

烷烃高效降解菌的广谱降解性能研究

张亚雷¹, 徐德强^{2*}, 曹微寰¹, 赵建夫³

(1. 同济大学环境学院长江水环境教育部重点实验室, 上海 200092; 2. 复旦大学生命科学学院, 上海 200433; 3. 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092)

摘要: 针对分离、筛选出的正烷烃高效降解菌株 C-14-1 的广谱降解性能进行研究。结果表明, C-14-1 菌株不仅对较高浓度 (大于 50mg/L) 的正烷烃降解能力显著, 对低浓度 (约 2mg/L) 的正烷烃系列同样具有较好的降解效果, 并且降解率和烷烃的碳原子数紧密相关。经过 48h 的发酵, 当烷烃碳原子数为 10~22 时, 降解率基本上大于 85%; 当烷烃碳原子数大于 22 时, 降解率降低到 15%~78%。C-14-1 菌株对浓度很低 (约 0.3mg/L) 的原油也显示出一定的降解效果。当烷烃碳原子数为 12~22 时, 降解率平均为 65%; 当烷烃碳原子数大于 22 时, 降解率降低为平均 28.3%。当试验系统处于限氧状态时, C-14-1 菌株对 5 α -雄甾烷和六甲苯基本上无降解作用, 但对姥鲛烷的降解率却高达 97%。在供氧充足的通气状态下以 5 α -雄甾烷为唯一碳源时, C-14-1 菌株对 5 α -雄甾烷的降解率达到 77%。当与其它低碳原子数的正烷烃共存时, 5 α -雄甾烷更容易被 C-14-1 菌株通过协同代谢而降解。通气培养 48h 时, 其降解率达到 100%; 即使在限氧状态下, 其降解率也能达到 64%。

关键词: 烷烃; 降解菌; 原油; 姥鲛烷; 5 α -雄甾烷; 六甲苯

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)03-0578-04

Broad Spectrum Degradation Capability of a High-Efficiency Alkanes Degrading Bacterium Strain

ZHANG Ya-lei¹, XU De-qiang², CAO Wei-huan¹, ZHAO Jian-fu³

(1. Key Laboratory of Yangtze Water Environment of Ministry of Education, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China; 3. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Degradation capability of a bacterium strain C-14-1 for various *n*-alkanes was investigated. Experimental results indicate that C-14-1 can quite effectively degrade *n*-alkanes not only with a high concentration (> 50mg/L individual alkane), but also with a low concentration (2mg/L individual alkane). Moreover, the degradation efficiency is closely related to the carbon number of *n*-alkanes. After 48h cultivation, the degradation efficiency is generally greater than 85% for *n*-alkanes with a carbon number between 10 and 22; while the degradation efficiency decreases to 15%~78% if the carbon number is larger than 22. C-14-1 also exhibits certain degradation efficiency for a low-concentration crude oil (about 0.3mg/L). The average degradation efficiency of crude oil reaches 65% when the carbon number of *n*-alkanes is between 10 and 22; while the degradation efficiency drops to 28.3% if the carbon number is larger than 22. Under anoxic condition, C-14-1 can hardly degrade 5 α -androstane and hexamethylbenzene; however, it can effectively degrade pristane, achieving a degradation efficiency of 97%. Under aerobic condition, the degradation efficiency of 5 α -androstane reaches 77% if used as the sole carbon source. However, 5 α -androstane can be effectively degraded by C-14-1 under either aerobic or anaerobic condition if there coexist other short-chain *n*-alkanes. After 48 h cultivation, all 5 α -androstane can be removed under aerobic condition; while its degradation efficiency still reaches 64% even under anoxic condition.

Key words: alkanes; bacterium stain; crude oil; 5 α -androstane; hexamethylbenzene; pristane; anaerobic; aerobic

近年来, 国内外已做过不少利用微生物降解石油烃类的研究^[1~6], 并且从土壤、海洋等介质中分离到多种降解菌, 以使石油烃类物质能被微生物降解。然而, 石油烃类物质一般需要较长的时间才能被降解, 仍属于难生物降解性物质^[7]。烷烃是石油中的主要成分, 也是多种石化废水中的主要污染物之一^[8~10]。如何提高烷烃的降解速率, 获得高效、广谱的降解菌株依然是研究工作者关注的问题^[11~13]。本研究主要针对已经分离、筛选出的高效降解菌株^[14], 对其广谱降解性能进行了试验研究, 以期为

相关污水的工业化处理提供微生物学基础。

1 材料与方法

1.1 C-14-1 菌株

以正十二烷、正十五烷和正十六烷为唯一碳源,

收稿日期: 2005-03-10; 修订日期: 2005-07-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(50008011); 国家“十五”科技攻关计划项目(2003BA808A17); 上海市青年科技启明星计划(05QMX1453)

作者简介: 张亚雷(1971~), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为水污染控制理论与技术, E-mail: zyl@mail.tongji.edu.cn

* 通讯联系人

从石化腈纶废水及其处理构筑物的生物膜中分离、筛选出的高效降解正烷烃的菌株 C-14-1, 经形态学观察和生理生化等特征鉴定, 属于诺卡氏菌属 (*Nocardia* sp.)^[14]. 在最适生长条件下, 该菌株降解正烷烃的能力显著: 当正十二烷、正十五烷和正十六烷的混合烷烃中各烷烃的初始浓度约为 50mg/L 时, 在 11h 对降解率达到 93%~100%; 各烷烃的初始浓度约为 100mg/L 时, 在 22h 降解率达到 97%~100%; 各烷烃的初始浓度约为 150mg/L 时, 在 22h 降解率达到 85%~93%^[14].

1.2 培养基

Bushnell-Hass(以下缩写为 B. H.) 基础培养基成分如下^[15]: MgSO_4 , 0.2g; KH_2PO_4 , 1g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1g; CaCl_2 , 0.02g; K_2HPO_4 , 1g; FeCl_3 , 2滴浓缩液; (固体培养基中另加琼脂粉 16g); 蒸馏水, 1L. 培养基的 pH 值调到 7.0~7.2. 培养基在 121℃ 湿热灭菌 20min.

1.3 正烷烃标准混合物的降解试验

C-14-1 菌株以正烷烃标准混合物($n\text{-C}_8$ 、 $n\text{-C}_{10}$ ~ $n\text{-C}_{30}$ 、 $n\text{-C}_{32}$ 、 $n\text{-C}_{34}$ 、 $n\text{-C}_{36}$) 为唯一碳源, 进行降解摇瓶试验. 按一定时间间隔取样, 通过 GC-FID 分析, 测定摇瓶中烷烃的剩余浓度(与内标的相对浓度). 以不接种的空白对照样为基准, 计算各烷烃降解率.

1.4 原油的降解试验

C-14-1 菌株以低浓度原油(摇瓶中各正烷烃的浓度约为 0.3mg/L) 为唯一碳源, 进行降解摇瓶试验. 按一定时间间隔取样, 通过 GC-FID 分析, 测定摇瓶中正烷烃的剩余浓度(与内标的相对浓度). 以不接种的空白对照样为基准, 计算不同发酵时间各烷烃的降解率.

1.5 姥鲛烷 5 α -雄甾烷及六甲苯的降解试验

姥鲛烷(pristane), 即 2, 6, 10, 14-四甲基十五烷, 是典型的支链烷烃, 由于属于难降解物质, 常作为生物降解试验的预加内标物.

5 α -雄甾烷(5 α -androsterane) 是典型的稠环烷烃, 属于非常稳定的化合物, 未见其可被生物降解的报道. 其结构式如图 1 所示.

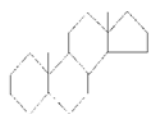


图 1 5 α -雄甾烷结构式

Fig. 1 Structural type of 5 α -androsterane

六甲苯(hexamethylbenzene) 是典型的芳香烃,

亦为难降解物质.

针对上述 3 种物质进行降解试验, 不仅因为 5 α -雄甾烷和姥鲛烷分别作正烷烃标准混合物与原油的降解试验的内标, 需考察其可生物降解性, 来确定预加内标合理与否; 而且这 3 种分别代表了石油中正烷烃以外的几类化合物, 因此对研究 C-14-1 菌株降解石油的能力具有借鉴意义.

1.5.1 单一基质试验

C-14-1 菌株分别以姥鲛烷 5 α -雄甾烷或六甲苯作为唯一碳源, 进行 48h 的密闭摇瓶试验. 通过 GC-FID 分析, 测定摇瓶中各物质的剩余浓度.

1.5.2 5 α -雄甾烷的可降解性研究

在以 5 α -雄甾烷为预加内标的正烷烃标准混合物降解试验中, 发现该物质的量亦在减少. 因此, 有必要对其可生物降解性作进一步的研究. 试验分 4 种情况进行: ①试验体系在供氧充足的通气状态下, 以 5 α -雄甾烷为唯一碳源; ②试验体系在通气状态下, 5 α -雄甾烷与正烷烃标准混合物共同作为碳源; ③试验体系在密闭摇瓶状态下, 以 5 α -雄甾烷为唯一碳源; ④试验体系在密闭摇瓶状态下, 5 α -雄甾烷与正烷烃标准混合物共同作为碳源.

2 结果与讨论

2.1 C-14-1 菌株对正烷烃标准混合物的降解

由表 1 和图 2 可知, C-14-1 菌株对低浓度的正烷烃系列(摇瓶中每种正烷烃的浓度仅为 2mg/L 左右) 也具有较好的降解效果. 说明从正十二烷、正十五烷和正十六烷的环境中筛选出的该菌株, 对其它正烷烃具备广谱降解性.

经过 48h 的发酵, 当烷烃碳原子数为 10~22 时, 降解率基本上大于 85%. 当烷烃碳原子数大于 22 时, 降解率比较低. 这一方面是因为这些烷烃物理性质特殊, 在水中溶解度极低, 从而不利于生物降解的转化作用; 另一方面, 其本身浓度很低, 因此降解速率偏小.

2.2 C-14-1 菌株对原油的降解

由表 2 和图 3 可知, C-14-1 菌株对浓度很低的原油也具有一定的降解效果. 当烷烃碳原子数为 12~22 时, 降解率平均为 65.3%. 当烷烃碳原子数大于 22 时, 降解率比较低, 平均 28.3%, 甚至出现个别正烷烃相对浓度反而增大的现象, 可能由支链烷烃或更长的链烷断裂所致. 与图 2 及表 1 相比, 可以明显地看出, 原油中正烷烃的降解程度远低于单纯的混合正烷烃系列, 这可能有 3 方面的原因: ①由于

表 1 正烷烃标准混合物中各烷烃的降解率/%

Table 1 Degrading rate of individual compound in the alkanes standard mixture/%

烷烃	5h	8h	11h	16h	25h	31h	39h	48h
n-C ₁₀	34	24	65	46	88	94	94	94
n-C ₁₁	68	84	100	84	100	100	100	100
n-C ₁₂	92	100	96	100	94	96	91	100
n-C ₁₃	95	100	100	100	100	96	100	100
n-C ₁₄	93	95	91	91	89	91	91	94
n-C ₁₅	87	91	76	67	—	67	—	83
n-C ₁₆	84	91	70	56	—	58	—	93
n-C ₁₇	83	91	82	71	82	72	80	87
n-C ₁₈	80	91	81	73	79	71	77	85
n-C ₁₉	81	92	75	65	77	62	74	86
n-C ₂₀	78	93	83	87	83	79	82	89
n-C ₂₁	73	92	77	86	84	79	85	89
n-C ₂₂	67	89	64	86	22	69	82	86
n-C ₂₃	56	83	50	81	76	51	72	78
n-C ₂₄	46	78	3	64	63	3	50	67
n-C ₂₅	34	68	9	80	59	12	37	62
n-C ₂₆	22	61	-14	52	52	-9	8	52
n-C ₂₇	13	50	-34	41	46	-26	-31	43
n-C ₂₈	5	42	-55	24	22	-44	-63	15
n-C ₂₉	0	39	-71	23	36	-55	-73	24
n-C ₃₀	-10	32	-16	30	39	-6	-48	26
n-C ₃₂	-18	22	-18	50	67	-6	-45	44
n-C ₃₄	-44	14	-6	63	79	8	8	70
n-C ₃₆	-72	-16	14	68	55	20	19	77

“—”表示异常数值,可能污染所致。

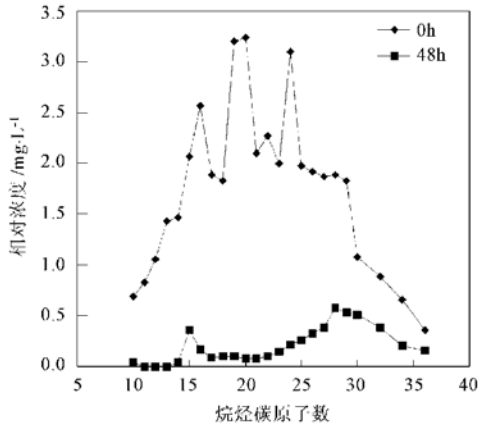


图 2 正烷烃标准混合物中各烷烃的浓度变化

Fig. 2 Change of the concentration of individual compound in the alkanes standard mixture

原油样品中各正烷烃的浓度非常低,导致降解速率很慢;②原油中不仅存在正烷烃,还包括支链烷烃、环烷烃、芳烃等化合物,某些物质对试验菌株具有毒性,产生有抑制作用;③C-14-1 菌株对正烷烃以外的其它物质也具有一定的同化作用,从而分散了它对正烷烃的降解能力。

表 2 原油中各烷烃的降解率/%

Table 2 Degrading rate of individual compound in the crude oil/%

烷烃	5h	16h	25h	34h	43h	48h
n-C ₁₂	-29	100	-93	60	43	100
n-C ₁₃	5	100	67	100	79	69
n-C ₁₄	35	58	87	44	57	100
n-C ₁₅	-29	-98	-112	-38	-308	35
n-C ₁₆	45	7	-511	-254	-638	41
n-C ₁₈	62	10	100	100	86	51
n-C ₁₉	67	100	100	100	63	80
n-C ₂₀	47	100	60	100	17	49
n-C ₂₁	100	10	51	100	41	33
n-C ₂₂	89	94	68	54	93	95
n-C ₂₃	80	100	86	25	95	-86
n-C ₂₄	60	-67	58	-30	50	43
n-C ₂₅	82	-184	100	83	69	76
n-C ₂₆	34	-25	29	53	17	25
n-C ₂₇	35	100	-59	-22	-22	-30
n-C ₂₈	26	-23	7	29	20	-16
n-C ₂₉	48	83	92	61	39	87
n-C ₃₀	14	100	9	100	91	25
n-C ₃₂	85	-88	-121	16	65	5

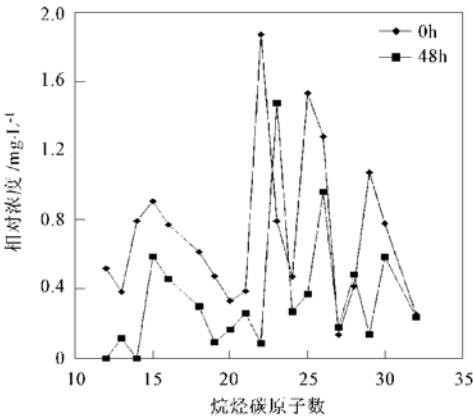


图 3 原油中各正烷烃的浓度变化

Fig. 3 Change of the concentration of individual compound in the crude oil

2.3 C-14-1 菌株对姥鲛烷、5 α -雄甾烷及六甲苯的降解

2.3.1 单一基质试验

由表 3 可知,在上述 3 种物质分别作为唯一碳源,且试验体系处于限氧(密闭摇瓶)状态时,C-14-1 菌株对 5 α -雄甾烷和六甲苯基本上无降解作用,但对姥鲛烷的降解率却高达 97%。因此,用姥鲛烷作为原油降解试验的内标物,应该在发酵结束时才可加入。

2.3.2 C-14-1 菌株对 5 α -雄甾烷的降解

由表 4 的数据可以看出:①5 α -雄甾烷为唯一碳

表 3 姥鲛烷 5 α -雄甾烷及六甲苯的降解
Table 3 Degrading rates of pristane, 5 α -androstane
and hexamethylbenzene

唯一碳源	浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	48h 降解率/%
5 α -雄甾烷	50	2
姥鲛烷	2	97
六甲苯	2	0

表 4 5 α -雄甾烷的降解对比试验

Table 4 Experiments of contrast for the degrading of 5 α -androstane

条件	浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	去除率/%	
		唯一碳源	非唯一碳源
24h(供氧充足)	2	64	81
48h(供氧充足)	2	77	100
48h(限氧)	2	7.5	64
48h 空白(供氧充足)	2	49	49

源时(浓度 2mg/L), 在供氧充足的通气状态下, 可以被 C-14-1 菌株降解; 在限氧的密闭状态下, 则很难降解。②当有其它正烷烃存在时, 5 α -雄甾烷更容易被 C-14-1 菌株降解, 供氧充足通气培养 48h 时去除率达到 100%, 即使在限氧的密闭状态下降解率也较高。

这是因为 5 α -雄甾烷为难降解物质, 作为单一底物时, C-14-1 菌株增殖缓慢, 少量的微生物对其降解有限。而当其它正烷烃存在时, 可促使 C-14-1 菌株大量增殖, 从而有利于 5 α -雄甾烷的降解。因此, 对烷烃高效降解菌 C-14-1 而言, 用 5 α -雄甾烷作为烷烃降解试验的预加内标是不合理的。

3 结论

(1) C-14-1 菌株对低浓度的正烷烃系列具有较高的降解能力。在 48h 对碳原子数为 10~ 22 的烷烃, 降解率基本上大于 85%。该菌株对浓度很低的原油也具有一定的降解效果。

(2) 以姥鲛烷作为唯一碳源, 且试验体系处于密闭状态时, C-14-1 菌株对其降解率可高达 97%。

(3) 当有其它正烷烃存在时, 5 α -雄甾烷易于被 C-14-1 菌株降解, 供氧充足通气培养 48h 时去除率达到 100%, 即使在限氧的密闭状态下降解率也

较高。

参考文献:

[1] Sorkhoh N A, Ghannoum M A, Ibrahim A S, *et al.* Crude oil and hydrocarbon degrading strains of *Rhodococcus rhodochrous* isolated from soil and marine environments in Kuwait [J]. Environ. Pollut. , 1990, **65**(1): 1~ 7.

[2] Vecchioli G I, Del Panno M T, Paineira M T. Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil [J]. Environ. Pollut. , 1990, **67**(3): 249~ 258.

[3] 丁克强, 郑昭佩, 孙铁珩, 等. 石油污染土壤的生物降解研究 [J]. 生态学杂志, 2001, **20**(4): 16~ 18.

[4] 王晓娟, 金鑫, 顾宗镡. 机油降解菌的筛选及其降解能力的研究 [J]. 复旦大学学报(自然科学版), 2001, **40**(5): 562~ 567.

[5] 王红旗, 刘敬奇, 齐永强. 土壤石油污染物中正构烷烃降解特性研究 [J]. 上海环境科学, 2004, **23**(3): 93~ 95.

[6] 叶新荣, 胡锡钢, 陈忠元, 等. 海洋微生物对石油烃降解研究 II. 石油烃降解细菌对正烷烃的降解作用 [J]. 东海海洋, 2000, **18**(1): 21~ 27.

[7] 金志刚, 张彤, 朱怀兰. 污染物生物降解 [M]. 上海: 华东理工大学出版社, 1997.

[8] 张亚雷. 难降解有机废水(腈纶废水) 处理工艺及其污染物生物降解性能研究 [D]. 上海: 同济大学, 1999.

[9] 杨池银, 卢鸿, 张枝焕, 等. 千米桥地区上第三系严重生物降解石油的高分子量(> C35) 正烷烃 [J]. 科学通报, 2002, **47**(14): 1103~ 1107.

[10] Yanik P J, O' Donnell T H, Macko S A, *et al.* The isotopic compositions of selected crude oil PAHs during biodegradation [J]. Organic Geochemistry, 2003, **34**(2): 291~ 304.

[11] 彭先芝, 张干, 陈繁忠, 等. 好氧生物降解中烷烃单体稳定同位素分馏及其环境意义 [J]. 科学通报, 2004, **49**(24): 2605~ 2611.

[12] Wilkes H, Boreham C, Harms G, *et al.* Anaerobic degradation and carbon isotopic fractionation of alkylbenzenes in crude oil by sulphate reducing bacteria [J]. Organic Geochemistry, 2000, **31**(1): 101~ 115.

[13] Zhang Yalei, Zhao Jianfu, Gu Guowei. Biodegradation kinetic of organic compounds of acrylic fiber wastewater in biofilm [J]. J. of Environ. Sci. , 2003, **15**(6): 757~ 761.

[14] 曹微寰, 徐德强, 张亚雷, 等. 烷烃降解菌的筛选及其降解能力 [J]. 中国环境科学, 2003, **23**(1): 25~ 29.

[15] Bushnell L D, Haas H F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms [J]. Journal of Bacteriology, 1941, **41**(5): 653~ 673.