

生物表面活性剂产生菌降解石油废水的研究

黄文

(湖南第一师范学院 数理系, 湖南 长沙 410205)

摘 要: 从含油废水中筛选分离到 1 株生物表面活性剂产生菌 B-1, 鉴定为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。对该菌株降解石油废水的能力进行研究。结果表明: B-1 菌株对石油的最高降解率可达 87.25%; 菌株能利用石油产生大量的脂肽类生物表面活性剂, 可使菌体表面疏水性呈下降趋势, 疏水性最高为 0.677; B-1 菌株还能有效降低污染物分子与表面活性剂分子之间及石油烃与间隙水之间的界面张力, 从最初的 65.74 mN/m 下降到最低的 32.19 mN/m; B-1 菌株的乳化性能较好, 18 d 后乳化指数仍达到 81.16%, 能产生较好的增溶效果, 使非水溶性石油烃类物质的有机相与水相的接触面积大大增加。

关 键 词: 假单胞菌属; 石油废水; 降解率; 生物表面活性剂

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)04-0461-04

Studies on degradation of oil wastewater by biosurfactant-producing bacteria

HUANG Wen

(Department of Science, Hunan First Normal University, Changsha 410205, China)

Abstract: A biosurfactant-producing bacteria strain designated as B-1 was separated from oil wastewater and identified as *Pseudomonas* sp. The oil degrading capacity of strain B-1 was studied. The results indicated that the highest degradation rate of oil was 87.25%. Massive peptide-lipid biosurfactant could be produced from oil by strain B-1, which made the surface hydrophobicity of bacteria increase and the highest surface hydrophobicity value tested was 0.677. The interfacial tension of pollutants and surfactant molecules could be effectively reduced by Strain B-1, and the surface tension of fermentation broth decreased gradually from 65.74 mN/m to 32.19 mN/m. In addition strain B-1 presented good emulsification performance with 81.16% of the total volume still emulsified after 18-day operation, which could improve solubility, thus increase contact area between aqueous phase and water-insoluble petroleum hydrocarbons organic phase.

Key words: *Pseudomonas* sp.; oil wastewater; degradation rate; biosurfactants

微生物通过一定条件培养后, 其代谢过程中会分泌具表面活性的产物^[1], 这种生物表面活性剂能有效乳化、润湿、分散、溶解疏水性物质, 降低体系的表/界面张力^[2]。有研究^[3]表明, 多种微生物包括细菌、真菌在培养过程中会生成不同类型的生物表面活性剂, 依其结构不同可分为糖脂、脂肪酸、磷脂、脂肽、脂蛋白、糖-蛋白复合物等多种类型。

与化学合成表面活性剂相比, 生物表面活性剂具有低毒性、易生物降解和极端环境的高选择性等优良特性^[4]。生物表面活性剂可以促使石油废水中的烃类物质乳化、分散, 并改变细胞表面的疏水性, 增加难溶烃类化合物在水中的溶解度, 乳化油类以利于油类与微生物接触, 从而促进石油烃的降解^[5-7]。笔者从湖南省某石油化工厂含油废水中筛选得到

收稿日期: 2011-02-24

基金项目: 湖南省科学技术厅项目(2009NK3093)

作者简介: 黄文(1967—), 女, 湖南长沙人, 硕士, 副教授, 主要从事环境生物技术研究, hwx24703@yahoo.com.cn

1株生物表面活性剂产生菌,对其进行鉴定,并对该菌在降解石油废水过程中的疏水性、表面张力和乳化性能等的变化进行研究,以期对石油废水污染的生物降解提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

石油废水取自湖南省某石油化工厂,含油废水中主要包括悬浮固体、胶体、分散油、浮油及溶解物质,属多相体系。

无机盐培养基^[8]: $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.0 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, NH_4NO_3 1.0 g/L, $CaCl_2$ 0.02 g/L, $FeCl_3$ 痕量, pH 7.5。

石油培养基^[8]: 无机盐培养基+原油2 g/L, pH 7~7.5。

LB培养基^[9]: 牛肉膏 0.3 g/L, 蛋白胨1 g/L, NaCl 0.5 g/L, 琼脂 2 g/L, pH 7.0。

1.2 方 法

1.2.1 菌种的筛选和分离

含油废水1 mL稀释后,涂布于石油培养基平板上,培养3~5 d后,挑出单菌落菌株在LB培养基平板上划线分离,获得石油降解菌。将纯化的石油降解菌接入石油培养基,摇床振荡培养72 h后,选择能较强乳化原油、静置后乳化状态最稳定的菌株,根据文献[10]对其形态特性及生化特性进行鉴定。

1.2.2 菌株对石油的降解能力的测定

菌悬液按2%的接种量加至石油培养基中,32℃下培养432 h,每隔24 h测定发酵液中残留的石油烃的质量浓度、菌株的含量、生物表面活性剂含量、发酵液的疏水性、表面张力和乳化性能。

1) 石油降解率的测定。采用重量法^[11]测定发酵液中残留的石油含量。

2) 菌体生长量的测定。菌体生长量以600 nm波长处发酵液的吸光度表示。

3) 生物表面活性剂含量的测定。发酵液置于10 000 r/min, 4℃离心20 min,去除菌体,上清液

用HCl调pH为2.0,4℃静置12 h后,10 000 r/min,4℃离心30 min,收集沉淀,用少量pH2.0的HCl洗涤沉淀,用1 mol/L NaOH将沉淀调pH至7.0,再离心收集沉淀,经减压蒸干后准确称量^[12]。

4) 菌体表面疏水性的测定。采用文献[13]方法,测定菌体表面疏水性,其值越大表示疏水性越好,范围为0~1。

5) 菌体表面张力的测定。采用JYW-200A型全自动界面张力仪测定发酵液的表面张力。

6) 发酵液乳化性能的测定。发酵液离心(10 000 r/min, 30 min)后,取上清液7 mL,加入3 mL液体石蜡充分振荡1 min,静置24 h,观察乳化层高度及稳定性,计算乳化指数。乳化指数=(乳化层高度/油相高度)×100%。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选与鉴定结果

经过平板培养和摇瓶试验,筛选到1株能以原油为碳源生长,并对原油有较强乳化效果的细菌。经鉴定,该菌属假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.),命名为B-1。

2.2 菌株对石油的降解率

将菌株接种至石油培养基中,测定菌株产生物表面活性剂对石油的降解率,结果(图1)表明,石油的降解率随着培养时间的延长而不断升高,到第15天时达87.25%。在随后的第16~18天内降解率基本维持稳定,保持在87%左右。

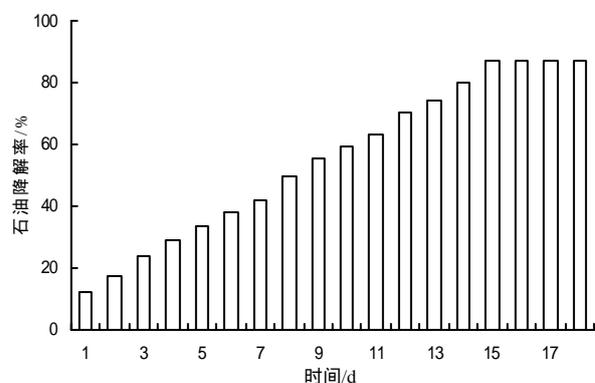


图1 菌体产表面活性剂对石油的降解率
Fig. 1 Degradation of oil by biosurfactants released by bacteria strain

2.3 菌株产表面活性剂产生量的变化

将菌株接种至石油培养基中,定时测定发酵液中的菌浓度和表面活性剂产量,结果(图2)显示,接种后第2天,菌株逐渐生长,同时开始产生表面活性剂,到第15天,菌株生长量达到最大,第16天后,菌株的浓度逐渐下降,生物表面活性剂的产生量与菌株的生长趋势一致。

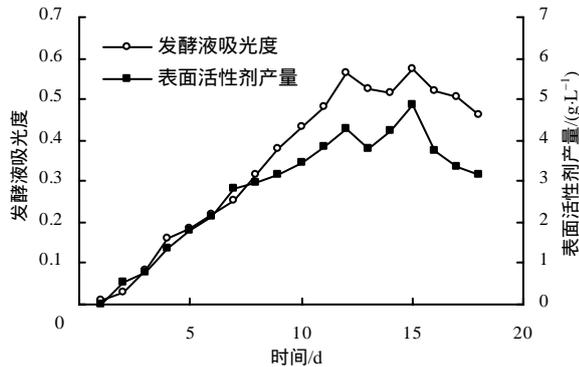


图2 降解石油过程中菌株生长量和表面活性剂产量

Fig.2 Biosurfactants released by bacterial strain during degradation of oil

2.4 菌体表面疏水性的变化

疏水性是影响细菌吸收和降解疏水性有机物质的主要因素^[14]。由图3可知,培养15 d内,菌体表面疏水性不断升高,疏水性最高为0.677。在培养后期,细菌逐渐死亡,菌体活性降低,无法吸附到非水有机物的表面,造成细菌疏水性能下降。

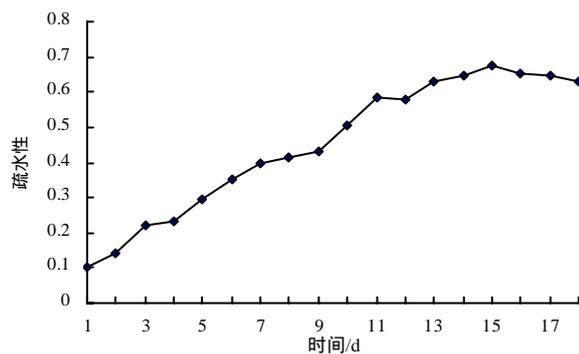


图3 菌体表面疏水性的变化

Fig.3 The change of bacteria surface hydrophobicity

2.5 菌体表面张力的变化

发酵液表面张力的变化如图4所示。随着菌体的生长,发酵液表面张力逐渐下降,从最初的65.74 mN/m下降到最低的32.19 mN/m,表明该菌在发酵过程中产生表面活性物质。细菌在利用各种烃

类物质时,为了使烃类通过外层亲水细胞壁进入细胞被降解酶降解,常以产生表面活性剂促进烃类溶解的方式解决这一问题。发酵液中污染物分子与表面活性剂分子之间及石油烃与间隙水之间的界面张力的下降,加大了石油烃类物质从固相到水相的迁移速度,从而提高石油烃的降解率。在培养的后期,发酵液表面张力变化不大,这是由于菌体的死亡导致生物表面活性剂产量下降,而石油废水中有机物质也在此时消耗殆尽。表面张力的变化进一步证明了菌体对石油的降解有促进作用。

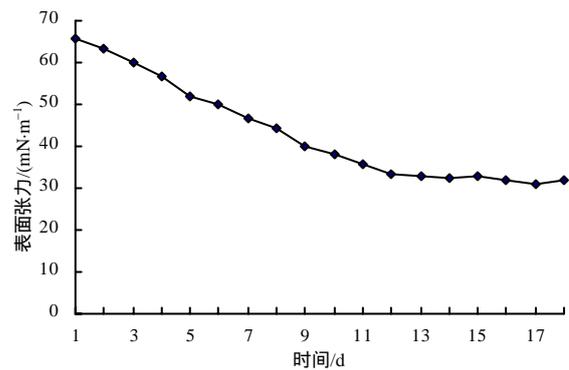


图4 发酵液表面张力变化

Fig.4 The change of bacteria surface tension

2.6 发酵液乳化性能的变化

由图5可知,接种1 d后,菌株的乳化指数迅速上升,到第3天,乳化指数即达到最大值(90.37%)。随着时间延长,乳化指数有所下降,但下降非常缓慢,18 d后乳化指数仍可保持在80.16%。有研究^[15]表明,24 h乳化指数大于50%即表示菌株具有较强的乳化能力和乳化稳定性,能够促使疏水性石油烃离散为许多微粒分散于水中,起到增溶的作用,有利于微生物充分接触污染物,提高石油降解率。结果表明,筛选鉴定的菌株乳化性能较好,能产生较好的增溶效果。

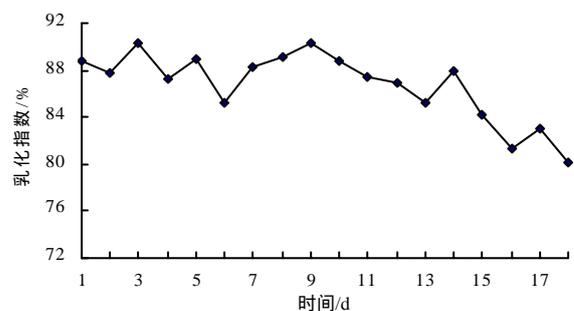


图5 菌株所产生生物表面活性剂的乳化指数

Fig.5 Emulsifiability of the biosurfactant produced by bacteria strain

参考文献:

- [1] Vethamony P, Sudheesh K, Babu M T, et al. Trajectory of an oil spill off Goa, eastern Arabian Sea: Field observations and simulations[J]. *Environmental Pollution*, 2007, 148(2): 438–444.
- [2] 桑义敏, 李发生, 何绪文, 等. 含油废水性质及其处理技术[J]. *化工环保*, 2004, 24(z1): 94–97.
- [3] Das Palashpriya, Mukherjee, Soumen Sen, et al. Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: An overview [J]. Nottingham University Press, 2008, 25(1): 165–185.
- [4] 赵淑梅, 郑西来, 高增文, 等. 生物表面活性剂及其在油污生物修复技术中的应用[J]. *海洋科学进展*, 2005, 23(2): 234–238.
- [5] Wan Mohd Fazli, Wan Nawawi, Parveen Jamal M D, et al. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 9241–9247.
- [6] Hayyan A, Alam M Z, Mirghani M E S, et al. Production of biodiesel from sludge palm oil by esterification process [J]. *J Energy Power Eng*, 2009, 4(1): 11–17.
- [7] Bharali P, Konwar B K, Thakur A J. Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(5): 682–690.
- [8] Bognolo G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons[J]. *Colloids and Surfaces(A)*, 1999, 152(1): 41–52.
- [9] 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.
- [10] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [11] 环境污染分析方法科研协作组. 环境污染分析方法[M]. 北京: 科学出版社, 1980: 276–298.
- [12] 任春艳, 聂麦茜, 王蕾, 等. 微生物表面活性剂对烃类污染物降解的促进作用[J]. *环保科技*, 2009(4): 44–48.
- [13] Asha A Juwarkar, Anupa Nair, Kirti V Dubey, et al. Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils [J]. *Chemosphere*, 2007, 68(10): 1996–2002.
- [14] Najafi A R, Rahimpour M R, Jahanmiri A H R, et al. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology[J]. 2010, 163(3): 188–194.
- [15] Jane YiiWu, Kuei Ling Yell, Lu Wei Bin, et al. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeluginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99: 1157–1164.

责任编辑: 罗慧敏