

鼠李糖脂对微生物降解正十六烷以及细胞表面性质的影响

陈延君¹, 王红旗^{1*}, 王然², 云影¹

(1. 北京师范大学水科学研究院水沙科学教育部重点实验室, 北京 100875; 2. 北京师范大学环境学院, 北京 100875)

摘要: 使用大庆油田石油污染土壤中分离出的优势菌种(蜡状芽孢杆菌 DQ01 和芽孢杆菌 DQ02), 在实验室可控条件下, 研究了生物表面活性剂鼠李糖脂对微生物降解正十六烷以及降解菌生长、菌体表面疏水性和外表形态的影响。结果表明, 鼠李糖脂可以提高正十六烷的降解率, 48 h 时蜡状芽孢杆菌 DQ01 和芽孢杆菌 DQ02 对正十六烷的降解率比未加鼠李糖脂的体系分别增加了 8.1% 和 11.6%。正十六烷培养基中的鼠李糖脂能引起菌体表面疏水性的明显增大, 且低浓度鼠李糖脂的这种能力明显优于高浓度鼠李糖脂, 蜡状芽孢杆菌 DQ01 和芽孢杆菌 DQ02 分别在加入 0.4 mmol/L 和 0.2 mmol/L 鼠李糖脂时疏水性最大。尤其是芽孢杆菌 DQ02 在对数生长后期 BATH(bacterial adherence to hydrocarbon)达到 44%, 远大于未加鼠李糖脂时的 BATH。但在葡萄糖培养基中鼠李糖脂并没有明显影响菌种的生物量和 BATH。另外, 加入鼠李糖脂后, 2 株菌的培养基接触角比未加鼠李糖脂的培养基接触角均减小了约一半。未加入鼠李糖脂的菌体细胞表面比较光滑, 且菌体之间独立生长, 而加入鼠李糖脂后影响了降解菌的外表形态, 菌体细胞表面略显粗糙且相互粘连, 有助于细胞与疏水性有机物的接触。

关键词: 鼠李糖脂; 正十六烷; 疏水性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)09-2117-06

Effects of Rhamnolipid on the Biodegradation of *n*-Hexadecane by Microorganism and the Cell Surface Hydrophobicity

CHEN Yan-jun¹, WANG Hong-qi¹, WANG Ran², YUN Ying¹

(1. Key Laboratory for Water and Sediment Sciences of Ministry of Education, College of Water Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 2. School of Environment, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: The experiments were made in laboratory to analyze the effects of rhamnolipid on the biodegradation of *n*-hexadecane and the cell surface hydrophobicity using the microorganism (*Bacillus cereus* DQ01 and *Bacillus* sp. DQ02). The results show that the optimal concentrations range of rhamnolipid were 0.4 mmol/L and 0.2 mmol/L, respectively, which can obviously enhance BATH(bacterial adherence to hydrocarbon). The degradation of *n*-hexadecane by *Bacillus cereus* DQ01 and *Bacillus* sp. DQ02 were increased 8.1% and 11.6%, respectively, within 48 h in the presence of the rhamnolipid than that of in the absence of the rhamnolipid. The growth of two strains and BATH increased with obviously in the presence of the rhamnolipid. Especially BATH of *Bacillus* sp. DQ02 was 44% in the presence of rhamnolipid, which was better than BATH of *Bacillus cereus* DQ01 without rhamnolipid. In contrast, glucose experiments showed that addition of rhamnolipid did not have much impact on growth of both strains and cell surface hydrophobicity. Moreover, the interfacial tension decreased with the addition of rhamnolipid. The rhamnolipid-treated cells had a rougher texture than the untreated cell.

Key words: rhamnolipid; *n*-hexadecane; hydrophobicity

石油的泄漏在勘察、开采和运输等过程中难以避免, 因此石油污染物的修复处理对消除环境污染、保障人体健康有着重要意义^[1]。微生物修复作为一种经济有效的去除石油污染的手段, 已成为最具有发展潜力的治理方法^[2], 但对于疏水性强的长链烷烃和芳香烃等石油烃类化合物, 生物可利用性差是限制其生物修复速率的关键因素^[3,4]。利用表面活性剂的增溶作用, 可以提高疏水性污染物在水相中的表现溶解度, 从而提高污染物的生物可利用性而促进其降解^[5]。生物表面活性剂作为微生物产生的一类新型表面活性剂, 不仅具有同化学表面活性剂相当的表面活性和乳化性能, 而且具有低毒和易于

生物降解等诸多优点^[6,7], 因此在环境工程领域特别是土壤、水体修复中的应用得到了越来越多的关注^[8,9]。

针对生物表面活性剂可增强污染物生物可利用性的作用机理, 以往的研究主要考察了生物表面活性剂对污染物在水相中的增溶作用^[10,11], 对污染物降解的影响^[12,13], 以及生物表面活性剂对污染物在

收稿日期: 2006-10-27; 修订日期: 2006-12-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(40472129)

作者简介: 陈延君(1978~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为水、土环境污染控制与治理, E-mail: yanjun_chen1222@126.com

* 通讯联系人, E-mail: whongqi310@sohu.com

有机相和水相之间传质的影响^[14,15],而对降解体系中添加生物表面活性剂后,其作用于微生物细胞表面而影响细胞表面性质的研究较少.本研究通过添加鼠李糖脂考察了生物表面活性剂对降解菌生长、表面疏水性、外表形态以及对培养基表面张力的影响,探讨了鼠李糖脂在强化石油烃污染物生物降解中,与微生物细胞的作用过程和作用机理,以期生物表面活性剂在石油烃污染场地生物修复中的应用提供理论支持.

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

正十六烷(99%,天津试剂研究所); Na_2HPO_4 (分析纯), KH_2PO_4 (分析纯), NH_4Cl (分析纯), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (分析纯), CaCl_2 (分析纯), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (分析纯), H_3BO_3 (分析纯), $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (分析纯), ZnSO_4 (分析纯)购自北京化工厂;鼠李糖脂由中国海洋大学化学化工学院提供.UV-240型紫外可见分光光度计(上海精密科学有限公司);THZ-C型恒温振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);JGW-360a接触角测量仪(河北省承德实验机有限责任公司);J-25型高速离心机(美国BECKMAN公司);S-4800型高分辨场发射扫描电镜(日本日立公司).

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的培养和降解实验

实验用微生物是从大庆油田石油污染土壤中分离出的优势菌种,用16S rRNA基因序列分析,鉴定为蜡状芽孢杆菌DQ01(*Bacillus cereus* DQ01)和芽孢杆菌DQ02(*Bacillus* sp. DQ02).无机盐培养基为:0.4% Na_2HPO_4 , 0.15% KH_2PO_4 , 0.1% NH_4Cl , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001 5% CaCl_2 ,微量元素培养基(每100 mL溶液包含0.5 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.0 mg H_3BO_3 , 1.0 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7.0 mg ZnSO_4),去离子水定容到1 000 mL,115℃湿热灭菌20 min.葡萄糖液体培养基:0.15% K_2HPO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5%蛋白胨,1%葡萄糖,去离子水定容到1 000 mL,115℃湿热灭菌20 min.正十六烷培养基:在无机盐培养基中加入一定浓度的正十六烷,将10%菌液接种于100 mL培养基的250 mL三角瓶中,在恒温振荡器中150 r/min,30℃避光进行培养.

降解实验正十六烷的初始浓度为2 mg/L.将培养一定时间的降解液以4 000 r/min离心10 min,然后用无机盐培养基清洗2次,上清液以正己烷为提

取液,采用超声萃取的方法提取培养液中的正十六烷,用无水硫酸钠过滤去除水分后,旋转蒸发以正己烷定容至刻度线,加入内标充分混合后使用气相色谱仪测定正十六烷含量.烷烃降解率=(培养体系中烷烃的初始浓度-测定正十六烷的含量)/初始浓度 $\times 100\%$.基质加标回收率控制在71.1%~85.4%,符合US EPA标准(70%~130%)的要求.

1.2.2 细菌生长量的测定

用移液枪移取培养液底部的菌液,用紫外可见光分光光度计在波长600 nm处测定吸光度A值,以测得的浊度表示菌体的生长量(去离子水为空白).

1.2.3 微生物疏水性的测定^[16]

将处于生长中期的细胞5 mL在4℃下以6 000 r/min离心10 min,然后用无机盐培养基清洗2次,之后细胞在无菌盐培养基中重悬, A_{600} 为0.4~0.6,然后加入100 μL 正十六烷,在30℃培养10 min后,试管漩涡混匀120 s,在30℃下放置15~60 min使充分分层.上层水相小心移入另一个试管中,测 A_{600} .菌种的疏水性(bacterial adherence to hydrocarbon, BATH)的百分率:[1-(混合后的 A_{600} /混合前的 A_{600})] $\times 100\%$.BATH百分率的范围为0~100%,结果越大表示疏水性越好.

1.2.4 接触角的测定

将培养液离心(6 000 r/min, 10 min, 4℃),取上清液滴于疏水性材料的底板上,用液滴法测量接触角并照相^[17].

1.2.5 扫描电镜

将15 mL培养液离心(4 500 r/min, 10 min, 4℃),在菌中加入磷酸缓冲戊二醛溶液至高出2倍,3 h后用磷酸盐缓冲液洗3次,每次15 min;然后分别用30%、50%、70%、80%、90%酒精进行洗涤,每次15 min,最后用纯酒精洗涤3次,每次15 min;用乙酸异戊酯洗涤2次,每次15 min;然后立刻送至电镜室进行临界点干燥处理;最后镀铂金10~20 nm,用扫描电镜观察^[16].

2 结果与讨论

2.1 不同浓度鼠李糖脂对BATH的影响

在葡萄糖培养基中加入0.1、0.2、0.4、0.8、1、2、4 mmol/L鼠李糖脂,菌种培养48 h后测定疏水性的变化,得到BATH的变化结果如图1所示.

结果显示,未加鼠李糖脂时蜡状芽孢杆菌DQ01的BATH值为21.9%,芽孢杆菌DQ02的BATH值为29.1%,说明蜡状芽孢杆菌DQ01的疏水性较差.蜡

状芽孢杆菌 DQ01 在加入 0.4 mmol/L 鼠李糖脂时, 菌种的疏水性略有增大, 随着加入鼠李糖脂浓度的增大菌种的疏水性呈下降趋势. 当加入 0.2 mmol/L 鼠李糖脂时芽孢杆菌 DQ02 的疏水性达到最大. 可见, 低浓度的鼠李糖脂促进菌种增大疏水性的能力明显优于高浓度的鼠李糖脂, 确定蜡状芽孢杆菌 DQ01 和芽孢杆菌 DQ02 分别在加入 0.4 mmol/L 和 0.2 mmol/L 鼠李糖脂时疏水性最大.

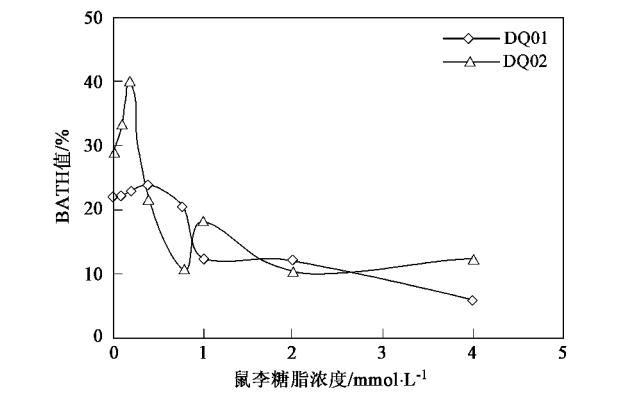


图 1 鼠李糖脂浓度对 BATH 的影响

Fig.1 Effect of rhamnolipid on BATH of two strains

2.2 鼠李糖脂对微生物降解正十六烷的影响

图 2 表示添加和未加鼠李糖脂时, 菌株对正十六烷的降解情况. 从图 2 中可以看出, 降解体系中加入鼠李糖脂提高了正十六烷的降解率. 48 h 时蜡状芽孢杆菌 DQ01 和芽孢杆菌 DQ02 对正十六烷的降解率比未加鼠李糖脂的体系分别增加了 8.1% 和 11.6%. 相比较而言, 芽孢杆菌 DQ02 中鼠李糖脂对正十六烷降解的增强效果更为明显. 鼠李糖脂使烷

烃降解率提高的原因可能是表面活性剂通过乳化增溶作用, 有效降低油/水界面张力, 并将烷烃液滴分散成小微粒, 从而大大增大菌细胞与油滴之间的接触机会^[18].

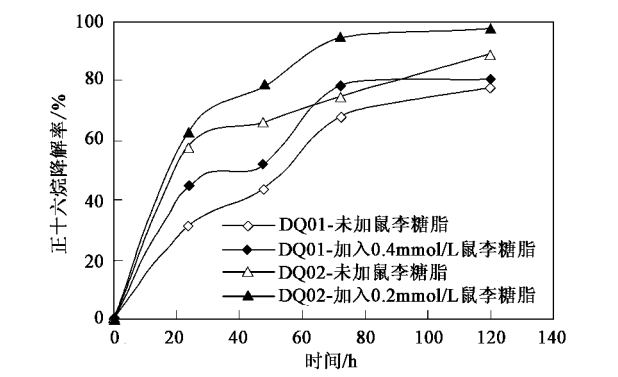


图 2 鼠李糖脂对菌种降解正十六烷效率的影响

Fig.2 Effect of rhamnolipid on the biodegradation of hexadecane

2.3 鼠李糖脂对不同时期菌种生长和 BATH 变化的影响

分别在蜡状芽孢杆菌 DQ01 和芽孢杆菌 DQ02 的正十六烷培养液中加入 0.4 mmol/L 和 0.2 mmol/L 鼠李糖脂, 测定不同时期菌种生物量和 BATH 的变化, 如图 3、4.

如图 3(a)所示, 在葡萄糖培养基中加入鼠李糖脂, 72 h 之前可以促进蜡状芽孢杆菌 DQ01 的生长, 120 h 之后菌种不再继续生长. 96 h 后加入鼠李糖脂可以略微提高芽孢杆菌 DQ02 的生物量. 相比而言, 在 2 株菌的整个生长过程中, 正十六烷培养基中的鼠李糖脂可以刺激菌株的生长, 尤其是芽孢杆菌 DQ02 在 48 h 后生物量明显增大[见图 3(b)].

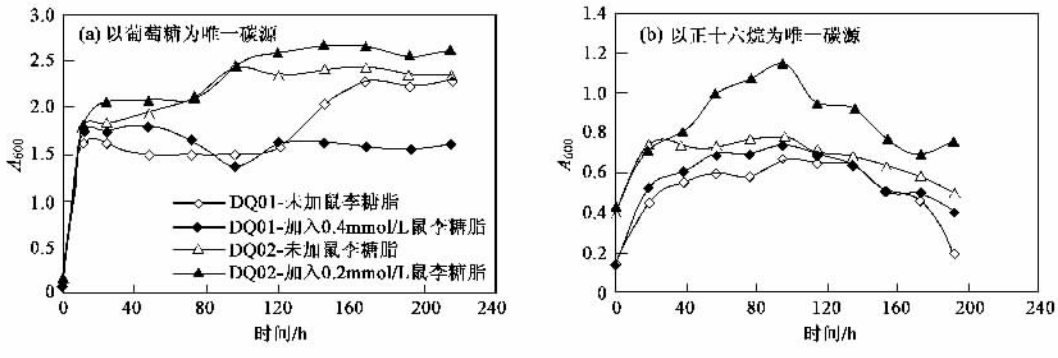


图 3 鼠李糖脂对 2 菌株的生长影响

Fig.3 Growth of two strains in the presence or absence of rhamnolipid

鼠李糖脂会影响 2 株菌在以葡萄糖为碳源的培养基中的 BATH, 通过图 4(a)可以看出, 蜡状芽孢杆

菌 DQ01 在不加入鼠李糖脂以葡萄糖为碳源的培养基中, 在整个生长阶段疏水性都较低. 相对而言, 加

入鼠李糖脂有助于提高细菌表面的疏水性,但效果并不明显.芽孢杆菌 DQ02 本身具有一定疏水性,加入鼠李糖脂后 BATH 略有升高,但效果同样不明显.鼠李糖脂并没有明显影响葡萄糖培养基中菌种的 BATH,但引起了菌种在正十六烷培养基中表面疏水性的明显增大,如图 4(b)所示,芽孢杆菌 DQ02 在对数生长后期 BATH 达到 44%,在 216 h 时仍为 28%,大于未加鼠李糖脂时的 BATH.在不加入鼠李糖脂时,蜡状芽孢杆菌 DQ01 的疏水性在整个实验期间都没有超过 16%.加鼠李糖脂初期表面疏水性增加缓慢,在稳定生长期达到 19%.可见以正十六烷为碳源时,加入鼠李糖脂有助于提高 BATH.这主要是

因为加入鼠李糖脂可以通过改变吸附界面的特性来调节微生物细胞与有机物界面之间的亲和力,将憎水性界面转换为亲水性,从而有利于微生物细胞的吸附和生长.这与 Ragher 等人研究的结论是一致的^[16].在正十六烷的培养基中,与芽孢杆菌 DQ02 相比,加入的鼠李糖脂只是略微提高了蜡状芽孢杆菌 DQ01 的生物量和 BATH.这可能是因为,一方面生物表面活性剂虽然可以通过调节细胞表面的疏水性能来影响微生物细胞与烃类之间的亲和力,但另一方面蜡状芽孢杆菌 DQ01 细胞与生物表面活性剂分子长期接触,可能会对膜结构造成一定的破坏,干扰正常的摄取同化机制^[19].

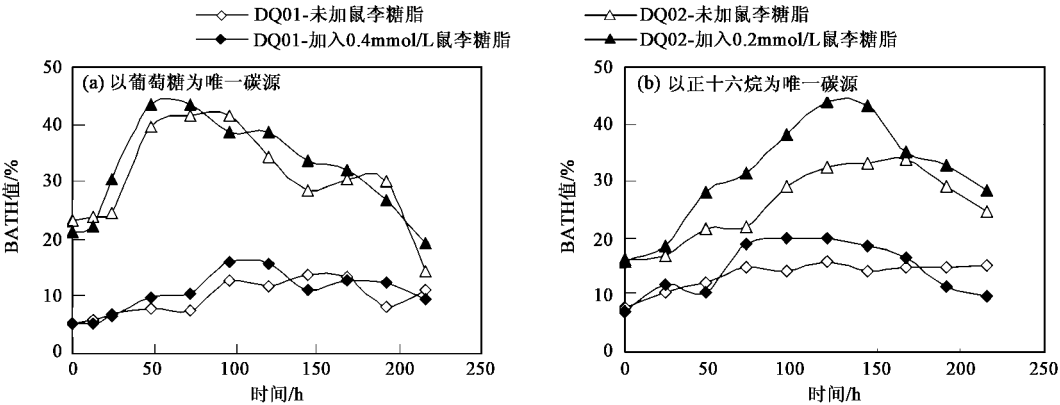


图 4 鼠李糖脂对 2 菌株 BATH 的影响

Fig.4 BATH of two strains in the presence or absence of rhamnolipid

2.4 正十六烷培养基接触角的测定

如图 5、6 所示,菌体生长 72 h 后,用液滴法测定正十六烷培养基对疏水性材料的接触角,未加入鼠李糖脂时,蜡状芽孢杆菌 DQ01 培养基的接触角是 67°24',芽孢杆菌 DQ02 培养基的接触角是35°30',

可见芽孢杆菌 DQ02 培养基自身的表面张力小于蜡状芽孢杆菌 DQ01,与图 1 中未加鼠李糖脂时 2 株菌的 BATH 结论一致.加入 0.4 mmol/L鼠李糖脂时蜡状芽孢杆菌 DQ01 培养基的接触角为 33°48',加入 0.2 mmol/L鼠李糖脂时芽孢杆菌 DQ02 培养基的接

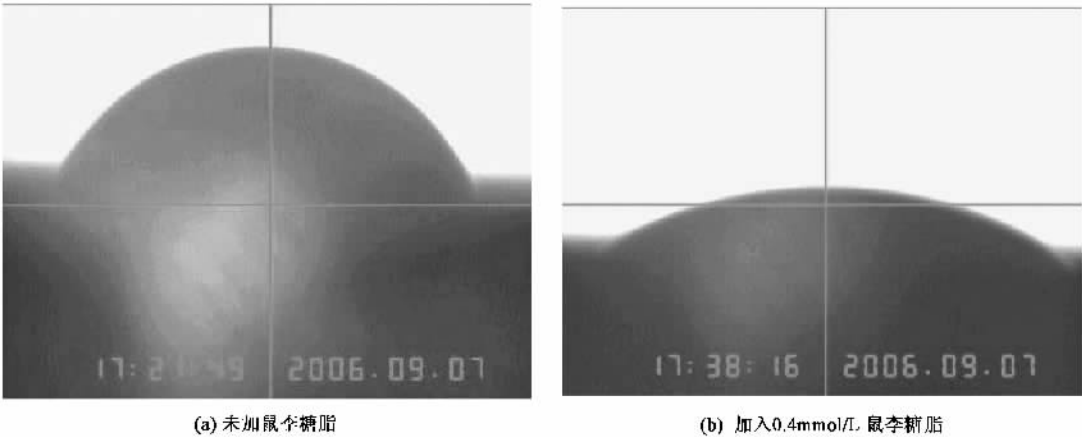


图 5 蜡状芽孢杆菌 DQ01 的培养基液滴图像

Fig.5 Dripping picture of DQ01's culture medium

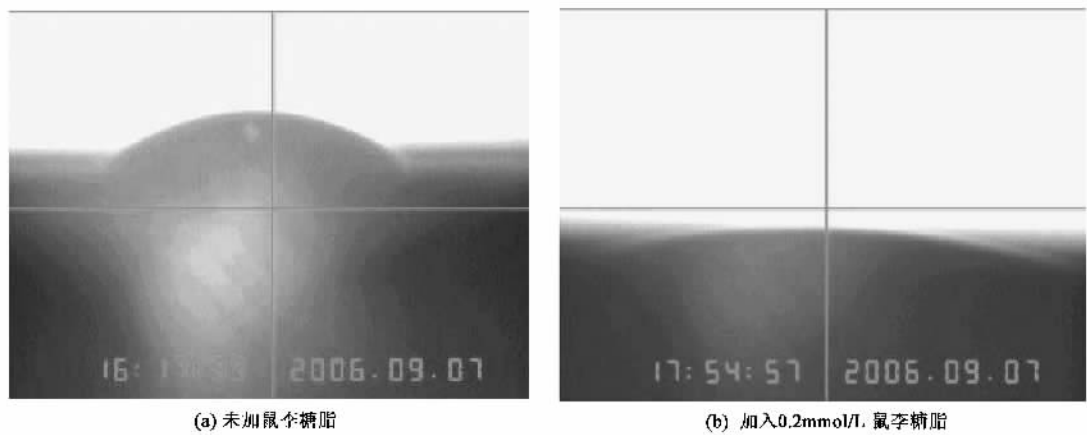


图 6 蜡状芽孢杆菌 DQ02 的培养基液滴图像
Fig.6 Dripping picture of DQ02's culture medium

触角为 17°54′, 均比未加入鼠李糖脂的 2 株菌培养基的接触角减小了约一半, 说明加入鼠李糖脂后明显减小了整个培养基的表面张力, 使微生物能容易地接触到液体.

2.5 扫描电镜图

如图 7(a)所示, 未加入鼠李糖脂的芽孢杆菌 DQ02 细胞表面比较光滑, 菌种之间独立生长, 而加入鼠李糖脂后培养的菌种细胞表面略显粗糙, 而且菌种之间粘连在一起, 如图 7(b)所示. Ragher 的研究表明鼠李糖脂能引起细胞表面亲水性脂多糖类物质的流失, 取而代之的是憎水性较强的磷脂类物质,

细胞表面憎水性增大, 菌细胞与烃类化合物之间的结合力大大增强^[16]. 另外有研究表明, 菌细胞生物膜的磷脂与表面活性剂有类似的结构和性能, 因而细胞膜对表面活性剂具有较强的吸附作用^[20]. 因此, 菌种表面粗糙并且粘连一方面可能是因为脂多糖类物质流失的缘故, 另一方面应该是细胞膜被吸附的表面活性剂连在一起. 可见, 加入鼠李糖脂可以改变微生物表面的形态和性质, 使细胞与疏水性有机物的结合力增强, 这有利于提高污染物的降解速率. 相同的结果在蜡状芽孢杆菌 DQ01 的扫描电镜图中也可以看到(电镜图不再列出).

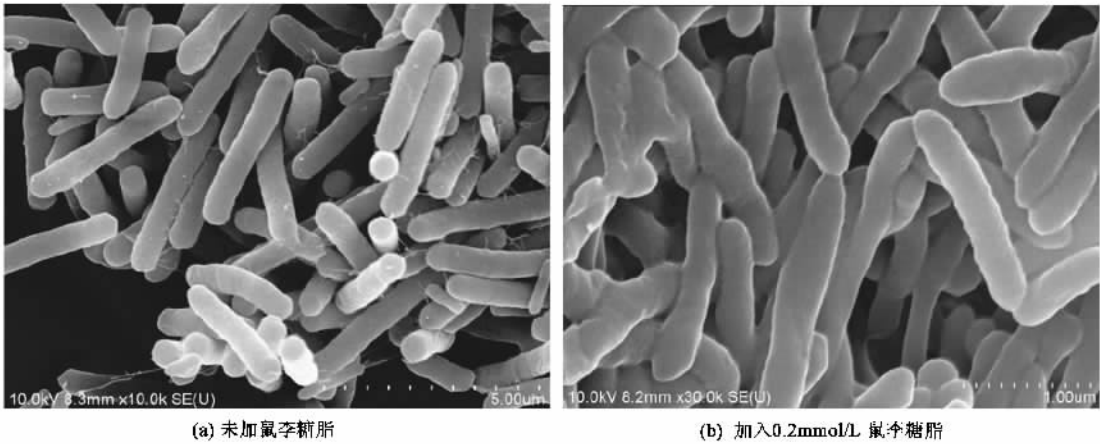


图 7 芽孢杆菌 DQ02 的扫描电镜图
Fig.7 Scanning electron micrograph of *Bacillus* sp. DQ02

3 结论

(1)低浓度的鼠李糖脂促进菌种增大疏水性的能力明显优于高浓度的鼠李糖脂, 蜡状芽孢杆菌

DQ01 和芽孢杆菌 DQ02 分别在加入 0.4 mmol/L和 0.2 mmol/L鼠李糖脂时疏水性最大.

(2)降解体系中加入鼠李糖脂提高了正十六烷的降解率, 相比较而言芽孢杆菌 DQ02 中鼠李糖脂

对正十六烷降解的增强效果更为明显。

(3)鼠李糖脂并没有明显影响葡萄糖培养基中菌种的生物量和 BATH,但正十六烷培养基中的鼠李糖脂可以刺激 2 株菌的生长,引起菌种表面疏水性的明显增大,尤其是芽孢杆菌 DQ02 在对数生长后期 BATH 达到 44%,在 216 h 时仍为 28%,大于未加鼠李糖脂时的 BATH。

(4)加入鼠李糖脂,2 株菌培养基的接触角均比未加入鼠李糖脂培养基的接触角减小了约一半,说明加入鼠李糖脂后明显减小了整个培养基的表面张力,使微生物能容易地接触到液体。

(5)未加入鼠李糖脂的菌种细胞表面比较光滑,菌种之间独立生长,而加入鼠李糖脂后影响了降解菌的外表形态,菌种细胞表面略显粗糙,而且菌种之间粘连在一起,有助于细胞与疏水性有机物的接触。

致谢:在研究过程中得到了中国海洋大学化学化工学院梁生康老师和北京师范大学化学学院汪辉亮老师的热心帮助,在此表示衷心的感谢。

参考文献:

- [1] 胡晓芳,夏福军,朱南文,等. 原油污染土壤德生物法修复效果研究[J]. 环境化学,2006,25(5):593~598.
- [2] 张小啸,王红旗,刘敬奇,等. 土壤微生物对苯的降解研究[J]. 环境科学,2005,26(6):148~152.
- [3] 华兆哲,陈坚,伦世仪,等. 石油烷烃与生物表面活性剂生产的相关性研究及进展[J]. 石油化工,1998,27(12):925~929.
- [4] 谢丹平,尹华,彭辉,等. 生物表面活性剂对菌 XD-1 降解原油的作用[J]. 暨南大学学报,2004,25(3):365~369.
- [5] 钱欣平,阳永荣,孟琴,等. 生物表面活性剂对微生物生长和代谢的影响[J]. 微生物学通报,2002,29(3):75~78.
- [6] Bognlo G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1999, 152(2):41~52.

- [7] 董亮,戴树桂. 憎水性污染物在表面活性剂溶剂中的增溶动力学[J]. 环境科学,2000,21(1):27~31.
- [8] Chen J, Wang X J. Numerical simulation of PAHs sorption/desorption on soil with the influence of Tween80[J]. Journal of Environment Sciences, 2006, 18(4):716~720.
- [9] 陈坚,华兆哲,伦世仪. 生物表面活性剂在环境生物工程中的应用[J]. 环境科学,1996,17(4):84~87.
- [10] 朱利中,冯少良. 混合表面活性剂对多环芳烃的增溶作用及机理[J]. 环境科学学报,2002,22(6):774~778.
- [11] Doong R, Lei W. Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant[J]. Journal of Hazardous Materials, 2003, 96(1):15~27.
- [12] 杨建刚,刘翔,余刚,等. 非离子表面活性剂 Tween20 对菲生物降解的影响[J]. 环境科学,2004,25(1):53~56.
- [13] 戴芳,曾光明,袁兴中,等. 生物表面活性剂在农业废物好氧堆肥中的应用[J]. 环境科学,2005,26(4):181~185.
- [14] Kollmer A, Schmid A. On liquid mass transfer in two-liquid-phase fermentations[J]. Bioprocess Environment, 1999, 20:441~448.
- [15] Li Y Y, Zheng X L. Influence of biosurfactant on the diesel oil remediation in soil-water system[J]. Journal of Environmental Sciences, 2006, 18(3):587~590.
- [16] Al-Tahhan Ragher A, Sandrin T R, Bodour A A, et al. Rhannolipid-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] 周春隆. 仪器分析在有机颜料行业中的应用[J]. 上海染料, 2004, 32(3):39~44.
- [18] Ron E Z, Rosenberg E. Biosurfactants and oil bioremediation[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13:249~252.
- [19] Kuyukina M S, Ivshina I B, Makarov S O, et al. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system[J]. Environment International, 2005, 31(2):155~161.
- [20] Mihelcic J R, Lueking D R. Bioavailability of sorbed- and separate-phase chemicals[J]. Biodegradation, 1993, 4:141~153.