

生物表面活性剂和化学表面活性剂对多环芳烃蒽的生物降解作用研究

欧阳科, 张甲耀, 戚琪, 陈玲, 邓欢欢

(武汉大学资源与环境科学学院, 湖北 武汉 430072)

摘要: 在非常高的蒽浓度下, 用高效液相色谱测定了不同的表面活性剂条件下蒽高效降解菌降解蒽的情况。结果表明, 使用表面活性剂能极大地促进蒽的降解, 而相同条件下生物表面活性剂效果要优于化学表面活性剂。在不加表面活性剂、加入十二烷基磺酸钠、加入吐温-20及加入生物表面活性剂产生菌四种情况下, 经过6 d的降解, 蒽的浓度分别从 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降至 $214, 199.2, 138.7$ 和 $114.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 分别降解了 $36, 50.4, 111.3$ 和 $135.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 显示了极强的降蒽能力。说明使用单一的降解菌效果不太明显, 将蒽降解菌和产表面活性剂产生菌接合构成一个混合菌群使用时, 效果非常明显。

关键词: 生物表面活性剂; 化学表面活性剂; 高效液相色谱; 多环芳烃蒽; 生物降解

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672 - 2043(2004)04 - 0806 - 04

Difference of Biodegradation Processes of Anthracene in the Presence of Biosurfactants and Chemical Surfactants

OUYANG Ke, ZHANG Jia-yao, QI Qi, CHEN Ling, DENG Huan-huan

(College of Resources and Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Biodegradation for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) is very diverse. As bioremediation by surfactants is often used to accelerate solubility of PAHs, we researched anthracene's degradation in the presence of different surfactants. The results indicated that using surfactants was able to accelerate the degradation of PAHs greatly. In the meantime, the Biosurfactants exhibited an excellent efficacy than did chemical surfactants. For example, in the presence of no surfactants, added SDS, added Tween-20 and inoculated bacteria which can produce surfactants, after 6 days, the corresponding concentration of anthracene was reduced from initial $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ to $214 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $199.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $138.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $114.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively, showing strongly ability of degradation of anthracene by the added xenobiotics.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); surfactants; high performance liquid chromatography; degradation ratio

多环芳烃(简称PAHs)是有两个或两个以上苯环, 在环境中难以降解的有机有毒化合物^[1]。有关资料表明70%~80%的癌症与环境中的化学致癌物有关, 而多环芳烃就是其中最引人注目的一大类^[2]。蒽是一种难降解的三环芳烃, 由于其不溶于水, 在环境中的生物降解性很差, 在生物修复中, 人们经常使用表面活性剂来促进多环芳烃的溶解。在加入表面活性

剂后, 蒽的水溶性会大大提高。表面活性剂含有一个亲水基团和一个亲脂基团, 趋向于液相与另一种极性和氢键力不同的液相或气相的界面(如水油界面、水气界面), 在界面形成分子层, 降低界面能量(界面张力)或表面张力, 从而使多环芳烃更容易溶解^[3]。很多的化学表面活性剂表面性质优良, 都能促进蒽的溶解, 但化学表面活性剂往往成本较高, 用量大, 容易对环境造成二次污染, 在这种情况下, 近年来生物表面活性剂在环境修复中的应用受到越来越广泛的关注。与化学表面活性剂相比, 生物表面活性剂除具有降低表面张力、稳定乳化液等相同的作用外, 还具有

收稿日期: 2003 - 11 - 11

基金项目: 国家自然科学基金项目(20077021)

作者简介: 欧阳科(1978—), 男, 硕士生, 现从事环境生物学研究。

E-mail: oykl0220000@hotmail.com

联系人: 张甲耀

一般化学表面活性剂不具备的特点,如无毒,能够被生物完全降解,用量少,成本低等,具有广阔的应用前景^[4]。本文在用蒽的高效降解菌来降解蒽的同时,加入了生物表面活性剂产生菌以及离子型表面活性剂十二烷基磺酸钠和非离子型表面活性剂吐温-20。结果显示,生物表面活性剂的效果明显好于化学表面活性剂,且该表面活性剂性能优良,适用于极端环境下的应用,为生物表面活性剂在环境修复中的应用提供了理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

1.1.1 表面活性剂产生菌铜绿假单胞菌

由武汉大学典型培养物保藏中心提供(*Pseudomonas aeruginosa*), 高效蒽降解菌从武汉染料厂的染料污泥中分离,并通过富集培养、紫外和超声波诱变后得到。

1.1.2 培养基

表面活性剂产生菌培养基: 葡萄糖 1g, 牛肉膏 0.5g, 酵母膏 0.5g, 蛋白胨 1g, NaCl 0.5g, 水 100 mL, pH 7.2。

蒽高效降解菌培养基: NH_4Cl 1.0 g, MgSO_4 0.064 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.6 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 8 g, H_2O 1 000 mL, pH 7.0, 将 250 mg 蒽溶于 18.75 mL N, N-二甲基甲酰胺(DMF)中(每 75 μL DMF 含 1 mg 蒽),再将其倒入培养基中振荡混匀。

1.1.3 蒽降解摇瓶实验

将 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下活化隔夜的 2 种菌株按照 10% 的量分别接种于相应的培养基中置于 180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床上培养。

1.2 仪器

HP1000 系列高效液相色谱, CQ-250 型超声振荡器, 摇床, 灭菌锅, 离心机, K-100 表面张力仪(德国 KRUSS 公司产), 电子天平。

1.3 色谱分析条件

色谱柱为 EclipseXPB-C18 柱, 4.6 \times 150 mm, 美国 Agilent 公司产。柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 流速 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测器为荧光检测器(FLD), 激发波 250 nm, 发射波 430 nm。流动相为 90% 甲醇 + 10% 水。4 元泵。

1.4 试剂

蒽、甲醇为色谱纯, 二氯甲烷为分析纯, 试验用水为 2 次重蒸水, 十二烷基磺酸钠和吐温-20 为分析纯。

1.5 试验方法

1.5.1 蒽标样配制

准确称取 10 mg 蒽溶于 100 mL CH_2Cl_2 中, 然后精确倍比稀释, 得到蒽的系列标准溶液。

1.5.2 生物表面活性剂提取和浓度测定^[5]

取培养 6 d 的发酵液, 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 上清液用浓 HCl 调 pH 至 2.0, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜, 离心收集沉淀, 将沉淀溶于 CH_2Cl_2 , 用滤纸过滤, 滤液加 HCl 调 pH 值至 2.0, 得到的沉淀即为表面活性剂, 干燥后准确称量。

1.5.3 降解试验

实验分 4 个平行组进行, 1 组只加入蒽高效降解菌而不加表面活性剂, 2 组加入离子型表面活性剂十二烷基磺酸钠, 3 组加入非离子型表面活性剂吐温-20, 4 组加入生物表面活性剂产生菌。4 个组在相同条件下测定其降解情况。

配制 600 mL 高效蒽降解菌的培养基, 取 200 mL, 加入 100 mg 的十二烷基磺酸钠混匀后平均分装于 4 个三角瓶中, 编号分别为 1~4 号。另取 200 mL 加入 100 mg 吐温-20, 混匀后平均分装于 4 个三角瓶中, 编号分别为 5~8。剩下的 200 mL 平均分装于 4 个三角瓶中, 编号分别为 9~12。另外配制 4 瓶 50 mL 表面活性剂产生菌的培养基, 在其中加入除水以外蒽降解菌培养基的其它成份, 编号为 13~16。将 16 个瓶在 121 $^{\circ}\text{C}$ 条件灭菌 20 min 后冷却, 接种 1 mL 经过活化的高效蒽降解菌液。其中 1, 5, 9 和 13 为第 1 组, 降解 3 d; 2, 6, 10 和 14 为第 2 组, 降解 4 d; 3, 7, 11 和 15 为第 3 组, 降解 5 d; 4, 8, 12 和 16 为第 4 组, 降解 6 d; 将各组菌液在 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速下离心 20 min 除去菌体, 上清液加 50 mL 二氯甲烷, 超声提取 20 min, 得到的 CH_2Cl_2 溶液备 HPLC 用。

2 结果与讨论

标准曲线如图 1, 蒽的单标色谱图如图 2 所示。

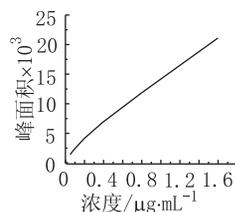


图 1 蒽标准曲线

Figure 1 Standard curve of peak areas against amounts of anthracene injected into HPLC

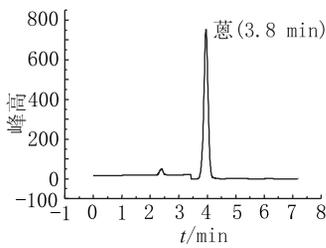


图2 蒽的标样色谱图

Figure 2 Chromatographic diagram of anthracene

2.1 样品分析

经过测定,在第5 d,表面活性剂的浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。16个样品的蒽浓度和相应的降解率如表1所

表1 加入4种类型表面活性剂蒽降解率随时间的变化

Table 1 Degradative rates of anthracene against time in the presence of 4 added surfactants

表面活性剂的类型	降解 3 d		降解 4 d		降解 5 d		降解 6 d	
	残留量 $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	降解率 $/\%$						
不添加表面活性剂	244.5	2.2	234.5	6.2	221.4	11.6	214.0	14.4
加入十二烷基磺酸钠	226.7	9.32	218.1	12.76	207.4	17.04	199.2	20.32
加入吐温-20	231.5	7.4	182.4	27.04	154.7	38.12	138.72	44.5
加入生物表面活性剂产生菌	246.2	1.52	227.8	8.88	150.3	39.88	114.8	54.08

从表1中可见两种化学表面活性剂均极大地促进了蒽的降解。相比而言,非离子型表面活性剂吐温-20的效果又明显好于离子型表面活性剂十二烷基磺酸钠。

(2) 生物表面活性剂强化降解作用

从表中可见,在前3 d,加入生物表面活性剂产生菌的降解率仅为1.52%,第4,5,6 d的降解率分别为8.88%,39.88%,54.08%。这是因为表面活性剂产生菌产生表面活性剂有一个过程,在这个过程中,表面活性剂浓度从小变大,逐渐增加,因而增溶效果也逐渐增大,降解率也相应提高。在第4 d到第5 d降解率有一个飞跃,这可能是因为表面活性剂浓度达到其临界胶束浓度,从而使得增溶效果达到最大。

(3) 两类表面活性剂强化降解作用的比较

从表1中可以看到,前3 d,加入化学表面活性剂后的降解效果好于生物表面活性剂,随着时间的推移,生物表面活性剂产量的提高,并且效果要比化学表面活性剂效果持久。

2.2 生物表面活性剂的表面性质

2.2.1 临界胶束浓度(CMC)值

临界胶束浓度(CMC)值见图3。

由图3可知,表面活性剂的CMC值是 $32.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

示。

由表1可知表面活性剂极大地促进了蒽的降解。

(1) 化学表面活性剂的强化降解作用

从表1中可见,加入吐温-20后第3 d降解率为7.4%,第4 d为27.04%,出现一个飞跃。这是因为在这个系统中,降解效果取决于2个方面:一是表面活性剂对蒽的增溶脱附作用,二是降解菌的降解能力。由于蒽降解菌降解蒽获得生长的能量是各种酶催化提供的,在蒽的诱导下降解菌分泌酶需要一定的时间^[6],当降解菌开始分泌这种酶并达到一定浓度时,蒽的降解就会出现一个飞跃。

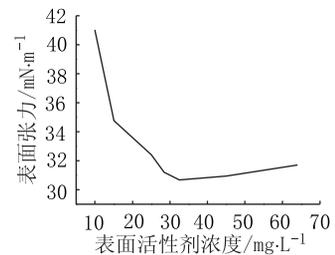


图3 临界胶束浓度与表面张力的关系

Figure 3 Relationship between surface force and critical colloid concentration

L^{-1} 。

2.2.2 不同pH值对表面活性剂表面张力 r_s 的影响

pH值分别为3,5,7,9和11时测得的表面张力 r_s 值分别为38.7,37,31,31.7和36 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$,其值均较低,变化不大,表明该表面活性剂对pH值有较广泛的适应范围。

2.2.3 不同温度对表面张力 r_s 的影响

常温下(25℃时 r_s 为 $30.7 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, 50℃~90℃时 r_s 为 $30.9 \sim 31.8 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) 温度对生物表面活性剂的影响较小,即使在100℃高温下,其表面张力值为 $35.5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$,与室温时相差不大。

2.2.4 NaCl浓度对表面张力 r_s 的影响

从试验结果可见,该表面活性剂对盐亦有较高的耐受性,在 NaCl 浓度为 $0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, r_s 为 $30.7 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$;即使 NaCl 浓度升至 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,其表面张力值也仅为 $32.5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$,变化不大。

3 结 论

在生物修复多环芳烃污染时,往往要使用表面活性剂来促进其降解。本文所使用的 2 种菌株都具有良好的性能,高效菌降解菌能够在极高的菌浓度下生存 ($250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),并且降解能力较强,在单独使用菌的情况下 6 d 内可降解 $36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的菌,与生物表面活性剂配合使用,6 d 内可以降解 $135.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的菌,效果非常显著。而表面活性剂产生菌所产的表面活性剂性质优良,能耐高温,有广泛的温度和酸碱度适应性,并且有较高的耐盐度,在多环芳烃的生物降解过程中的增溶降解性能又优于化学表面活性剂,在生物修复尤其是土壤修复中有很大的实用价

值。

参 考 文 献:

- [1] Jacob J Karcher W. Polycyclic aromatic hydrocarbons of environmental and occupational importance[J]. *Fresenius E Anal Chem*, 1986, 323: 1 - 10.
- [2] 张士权,于晓丽,张 江. 测定油气田污染源中的多环芳烃[J]. 油气环境保护,1996,6(3): 58 - 61.
- [3] Sarney D B, Bulfen E N. Application of enzymes to the synthesis of surfactants[J]. *Trends Biotechnol*, 1995, 13: 164 - 172.
- [4] 马歌丽,彭新榜,马翠卿,许 平. 生物表面活性剂及其应用[J]. 中国生物工程杂志,2003,23(5): 42 - 45.
- [5] Yakimov M M, Timmis K N. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by the thermotolerant and halotolerant subsurface bacillus ickeniformis BAS50 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(5): 1706 - 1713.
- [6] Sims R C, Overcash M R. Fate of polynuclear aromatic compounds in soil - plant systems[J]. *Residue Reviews*, 1981, 88: 1 - 68.