substrate degradation. The half-life of pyrene was shortened significantly. The average residual rate of pyrene in 10 days was 81% without rhamnolipids, but decreased to 57%, 41%, 33% and 26%, respectively with the addition of 20, 50, 200 and 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of rhamnolipids.

Key words: rhamnolipid; cell surface hydrophobicity; lipopolysaccharide; pyrene; biodegradation

生物表面活性剂是一类在微生物代谢过程中分泌的有一定生物活性的物质,与合成表面活性剂一样,生物表面活性剂也是由亲水基和疏水基两部分组成,疏水基一般为脂肪酰基链;亲水基有多种结构,包括中性脂的酯或醇官能团、脂肪酸或氨基酸的羧基、磷脂中含磷的部分以及糖脂中的糖基等。根据其化学结构特点,生物表面活性剂分为:糖脂类、含氨基酸类脂、磷脂、脂肪酸、结合多糖、蛋白质及脂的聚合物^[1]。由于化学表面活性剂的毒性和在环境中的持久性,同时可能对降解微生物产生毒害作用,带来二次污染等问题^[2,3],人们越来越青睐于用生物

表面活性剂来促进难溶的疏水底物的降解^[4-6]。对于促进作用的报道国内外已经很多^[7-10],并且对于加入生物表面活性剂后促进底物降解作用的原因的报道主要集中在其增溶能力上,而对于生物表面活性剂与疏水性底物和降解菌这三者之间的相互作用的报道却很少,这一方面的研究将有利于进一步促

收稿日期:2010-07-27;修订日期:2010-09-09

基金项目:广东省自然科学基金项目(9351064101000001);广东省科技计划项目(2007A050100023);广州市环保局科技成果应用示范项目

作者简介:姜萍萍(1986~),女,硕士研究生,主要研究方向为污染环境的生物修复,E-mail: jumpingpp@126.com

* 通讯联系人,E-mail: clguo@scut.edu.cn

进生物表面活性剂在污染环境中的应用. 因此, 本研究选取了一种常见的生物表面活性剂鼠李糖脂, 以 4 个苯环的多环芳烃 (PAHs) 代表物芘为底物, 分析生物表面活性剂与底物及降解菌之间的相互作用, 从生物表面活性剂、疏水底物、降解菌三方面来探求生物表面活性剂的作用过程和作用机制, 以期生物表面活性剂促进 PAHs 等污染环境的修复提供理论支持.

1 材料与方法

1.1 实验菌株

假单胞菌 GP3A 菌株 (*Pseudomonas* sp. GP3A): 是课题组从长期受石油污染土壤中筛选得到的 1 株芘降解菌^[11], 在 GenBank 的登录号为 EU233280.

取 1 mL 保存在含芘的无机盐培养基的菌液, 接种到 50 mL 营养肉汤培养基中于 35℃、150 r·min⁻¹ 摇瓶培养 12~24 h 后, 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 收集菌体, 用无菌水洗涤 3 次后, 再用 50 mL 无菌水将洗涤后的菌体悬浮为均匀的菌悬液, 此菌悬液为每次实验的接种物.

1.2 试剂及培养基

主要试剂: 芘 (pyrene) 购自 Sigma 公司, 纯度为 98%; KDO (2-keto-3-deoxyoctonic acid), 购自 Sigma 公司; 正十六烷 (AR, 96%); 无水硫酸钠: 分析纯, 在马弗炉中于 450℃ 灼烧 4 h, 放防潮箱中备用; 正己烷等有机溶剂均为分析纯, 重蒸后使用; 医用脱脂棉, 用二氯甲烷抽提 72 h, 通风橱风干后放防潮箱; 所有萃取过程用到的玻璃器皿先用重铬酸钾洗液清洗, 静置过夜, 然后依次用自来水、蒸馏水冲洗, 放入烘箱中于 120℃ 烘干, 最后用锡纸封口, 放置备用.

无机盐基础培养液 (MSM)^[12]: ① MgSO₄ 水溶液: 22.5 g MgSO₄·7H₂O, 蒸馏水 1 L; ② 磷酸盐缓冲液: 8.5 g·L⁻¹ KH₂PO₄, 21.75 g·L⁻¹ K₂HPO₄·H₂O, 33.4 g·L⁻¹ Na₂HPO₄·12H₂O, 5.0 g·L⁻¹ NH₄Cl, 蒸馏水 1 L; ③ FeCl₃ 水溶液: 0.25 g FeCl₃·6H₂O, 蒸馏水 1 L; ④ CaCl₂ 水溶液: 36.4 g CaCl₂·2H₂O, 蒸馏水 1 L; ⑤ 微量元素溶液: 39.9 mg MnSO₄·H₂O, 42.8 mg ZnSO₄·H₂O, 34.7 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 蒸馏水 1 L. 取上述 MgSO₄ 水溶液 3.0 mL、磷酸盐缓冲液 5.0 mL、FeCl₃ 水溶液 1.0 mL、CaCl₂ 水溶液 1.0 mL、微量元素溶液 1.0 mL, 蒸馏水定容至 1 L (为了防止产生沉淀, 先加入约 800 mL 蒸馏水, 再加入各

种无机盐溶液). 新鲜配置的无机盐培养基 (MSM) 自然 pH 值为 6.8~7.0; 在 121℃ 和 101.33 kPa 灭菌 15~20 min.

营养肉汤培养基: 10 g 蛋白胨, 5 g 牛肉膏, 5 g NaCl, 1 L 蒸馏水, 调 pH 为 7.0.

芘无机盐培养液: 以正己烷配制 5 g·L⁻¹ 的芘储备溶液, 取 0.06 mL 的芘储备液, 置于灭菌的 100 mL 三角瓶中, 待正己烷挥发完毕加入经高压蒸汽灭菌 20 mL MSM, 如无特殊说明, 本实验中芘的初始浓度均为 15 mg·L⁻¹; 同时, 设一个不加菌、不加表面活性剂的芘无机盐培养液作为对照实验, 与实验瓶一起振荡培养.

1.3 实验方法

1.3.1 生物表面活性剂的分离提纯和结构表征

鼠李糖脂: 从浙江大学孟琴老师处购买鼠李糖脂发酵液, 预处理后酸沉淀冷冻干燥法提纯^[13], 预处理方法为: 先将鼠李糖脂发酵液 10 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 然后用硫酸铵沉淀和冰盐水 (NaCl 溶液) 稀释破乳以去除发酵液中的细菌、蛋白类物质以及残油, 再将经过上述预处理的上清液酸化 (pH 在 2 以下), 离心收集沉淀, 将收集到的淡黄色沉淀物冷冻干燥, 将此提纯物保存在 -20℃ 冰箱中.

生物表面活性剂的结构表征采用德国布鲁克公司 Esquire HCT PLUS 大容量离子阱 LC-MS. 质谱条件: ESI 源; 采用全扫描一级质谱, m/z 扫描范围: 100~800; 选择离子全扫描二级质谱, m/z 扫描范围: 100~800; 电喷雾毛细管喷嘴口电离电压 -128.5 V; 检测方式为负离子检测.

1.3.2 生物表面活性剂对芘的增溶作用测定

取正己烷配制的 5 g·L⁻¹ 的芘储备溶液 0.03 mL 放入 25 mL 磨口三角瓶, 待正己烷挥发完全后, 加入 10 mL 含不同浓度 (20、50、60、80、100、200、300、400 和 500 mg·L⁻¹) 的生物表面活性剂溶液, 水浴超声溶解 2 h, 超声过程中通过换水以保持水温恒定, 然后 25℃, 50 r·min⁻¹ 摇床振荡 24 h 后, 将溶液转移至离心管中 10 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 以分离未溶解的芘, 取 5 mL 离心后上清液, 用 2 mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液调 pH 为 2.0, 等体积的正己烷萃取 2 次, 在 40℃ 水浴旋转蒸发至约 5 mL 后过无水硫酸钠 (大约 3 g), 用正己烷定容并测定芘含量.

1.3.3 芘的测定

用气相色谱法测定芘^[14]. 用 Agilent 6890N 气相色谱仪 (FID, HP-5 毛细管柱) 测定, 此方法的回收率为 90%~105%. 参数设置: 进样口的温度是

280℃,检测器的温度为300℃,程序升温:始温80℃,恒温2 min,15℃·min⁻¹升到280℃,恒温3 min;载气 N₂ 2 mL·min⁻¹, H₂ 40 mL·min⁻¹, 空气 400 mL·min⁻¹;不分流进样,进样量1 μL.

1.3.4 芘的残留率的测定

在培养过程中(240 h)每24 h定时取样测定培养基中芘的残留率.对于含有生物表面活性剂的降解体系,在萃取前先要用2 mol·L⁻¹的HCl将培养液pH调至2.0,水样中芘用等体积正己烷萃取2次,在40℃水浴旋转蒸发至约5 mL后过无水硫酸钠(大约3 g),用正己烷定容,然后用气相色谱法测定芘的残留率,气相色谱仪的参数设置见1.3.3节.

$$\text{芘残留率}(\%) = \frac{\text{培养后芘的含量}}{\text{初始芘的含量}} \times 100\%$$

1.3.5 细胞表面疏水性的测定

细胞表面疏水性根据菌细胞与正十六烷之间的黏附作用来测定^[15]:离心收集菌体,蒸馏水洗涤2次,再悬浮于其中使得菌悬液在400 nm处的光密度为1.0左右,在直径为10 mm的试管中依次加入4 mL细胞悬液和1 mL正十六烷,盖紧后涡旋振荡1 min,室温下放置30 min,用注射器小心移取底层水相,测量其在400 nm处的吸光度.应用下面的公式来计算细胞表面的疏水性(A):

$$A(\%) = \frac{T_0 - T_s}{T_0} \times 100\%$$

式中, T_0 表示振荡前细胞悬液在400 nm处的吸光度; T_s 表示振荡后下层水相在400 nm处的吸光度.每个样品测3次,取其平均值.

1.3.6 生物表面活性剂对菌细胞表面脂多糖流失的影响

在培养过程中每24 h定时取样测定培养基上清液中脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)含量.在此,脂多糖含量是以其中所含的2-酮-3-脱氧辛酮糖酸(KDO)表示,KDO含量以硫代巴比妥酸法测定^[16],具体操作为:将培养基在8 000 r·min⁻¹离心10 min,以去除培养基中鼠李糖脂的干扰.取0.1 mL离心后的上清液,加入0.036 mol·L⁻¹的H₂SO₄溶液,100℃下加热20 min,使KDO从脂多糖聚合物中释出,冷却后加入0.025 mol·L⁻¹ HIO₄试剂(用0.125 mol·L⁻¹的H₂SO₄配制),室温放置20 min,然后加入浓度为2%的亚砷酸钠溶液,室温放置2 min,再加入2 mL的硫代巴比妥酸试剂,混合,100℃加热20 min.冷却,在548 nm处测定其吸光值.

1.3.7 细胞表面疏水性对菌体生长量和芘残留率

的影响

移取在营养肉汤富集培养基中培养到对数生长期的菌体(12~24 h),无菌操作下离心收集菌体,然后加入不同浓度生物表面活性剂溶液,置于往复式摇床35℃、150 r·min⁻¹振荡1 h后,8 000 r·min⁻¹离心收集菌体,得到表面疏水性不同的菌体细胞.将所得的菌体细胞接种于以芘(15 mg·L⁻¹)为唯一碳源和能源的基础无机盐培养基中,35℃、150 r·min⁻¹摇床培养6 d后,测定菌体的生物量和芘的降解率,生物量采用平板稀释活菌计数法测定,每种待测溶液选用3个合适的稀释度(分别为10⁶、10⁷、10⁸),每个稀释度作3个平行,选择菌落数在30~300之间的平板进行计数.芘生物降解采用1.3.4节的方法测定.

1.3.8 菌体表面基团与生物表面活性剂分子的键合作用观察

将进行芘生物降解72 h的培养基离心得到的菌体用MSM溶液洗涤2遍,除去未紧密吸附的鼠李糖脂分子,再次离心得到的菌体置于冷冻干燥机中于-50℃以下冷冻干燥24 h,完全脱去水分后进行红外吸收光谱的测定.干燥后菌体的红外吸收光谱采用Nicolet 6700傅立叶变换红外光谱仪测定.称取1~2 mg菌体样品于玛瑙研钵中,充分研磨后,再加入大约200 mg干燥溴化钾粉末,继续研磨2~3 min,在压片机下压片成型后,置于红外光谱仪的光路中,在4 000~400 cm⁻¹区间扫描,绘制红外吸收光谱图.

2 结果与讨论

2.1 生物表面活性剂的结构表征

生物表面活性剂鼠李糖脂是菌体的发酵产物,组分相对复杂,其分子结构一般有两部分组成:一部分为疏油亲水的极性基团,通常为1~2分子的鼠李糖构成,另一部分是由疏水亲油非极性基团,一般为1~2分子具有不同碳链长度的饱和或不饱和脂肪酸构成^[17,18].电喷雾电离(ESI)在离子化过程中不涉及任何高能量的激发过程,因此对样品的破坏程度较小,可以提供各组分的分子量的相关信息.在此,本研究采用电喷雾电离质谱(ESI-MS)技术来分析所提纯的生物表面活性剂的成分.图1表示的是提取物溶于甲醇的质谱图.从图1中可以看出,此提纯的鼠李糖脂的同系物主要由 m/z 为479、503、649的物质构成,还包括一些丰度较低的 m/z 为333、476、677、530、531.对各种离子分别进行二级

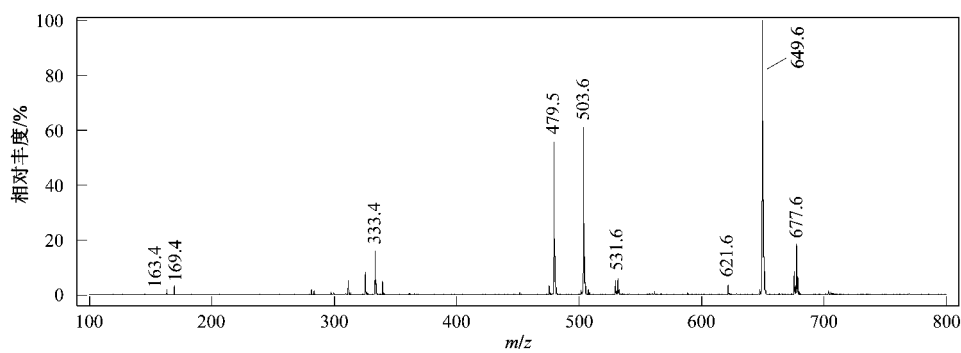


图 1 鼠李糖脂的质谱图

Fig. 1 Mass spectrum (MS) of rhamnolipids

表 1 鼠李糖脂同系物中各组分的结构¹⁾

Table 1 Structures of the rhamnolipid congeners

编号	鼠李糖脂类型	<i>m/z</i>	二级质谱主要特征碎片离子
1	RhC ₁₀	333	163 [M-C ₁₀ -1] ⁻ , 169 [M-Rh-1] ⁻
2	RhC ₁₀ C ₈	476	169 [M-RhC ₈ -1] ⁻ , 333 [M-C ₈ -1] ⁻ , 311 [M-Rh-1] ⁻
3	RhC ₈ C ₁₀	476	141 [M-RhC ₁₀ -1] ⁻ , 311 [M-Rh-1] ⁻ , 305 [M-C ₁₀ -1] ⁻
4	Rh ₂ C ₁₀	480	163 [M-RhC ₁₀] ⁻ , 169 [M-Rh ₂ -1] ⁻ , 247 [M-C ₁₀ -H ₂ O-CO ₂] ⁻
5	RhC ₁₀ C ₁₀	504	163 [M-RhC ₁₀ C ₁₀] ⁻ , 169 [M-RhC ₁₀ -1] ⁻ , 333 [M-C ₁₀ -1] ⁻ , 339 [M-Rh-1] ⁻
6	RhC ₁₀ C _{12:1}	530	197 [M-RhC ₁₀] ⁻ , 333 [M-C _{12:1}] ⁻ , 365 [M-H-Rh-1] ⁻ , 367 [M-Rh] ⁻
7	RhC _{12:1} C ₁₀	530	169 [M-RhC _{12:1} -1] ⁻ , 359 [M-C ₁₀ -1] ⁻ , 365 [M-H-Rh-1] ⁻ , 367 [M-Rh] ⁻
8	RhC ₁₂ C ₁₀	532	169 [M-RhC ₁₂ -1] ⁻ , 361 [M-C ₁₀] ⁻ , 367 [M-H-Rh-1] ⁻
9	RhC ₁₀ C ₁₂	532	197 [M-H-RhC ₁₀ -1] ⁻ , 333 [M-C ₁₂] ⁻ , 367 [M-H-Rh-1] ⁻
10	Rh ₂ C ₁₀ C ₈	622	247 [M-C ₁₀ C ₈ -H ₂ O-CO ₂] ⁻ , 479 [M-C ₈] ⁻
11	Rh ₂ C ₈ C ₁₀	622	247 [M-C ₁₀ C ₈ -H ₂ O-CO ₂] ⁻ , 451 [M-C ₁₀] ⁻
12	Rh ₂ C ₁₀ C ₁₀	650	247 [M-C ₁₀ C ₁₀ -H ₂ O-CO ₂] ⁻ , 309 [M-C ₁₀ C ₁₀] ⁻ , 339 [M-H-Rh ₂] ⁻ , 479 [M-C ₁₀] ⁻
13	Rh ₂ C ₁₂ C ₁₀	678	247 [M-C ₁₂ C ₁₀ -H ₂ O-CO ₂] ⁻ , 367 [M-Rh ₂ -1] ⁻ , 507 [M-C ₁₀] ⁻ , 531 [M-Rh] ⁻
14	Rh ₂ C ₁₀ C ₁₂	678	197 [M-H-Rh ₂ C ₁₀ -1] ⁻ , 247 [M-C ₁₂ C ₁₀ -H ₂ O-CO ₂] ⁻ , 367 [M-Rh ₂ -1] ⁻ , 479 [M-C ₁₂] ⁻ , 531 [M-Rh] ⁻

1) Rh 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*:1} 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

质谱分析来进一步推定它们的结构及是否含有同分异构体.表 1 给出的是各组分的分子离子峰、相应的特征离子碎片.从表 1 可知,提取物中存在 14 种鼠李糖脂组分,由 1~2 分子的鼠李糖和 1~2 个含有 β 羟基的碳链长度为 8~12 的脂肪酸组成.

2.2 生物表面活性剂对苾的增溶作用

图 2 是水相中苾的表观溶解度随生物表面活性剂浓度变化曲线.由图 2 可知,当鼠李糖脂浓度在临界胶束浓度(CMC=60 mg·L⁻¹)以下时,增溶作用很微弱,而当其浓度大于 CMC 时,增溶的效果明显改善,苾的溶解度随着鼠李糖脂浓度的增加几乎呈线性增大.因为当溶液中的生物表面活性剂浓度低于 CMC 时,是以单体的形式存在于体系中^[19],而这种单分子的表面活性剂对疏水性物质的分配相对很弱,所以此时的被增溶物在水中的表观溶解度变化

很小或者只有稍稍增加;但是而当中生物表面活性剂浓度大于 CMC 时,表面活性剂已经形成胶束,胶束通过疏水的微环境加强了对疏水性底物的分配作用,使得表观溶解度显著提高^[19,20].

在本研究中,当鼠李糖脂浓度达到 500 mg·L⁻¹ 时,苾的溶解度增大了 44 倍以上.在一定程度上生物表面活性剂相对于化学表面活性剂而言有其优越的性能.鼠李糖脂对苾的增溶能力一方面是其具有较低的 CMC,另一方面与其特殊的胶束结构特性有关.本实验中所使用的鼠李糖脂有一系列的同系物,且在這些同系物中有些分子含有 2 个疏水烷基,这些碳链占据了较大的空间,使得鼠李糖脂分子所形成的胶束形式有可能不为球状,而可能为圆柱状或者棒状,此种胶束内径较大,能容纳较多的疏水性有机化合物分子^[21].

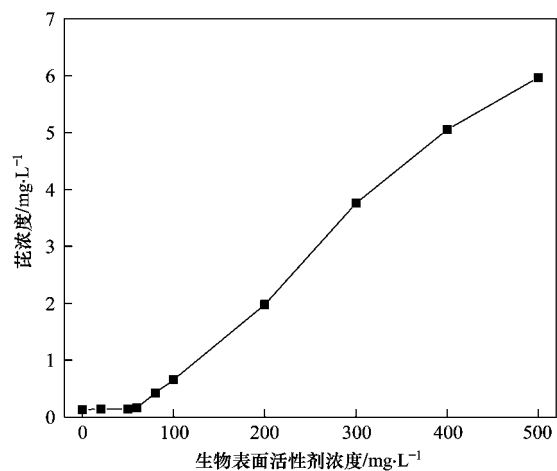


图2 生物表面活性剂对芘的增溶作用
Fig.2 Solubilization of pyrene by biosurfactant

2.3 生物表面活性剂作用下芘的生物降解

图3显示了不同浓度生物表面活性剂浓度下芘的生物降解效果,部分数据引用自之前发表文章^[22].由图3结果可知,在未加生物表面活性剂的体系中,芘的残留率很高,至降解第10 d 仍然有81%的芘残留在体系中,并且在第5 d 后芘的生物降解就基本停止.加了生物表面活性剂的体系中,芘的残留率随着生物表面活性剂的浓度的升高而降低,并且在第7 d 后芘的残留率就基本无变化.低浓度的生物表面活性剂(20、50 mg·L⁻¹)对芘的增溶效果虽然并不明显(如图2),但是对芘的生物降解作用依然较明显,在降解第10 d,芘的残留率分别为57%和41%,可能是由于生物表面活性剂的加入改变了菌体细胞的表面性质,从而促进了底物的降解^[23,24];在高浓度的生物表面活性剂存在时(200、

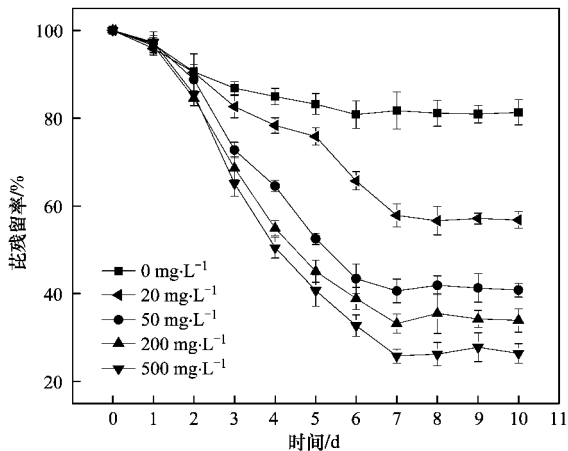


图3 生物表面活性剂对芘生物降解的影响
Fig.3 Effect of biosurfactant on pyrene degradation

500 mg·L⁻¹),芘的生物降解率显著提高,降解第10 d,体系中芘的残留率分别为33%和26%.这说明芘生物降解率的提高不仅仅是因为生物表面活性剂对疏水底物增溶而导致的,也有可能是生物表面活性剂和降解菌体之间的相互作用而产生的^[16].空白对照为只加芘于无机盐溶液中,第10 d 空白组分的芘的残留率仍高达97%.

表2是芘生物降解动力学方程,采用指数常数模型进行拟合^[9]:

$$\ln(c - c_0) = A - at$$

式中 c 为底物浓度, mg·L⁻¹; c_0 、 A 为常数; a 为动力学常数; t 为培养时间, d.

表2 芘生物降解动力学方程

Table 2 Degradation kinetic equation of pyrene			
鼠李糖脂浓度 /mg·L ⁻¹	动力学方程	$t_{1/2}$ /d	R^2
0	$c = 3.21e^{-0.347x} + 11.95$	无法达到	0.98
20	$c = 12.18e^{-0.093x} + 3.15$	11.08	0.97
50	$c = 12.76e^{-0.178x} + 3.22$	5.90	0.96
200	$c = 13.51e^{-0.202x} + 2.54$	4.96	0.96
500	$c = 15.46e^{-0.192x} + 0.81$	5.22	0.96

此模型能较好地描述生物表面活性剂存在下芘的生物降解过程.同时,生物表面活性剂的加入缩短了芘的半衰期,低浓度时(20、50 mg·L⁻¹),半衰期会随着生物表面活性剂浓度的升高而大大缩短,但是高浓度时(200、500 mg·L⁻¹),半衰期无明显变化.

2.4 生物表面活性剂对菌体细胞表面疏水性以及KDO 含量影响

加入生物表面活性剂会对菌体降解疏水性底物产生影响,这种影响产生的原因可能是由于生物表面活性剂特定的两亲分子结构对菌体细胞表面亲水亲脂性能的改变所造成的^[23~25],本研究就对生物表面活性剂的加入改变菌体细胞表面疏水性以及其原因进行了分析.图4表示的是生物表面活性剂对菌体细胞表面疏水性和KDO 含量的影响,部分数据引用自之前发表文章^[22].由图4可知,在未加生物表面活性剂的体系中,菌体表面的疏水性有略微的增加,对应的上清液中溶出的KDO 含量也不明显,疏水性的增加可能是由于疏水性底物诱导而产生的^[26],增强菌体与疏水性底物的接触.加入生物表面活性剂24 h 后,细胞表面疏水性就有了很大的提高,并且随着生物表面活性剂浓度的增大而增大,这有利于菌体与底物的亲和,从而使得降解菌更好地摄取疏水性的底物;培养72 h 时菌体细胞表面疏水性达到最大值,分别为21%、66%、70%、81%(生

物表面活性剂浓度分别为 0、50、200、500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

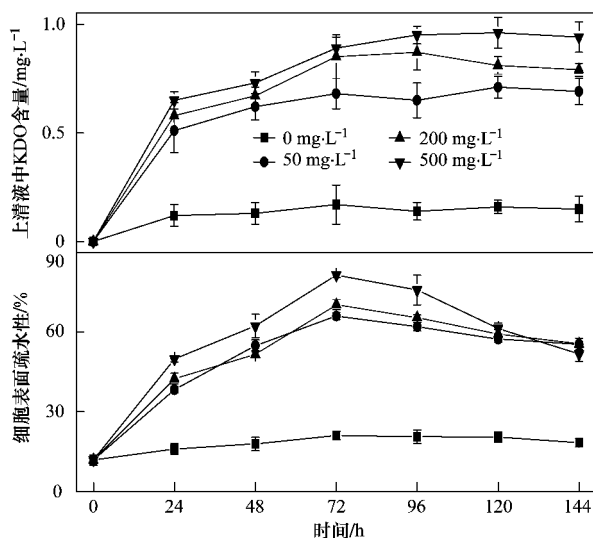


图4 生物表面活性剂对菌体细胞表面疏水性
以及 KDO 含量影响

Fig. 4 Effect of biosurfactant on cell hydrophobicity and KDO

GP3A 是革兰氏阴性菌,脂多糖位于细胞壁的最外侧,是菌体表面的主要组分之一,对细胞表面的性质起着很重要的影响^[27],因为菌体细胞壁中脂多糖是与外界环境直接接触,它的含量高低与细胞表面疏水性强弱有一定的联系.脂多糖中的 O 侧链和低聚糖会降低细胞表面的疏水性能,因此,细胞外膜中的脂多糖含量越低,其疏水性就越强^[27-28].本研究在芘生物降解过程中每隔 24 h 取样测定菌体细胞表面疏水性以及脂多糖含量的变化,如图 4 所示.随着疏水性的增大,上清液中脂多糖含量也增多.因此,菌体加入生物表面活性剂后疏水性的显著变化可能是由于菌体细胞壁中脂多糖的溶出而导致的^[16].另一方面,细胞表面疏水性的提高也有可能是由于生物表面活性剂的亲水端与弱疏水性的菌体表面结合,而将疏水端伸向了环境,从而也使得菌体表面疏水性有了很大的提高^[23].

2.5 细胞表面疏水性对菌体生长量和降解率的影响

从以上数据可知,在加入生物表面活性剂的体系中,菌体细胞表面疏水性有了很大的提高,而且疏水性底物的残留率也比未加的体系低.但这是否就一定就表明底物降解率的提高跟菌体细胞表面疏水性有关,还有待进一步的实验验证,因为加入生物表面活性剂会使得难溶底物的溶解度增

加,从而使得降解菌能更好地摄取底物,促进底物的降解.

基于以上考虑,本研究设计了用不同浓度生物表面活性剂处理菌体从而形成疏水性大小不同的降解菌,然后再放入未加生物表面活性剂的芘的无机盐体系中,来研究不同细胞表面疏水性的生长和芘的生物降解情况,如图 5 所示.菌体细胞表面疏水性越大,菌体生长的就越好,同时芘的生物降解率也越高.当细胞表面疏水性由 12% 增大到 48% 时,菌体 6 d 的生物量由 $4.4 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 增大到 $9.5 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,芘的生物降解率由 16% 增大到 39%,当细胞表面疏水性增至 55% 时,菌体生物量增大到 $1.2 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,芘的生物降解率此时达到了 44%,这表明了菌体细胞表面越疏水,越有利于疏水基质的吸收转化.

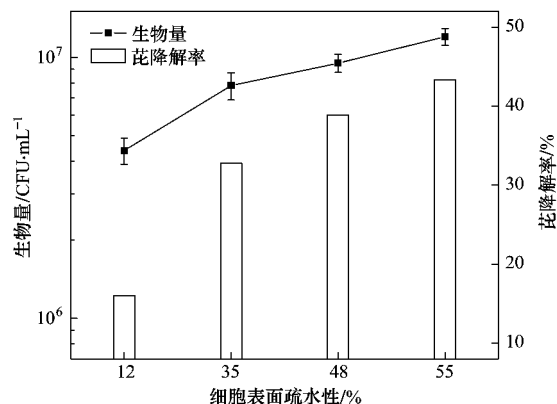


图5 细胞表面疏水性对 GP3A 生长和芘生物降解的影响

Fig. 5 Effect of cell hydrophobicity on the growth of GP3A and pyrene degradation

2.6 菌体表面基团与生物表面活性剂分子键合作用的观察

图 6 为 GP3A 在不同浓度的生物表面活性剂存在下降解芘 72 h 后的菌体的傅里叶红外吸收光谱图. 3400 cm^{-1} 附近的峰是 O—H 的伸缩振动引起的, $2900 \sim 3300 \text{ cm}^{-1}$ 处的振动为细胞壁上来自蛋白质的 N—H 键的伸缩振动,也可属于 C—H 伸缩振动产生的^[29]; 1651 、 1548 cm^{-1} 处的谱峰是典型的细胞中蛋白质酰胺 II 带 (C—N 伸展振动与 N—H 的弯曲振动的叠加) 和酰胺 I 带 (C=O 的伸展振动)^[30].波数 1400 cm^{-1} 左右的峰对应的是饱和的伯、仲、叔醇—OH 的面内弯曲振动峰^[31],表明了构成菌体的化学结构中存在有羟基基团. 1240 cm^{-1} 附近的谱峰是 C—S 和 P—O 的伸缩振动以及 C—O 与 O—H 的叠加吸收峰; $1100 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 处的谱

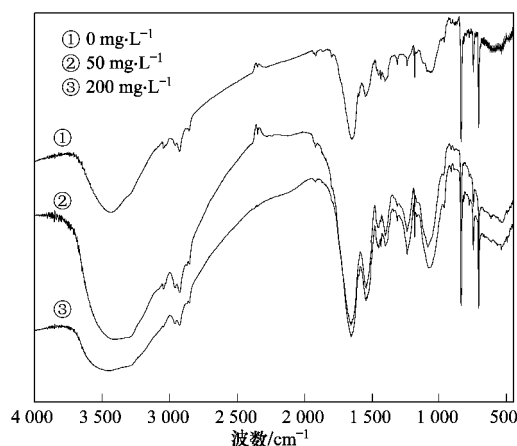


图6 GP3A在芘降解过程中的傅里叶变换红外吸收光谱图

Fig. 6 FTIR spectroscopy of GP3A during pyrene degradation

峰主要为 PO_4^{3-} 、胺基中的C—N的伸缩振动以及糖环的振动吸收带^[31], $1\,000 \sim 650\text{ cm}^{-1}$ 处的谱峰是C—H的面外弯曲振动所引起的^[29]. 从图6可以看出, 相对于未加鼠李糖脂的体系中而言, 菌体的红外谱图在 $3\,400$ 、 $1\,651$ 、 $1\,548\text{ cm}^{-1}$ 呈现出明显的差异. 加了鼠李糖脂的体系, 此三处的谱峰明显增强和变宽, 伸缩频率下降, 推测可能是由于菌体表面LPS中的低聚糖、鼠李糖脂分子中的鼠李吡喃糖环、菌体细胞中的大量羟基基团以及蛋白质中的氨基酸基团, 发生了氢键作用^[29, 32], 这些基团都富含羟基、氨基和酰基, 它们是形成氢键的供体或受体. 氢键的形成可能有利于菌体与胶束态溶解的芘的接触, 有助于菌体摄取疏水性的底物, 从而促进了底物的降解.

3 结论

(1) 本实验中所用到的生物表面活性剂的提取物中包含14种鼠李糖脂组分, 由1~2分子的鼠李糖和1~2个含有 β 羟基的碳链长度为8~12的脂肪酸组成.

(2) 当生物表面活性剂鼠李糖脂浓度高于临界胶束浓度时, 能显著增加芘的表现溶解度, 而低于该临界浓度的效果不明显.

(3) 生物表面活性剂能显著增大菌体表面的疏水性, 且这种增大作用在低浓度的时候就有明显表现. 菌体细胞壁中脂多糖的溶出是疏水性发生变化的一个方面. 当菌体疏水性越大, 生物量也越多, 底物的降解率也越高.

(4) 生物表面活性剂能显著促进疏水性底物芘降解, 缩短芘在降解体系中的半衰期.

参考文献:

- [1] 陈坚. 环境生物技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000. 410-456.
- [2] Harry J T, Joseph B H, Michelle T J. Effect of surfactant addition on phenanthrene biodegradation in sediments[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1995, 8(3): 228-230.
- [3] 宋玉芳, 孙铁珩, 许华夏. 表明活性剂TW-80对土壤中多环芳烃生物降解的影响[J]. 应用生态学报, 1999, 10(2): 230-232.
- [4] García-Junco M, Olmedo E D, Ortega-Calvo J J. Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid (NAPL)-dissolved phenanthrene to the biosurfactant producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19S[J]. Environmental Microbiology, 2001, 3(4): 561-569.
- [5] Avramova T, Sotirova A, Galabova D, et al. Effect of Triton X-100 and rhamnolipid PS-17 on the mineralization of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. cells[J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2008, 62(4): 415-420.
- [6] Zhang H Z, Long X W, Sha R Y, et al. Biotreatment of oily wastewater by rhamnolipids in aerated active sludge system[J]. Journal of Zhejiang University-Science B, 2009, 10(11): 852-859.
- [7] Noordman W H, Wachter J H J, De Boer G J, et al. The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability[J]. Biotechnology, 2002, 94(2): 195-212.
- [8] Shin K H, Kim K W, Seagren E A. Combined effects of pH and biosurfactant addition on solubilization and biodegradation of phenanthrene[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2004, 65(3): 336-343.
- [9] 周清, 杨乐巍, 黄国强, 等. 鼠李糖脂对土壤中原油降解的促进[J]. 环境化学, 2009, 28(2): 181-184.
- [10] Gonzini O, Plaza A, Di Palma L, et al. Electrokinetic remediation of gasoil contaminated soil enhanced by rhamnolipid[J]. Applied Electrochemistry, 2010, 40(6): 1239-1248.
- [11] 陈晓鹏, 易筱筠, 陶雪琴, 等. 石油污染土壤中芘高效降解菌群的筛选及降解特性研究[J]. 环境工程学报, 2008, 2(3): 413-417.
- [12] Tao X Q, Lu G N, Dang Z, et al. A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(3): 401-408.
- [13] 马满英, 施周, 刘有势, 等. 预处理酸沉淀冷冻干燥法提取鼠李糖脂新工艺[J]. 湖南大学学报(自然科学版), 2008, 35(1): 75-79.
- [14] 陈晓鹏. 多环芳烃芘微生物降解的实验研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2008.
- [15] Zhang Y M, Miller R M. Effect of a pseudomonas rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(6): 2101-2106.
- [16] Al-Tahhan R A, Sandrin T R, Bodour A A. Rhamnolipid-

- induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**(8): 3262-3268.
- [17] 汤晓. 铜绿假单胞菌高产鼠李糖脂及降解原油性能的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [18] Lang S, Wullbrandt D. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 1999, **51**:22-32.
- [19] 张慧. 镉-砷复合污染土壤的植物修复及其强化技术研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2009.
- [20] 余海粟, 朱利中. 混合表面活性剂对菲和芘的增溶作用[J]. 环境化学, 2004, **23**(5): 485-489.
- [21] Bai G Y, Brusseau M L, Miller R M. Influence of cation type, ionic strength, and pH on solubilization and mobilization of residual hydrocarbon by a biosurfactant [J]. Journal of Contaminant Hydrology, 1998, **30**:265-279.
- [22] 姜萍萍, 党志, 卢桂宁, 等. 鼠李糖脂对假单胞菌 GP3A 降解芘的性能及细胞表面性质的影响[J]. 环境科学学报, 2011, **31**(3):485-491.
- [23] 钟华, 曾光明, 黄国和, 等. 生物表面活性剂对土壤中微生物降解疏水性有机物的作用机制[J]. 高技术通讯, 2006, **16**(3): 325-330.
- [24] 任芳谊. 鼠李糖脂在微生物表面的吸附及其对微生物表面性质的影响[D]. 长沙: 湖南大学, 2008.
- [25] Owsianiak M, Szulc A, Chrzanowski L, et al. Biodegradation and surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel by 218 microbial consortia are not correlated to cell surface hydrophobicity [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, **84**:545-553.
- [26] Whyte L G, Slagmna S J, Pietrantonio F, et al. Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus* sp. strain Q15 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, **65**(7): 2961-2968.
- [27] Gruber K, Sleytr U B. Influence of an S-layer on surface properties of *Bacillus stearothermophilus* [J]. Archives of Microbiology, 1991, **180**(3):101-105.
- [28] Park J M, So J S. Altered cell surface hydrophobicity of lipopolysaccharide-deficient mutant of *Bradyrhizobium japonicum* [J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, **41**(3):219-226.
- [29] 姚新生, 陈英杰. 有机化合物波谱分析[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1981. 67.
- [30] Kamnev A A, Risti M, Antonyuk L P, et al. Fourier transform infrared spectroscopic study of intact cells of the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* [J]. Journal of Molecular Structure, 1997, **408-409**:201-205.
- [31] Kamnev A A, Antonyuk L P, Matora L Y, et al. Spectroscopic characterization of cell membranes and their constituents of the plant-associated soil bacterium *Azospirillum brasilense* [J]. Journal of Molecular structure, 1999, **480-481**:387-393.
- [32] 钟华. 鼠李糖脂的菌体吸附及其对菌体表面的改性作用研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2008.