

Burkholderia cepacia X4 降解油脂特性研究*

秦华明¹ 尹华^{1**} 张娜¹ 梁世中²

(暨南大学环境工程系 广州 510632) (华南理工大学生物科学与工程学院 广州 510641)

摘要 :从长期受油污染的土壤中分离筛选得到的 *Burkholderia cepacia* X4 菌株能高效降解油脂。该菌株降解油脂的最适温度和 pH 分别为 30℃ 和 7.0, 菌株降解油脂时适宜的氮源为硫酸铵, 适宜碳氮比为 4:1。共基质碳源的添加有利于生物量的迅速增加和油脂降解率的提高, 添加适量的葡萄糖能使油脂降解率提高 8% ~ 10%。50 mg/L Ca²⁺ 对菌株生长和油脂降解更有利。在橄榄油浓度高达 20g/L 条件下最大油脂降解率仍可达 83%。在油脂浓度 ≤ 2500mg/L 时, 该菌对油脂的降解符合抑制动力学 Monod 方程。

关键词 洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*) 生物降解 油脂

中图分类号 :X172 文献标识码 :A 文章编号 :0253-2654(2007)03-0500-04

Biodegradation of Oil and Grease by *Burkholderia cepacia* X4*

QIN Hua-Ming¹ YIN Hua^{1**} ZHANG Na¹ LIANG Shi-Zhong²

(Department of Environmental Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632)

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

Abstract Strain *Burkholderia cepacia* X4 was isolated from long time oil polluted soil, which was able to degrade oil and grease effectively. The optimal temperature and pH for oil degradation were 30°C and 7.0 respectively. The suitable nitrogen source, C/N and Ca²⁺ for strain growth and oil degradation were (NH₄)₂SO₄ 4:1 and 50mg/L respectively. Addition of co-substrate carbon source increased biomass and oil degradation rate. With proper quantities of glucose, the oil degradation rate is increased by 8% ~ 10%. When the concentration of olive oil reach 20g/L, the maximum oil biodegradation rate can still reach 83%. Oil degradation by *Burkholderia cepacia* X4 followed Monod kinetics model in case of olive oil ≤ 2500mg/L.

Key words :*Burkholderia cepacia*, Biodegradation, Oil and grease

油脂废水是一个重要的水污染源^[1]。目前对于这类废水的处理,物理方法如筛滤、沉淀、隔油等和化学方法如絮凝、吸附、电解等具有投资大、流程复杂、且存在二次污染的可能。微生物能将油脂作为生长的碳源和能源物质利用,从而消除油脂污染。因此,对油脂废水进行微生物处理,操作简便,费用低廉,特别是不产生二次污染,倍受人们关注^[2-7]。目前,在微生物对油脂的降解研究中,日本、欧美一些发达国家已将油脂降解菌应用到含油废水的处理、生物垃圾处理 and 生物柴油的生产等多项领域,而我国对于这些方面的应用尚处于探索阶段。

我们从长期受油污染的土壤中分离筛选到 1

株能利用橄榄油为唯一碳源进行生长的细菌 *Burkholderia cepacia* X4,并对菌株降解油脂的特性进行研究,为其在生物处理油脂污染中的应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)X4 菌株^[7]。

1.2 培养基

斜面培养基:牛肉膏蛋白胨培养基。

种子培养基:橄榄油(主要成分为油酸) 5g,酵母浸膏 2g,蛋白胨 10g, KH₂PO₄ 2g, (NH₄)₂SO₄ 2g,

* 国家自然科学基金项目(No. 50578070)

** 通讯作者 Tel: 020-85220564, E-mail: ohjgc@jnu.edu.cn

收稿日期: 2006-08-22, 修回日期: 2006-11-17

Na_2HPO_4 2g, MgSO_4 0.2g, CaCl_2 0.1g, 定容至 1L, pH 7.0~7.4。

降解培养基: 橄榄油(主要成分为油酸)20g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g, Na_2HPO_4 2g, KH_2PO_4 2g, 定容至 1L, pH 7.0~7.4(其它成分视需要改变)。

1.3 实验方法

种子培养: 选取保存在斜面上的菌苔 1 环, 接到盛有 50mL 种子培养基的 250mL 三角瓶中, 于 30℃ 下培养 24h, 摇床转速 200r/min。

降解试验: 向 250mL 锥形瓶中装入降解培养基, 培养基成分(如碳源、氮源等)和体积可依据需要进行调整, 灭菌后将 5mL 种子液接入其中, 一定条件下培养 24h, 摇床转速 200r/min。

油脂含量测定: 采用紫外分光光度法^[8]。

生物量测定: 干重法。

2 结果与讨论

2.1 培养基初始 pH 值对菌种降解油脂的影响

调整降解培养基的初始 pH 值分别为 4、5、6、7、8、9, 接种后在 30℃ 恒温摇床上振荡培养, 定时取样测定菌体干重和油脂降解率, 结果见图 1。

从图 1 中可以看出, 菌株在 pH 为 7 时生物量和油脂降解率最高, 说明培养基初始 pH 值为 7 时有利于菌种的生长繁殖和油脂的降解; 初始 pH 值过高或过低对菌体的生长和油脂的降解都不利。值得注意的是, pH 值为 7 和 8 时的油脂降解率相差很小。有资料表明^[9], 脂肪酶对甘油三酯脂肪酸酯的催化水解反应是亲核反应, 因此, 偏碱性的环境有助于酶的活性。

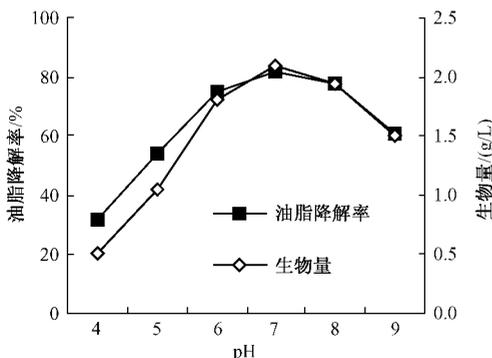


图 1 初始 pH 值对生物量和油脂降解率的影响

2.2 培养温度对菌种生长和降解油脂的影响

在固定初始 pH 值为 7 的情况下, 接种后分别

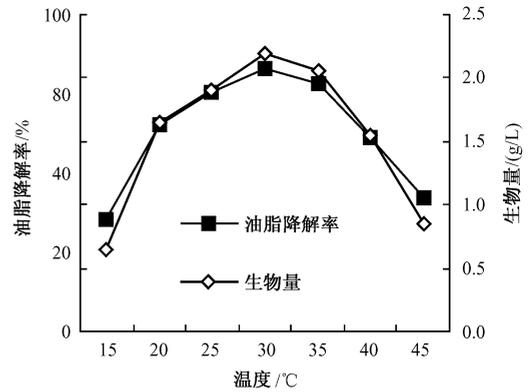


图 2 温度对生物量和油脂降解率的影响

在 15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃ 和 45℃ 条件下恒温摇床上振荡培养, 定时取样测定菌体干重和油脂降解率, 结果见图 2。图 2 的结果说明, 菌株在 30℃ 条件下生长最好, 降解效率最高, 低于或高于 30℃ 时对菌株 X4 的生长和油脂的降解都不利。

2.3 氮源对菌种性能的影响

为了确定有利于菌体生长和降解油脂的最佳氮源, 选取氯化铵、硫酸铵、尿素、硝酸铵、乙酸铵和牛肉膏进行实验。结果见图 3。

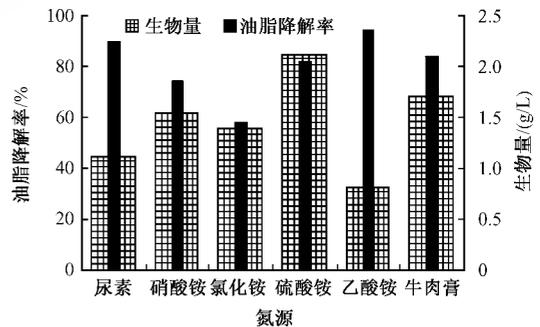


图 3 氮源对油脂降解率和生物量的影响

由图 3 可以看出, 对于油脂降解率而言, 最高的是硫酸铵, 其次是牛肉膏和硝酸铵, 以尿素和乙酸铵为氮源油脂降解率最低。以生物量指标评价, 以乙酸铵和尿素为氮源时最高, 其次才是硫酸铵。对于尿素和乙酸铵而言, 它既能提供给氮源, 也能供给碳源, 而且作为碳源物质比油脂更易被菌体细胞利用, 因此表现出来的是虽然生物量高但实际油脂利用率却低。硫酸铵与氯化铵、硝酸铵相比, 能额外提供给 S 元素, 使菌体细胞更好地生长、代谢, 表现生物量和油脂降解率都较高。尽管牛肉膏的营养较丰富、平衡, 但营养总量提供在实验范围内有可能不足, 因此生物量和油脂降解率都不是最

高,而且在实际处理废水中,添加牛肉膏显然成本过高。

2.4 碳氮比对菌种降解性能的影响

元素分析表明,单细胞微生物的碳氮比一般在3:1~5:1之间,因此,有必要对菌种降解油脂所需的碳氮比做一研究,为在实际废水处理中科学地加入营养物质促进油脂的降解提供参考依据。实验比较了几种不同碳氮比情况下的菌体生长及油脂降解的影响,结果见图4。

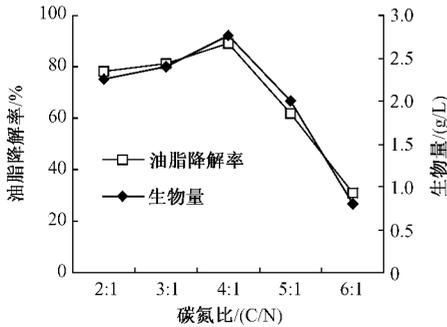


图4 碳氮比(C/N)对生物量和油脂降解率的影响

从图4中可以看出,当碳氮比在4:1时,菌株的生长是最好的,菌株对油脂的降解率也最大。另外,从图4可以看出,低于其最适碳氮比时,生物量和油脂降解率的变化趋势比高于其最适碳氮比的变化趋势要缓慢,说明氮源不足更影响微生物的生长和生理功能,从而影响微生物的降解功能和作用。这为在废水的实际处理时适量营养物质的添加奠定了基础。

2.5 无机离子对菌种性能的影响

无机盐是微生物生长非常重要的一类营养物质。有文献报道^[10], K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等对脂肪酶有促进作用,而 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 等离子则抑制脂肪酶的产生。本实验考察了 Ca^{2+} ($CaCl_2$ 的形式)对菌种性能的影响。图5的结果表明, Ca^{2+} 在

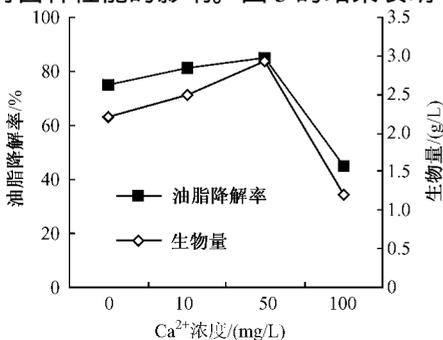


图5 Ca^{2+} 对生物量和油脂降解率的影响

50 mg/L浓度下菌株生长和油脂降解较好。

2.6 共基质初级碳源对菌种性能的影响

油脂的理化特性使其不容易被微生物利用,因此有必要对油脂与其它微生物容易利用的碳源物质的共基质生长做一研究。选择葡萄糖、淀粉、玉米粉和蔗糖进行实验。结果见表1。

表1 共基质初级碳源对X4菌生长和降解油脂的影响

	生物量(g/L)					油脂降解率/%				
	0	6	12	18	24	0	6	12	18	24
	(h)	(h)	(h)	(h)	(h)	(h)	(h)	(h)	(h)	(h)
对照	0.09	0.15	0.55	1.6	2.1	0	18	54	68	71
淀粉	0.09	0.35	1.2	2.1	2.6	0	9	24	46	80
葡萄糖	0.09	0.65	2.0	2.7	3.2	0	5	10	30	82
玉米粉	0.09	0.3	0.8	1.8	2.4	0	12	28	53	73
蔗糖	0.09	0.45	1.4	2.4	2.8	0	8	20	39	81

由表1可以看出,从生物量看,加入的几种不同的共代谢碳源对菌株的生长产生均积极的影响,尤其是葡萄糖引起的变化非常显著,但玉米粉引起的变化较小,说明相比葡萄糖、蔗糖和淀粉而言,菌种对玉米粉的利用较差。而从油脂降解率看,对照组(橄榄油为唯一碳源)中在前18h油脂降解率明显比添加其它碳源要高,这是因为该组培养基中油脂为唯一碳源和能源物质,菌体细胞只能利用油脂为碳源和能源物质。而在其它组中,除油脂外,还含有其它碳源物质,它们能溶解在水中,被微生物细胞优先利用,因此,在一定时间内,其中的油脂不被利用或较少利用,表现出油脂降解率低。到了24h,对照组的油脂降解率反而变成最低,而添加其它碳源物质的试验组中,油脂降解率比对照组均要高。其中添加葡萄糖组的油脂降解效率最高。

虽然有资料表明,碳源的种类通常对脂肪酶的生产无明显的影响,但脂肪酶的活力却受碳源种类的影响较大^[6]。从表1的结果来看,共基质碳源的添加有利于生物量的迅速增加和油脂降解率的提高。从经济的方面考虑,利用淀粉的成本比葡萄糖的低很多,马铃薯、玉米以及一些其他工业的副产品中都富含淀粉,在工业操作中,我们可以向油脂废水中加入一些淀粉加工废水,这样就有可能提高微生物对油脂的处理效率。

2.7 油脂降解的动力学

用不含碳源的培养基和一定量的菌悬液配成

50mL 溶液向其中加入不同量的橄榄油,使其浓度分别为 500mg/L、1000mg/L、1500mg/L、2000mg/L、2500mg/L。在 30℃、200r/min 条件下摇床中进行油脂降解实验。假设在实验开始后的 4h 小时内,菌量的增量很少,可以忽略,而且在这段时间内油脂的降解符合线性关系,通过计算不同浓度油脂降解的比基质去除速率,以计算所得值做图,结果如图 6 所示。

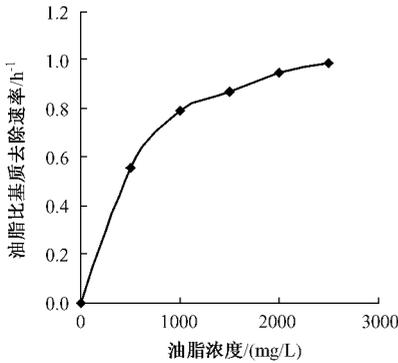


图 6 油脂降解动力学曲线

从图 6 中曲线的形状可以看出,在实验的油脂浓度范围内,油脂的比基质去除速率随着油脂浓度的升高而增大,由此可见,油脂的降解符合抑制动力学 Monod 方程。通过求图 7 中直线的斜率与截距,可得动力学参数 $\nu_{\max} = 1.2349\text{h}^{-1}$, $K_s = 396.98\text{mg}$ 。因此,菌株 X4 降解油脂的动力学方程为:

$$\nu = \frac{1.2349S}{396.98 + S}$$

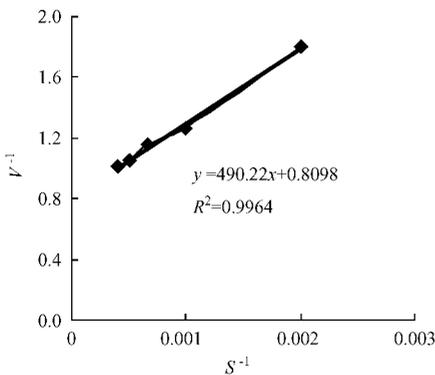


图 7 Monod 动力学曲线

3 结论

(1)从长期受油污染的土壤中分离筛选得到的 *Burkholderia cepacia* X4 菌株能高效降解油脂。

(2)该菌降解油脂的最适温度和 pH 分别为 30℃和 7.0,菌株降解油脂时适宜添加的氮源物质为硫酸铵。氮源不足更影响微生物的生长和生理功能,菌株生长和对油脂降解的适宜碳氮比为 4:1。共基质碳源的添加有利于生物量的迅速增加和油脂降解率的提高,适量的葡萄糖能使油脂降解率提高 8%~10%。50mg/L Ca²⁺ 对菌株生长和油脂降解更有利。在橄榄油浓度达 20g/L 条件下最大油脂降解率仍可达 83%。

(3)动力学实验表明,菌株 X4 对油脂的降解符合抑制动力学 Monod 方程,方程式为:

$$\nu = \frac{1.2349S}{396.98 + S}$$

参考文献

- [1] 徐亚同,史家梁,张明.污染控制微生物工程.北京:化学工业出版社,2001.
- [2] Wakelin N G, Forster C F. Bioresource Technology, 1997, 59(1): 37~43.
- [3] Kwaku T D, Sejiro F, Naoki O, et al. Bioresource Technology, 1999, 69(2): 133~139.
- [4] Loperena L, Saravia V, Murro D, et al. Bioresource Technology, 2006, 97(16): 2160~2165.
- [5] Cammarota M C, Freire D M G. Bioresource Technology, 2006, 97(16): 2195~2210.
- [6] 黄志立,任源,韦朝海,等.环境污染与防治,2001,23(4): 197~199.
- [7] 秦华明,王菊芳,朱明军,等.中国油脂,2003,28(11): 75~77.
- [8] 沈叔平,汪小梅.中国环境监测,1994,10(3): 4~7.
- [9] 陈小泉,夏纪鼎.日用化学工业,1995,4: 165~169.
- [10] 彭立凤.生物技术通报,1999,2: 17~22.