

新型润滑油生物降解性及其分析方法改进探讨

吴新世^{1*} 叶 锋² 张金涛³ 王 茜^{1,2} 刁虎欣³

(1. 天津理工大学生物工程系 天津 300191)

(2. 南开大学蓖麻工程研究中心 天津 300071)

(3. 南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘 要: 运用生物方法研究新型蓖麻油基润滑油的可降解性。通过反复实验,建立了该润滑油生物降解的基本分析方法,并与常规分析方法进行了比较。结果表明,此分析方法准确可靠,科学逻辑性更严密,且重复性好。利用筛选的最佳细菌 5-11-4 混合菌株,在最适降解条件下,采用该分析方法,微生物对该润滑油的降解率达到 88.37%,比常规分析方法高约 10.25%左右(常规分析方法的降解率约为 78.12%),体现了两种分析方法之间的差异。

关键词: 蓖麻油基润滑油, 生物降解性, 分析方法

Study on Biodegradability of a New-style Lube Oil and Improvement in Its Analytical Method

WU Xin-Shi^{1*} YE Feng² ZHANG Jin-Tao³ WANG Qian^{1,2} DIAO Hu-Xin³

(1. Department of Bioengineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300191)

(2. Research Center of Caster-oil Plant Engineering, Nankai University, Tianjin 300071)

(3. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract: Biodegradability evaluation for castor oil-based lube oil was carried out in the test. By repeated experiments, a basic analytical method for degradability of the lube oil was established and compared with the routine experimental method. The results showed that the basic analytical method was more logical and more reliable, and the experimental data have higher repeatability than the previous ones. Under the optimal culture conditions for the targeting strains 5-11-4, and according to the basic method, the degradation rate of the lube oil arrived to 88.37%, approximate 10.25 percent higher than the corresponding yield obtained by the routine experimental method (the value was about 78.12%), indicating the difference between the basic analytical method and the routine experimental one.

Keywords: Caster oil-based lube oil, Biodegradability, The basic analytical method

随着人类环保意识的提高,人们已开始密切关注润滑油可能造成的环境污染。润滑油在使用过程中不可避免地会通过泄漏、溢出或者不恰当的排放等途径进入周围环境中,造成严重的水体、土壤和

空气污染^[1]。目前,全世界对润滑油的消耗量逐渐增加,对环境的污染也在加剧,这些污染物严重影响了人类及其它生物的生存健康^[2,3]。为此,开发和使用可生物降解润滑油以及对润滑油进行生物降解可

* 通讯作者: ✉ webwxs@sina.com

收稿日期: 2007-10-14; 接受日期: 2008-01-17

行性评价已经成为润滑油行业发展的必然趋势。

蓖麻油基润滑油是以蓖麻油为主原料化学合成的一种新型润滑油,其主要成分为癸二酸二-2-辛酯、癸二酸多元醇酯等。针对其在生产和使用中可能造成的环境污染,应对其进行可降解性实验评价。为此,本实验欲达到两个研究目的:一是对该润滑油进行生物可降解性评价;二是在参考欧盟润滑油生物降解标准方法(CEC-L-33-A-93 实验方法)^[4]在借鉴国内生物降解常用方法^[5,6]的基础上,建立一套包括微生物培养及条件优化、样品预处理、检测方法选择,分析结果处理等切实可行的润滑油生物降解性评价分析的基本方法。并将该基本分析方法与国内常规分析方法进行可行性比较,以便找到该润滑油生物降解的最佳分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 微生物菌种:从大港油田 5-11-4 油井周围受污染的土壤中分离得到的、经过初筛降解蓖麻油基润滑油性能最好的 5-11-4 液体混合菌种。其活体菌浓度为 1.0×10^5 CFU/mL $\sim 1.0 \times 10^6$ CFU/mL。

1.1.2 培养基(g/L): KH_2PO_4 3.4, Na_2HPO_4 1.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.0, NaCl 1.6, MgSO_4 0.7, 牛肉膏 0.01, 自来水配制, pH 7.2~7.6^[6]。此无机盐基础培养基缺少碳源,应在不同的实验中根据需要量添加。

1.1.3 仪器与药品: Bio-Rad FTS 6000 傅立叶红外光谱仪,由美国 Bio-Rad 公司生产; J-25 型 Beckman 高速冷冻离心机,由美国 Beckman 公司生产; BS-IE 型控温振荡培养箱,由中国江苏省常州国华电器有限公司生产。

蓖麻油基润滑油,为机动车用高级润滑油,由中国天津南开大学蓖麻工程研究中心研究合成并提供;参比润滑油(降解率已知为 100%)由中国天津南开大学蓖麻工程研究中心提供;四氯化碳(CCl_4),光谱纯级,由天津市化学试剂一厂生产;无水硫酸镁(MgSO_4), AR 级,由天津市文达稀贵试剂化工厂生产。

1.2 方法

实验方案采用三组瓶-培养瓶、中性瓶、毒性瓶-培养法。为考察该方案的可行性,实验过程选用一已知降解率的润滑油作为参比油,同样进行本方案降解实验,以验证实验方案的可行性。

1.2.1 样品降解三组瓶实验过程:因本实验方案是通过检测碳氢化合物含量变化来表征该润滑油的生物可降解性,故实验过程中所用玻璃仪器要求用清水洗净后,均用洗液再次洗涤,以确保仪器壁内不含有碳氢类化合物^[4],避免产生干扰,下同。

1) 样品培养瓶培养:在 250 mL 锥形瓶中加入 1.1.2 配制的液体培养基 100 mL,加入 2 mL 蓖麻油基润滑油作为碳源,加入 1 mL 菌液。培养温度 30 ± 1 , 170 r/min~200 r/min 避光振荡培养 21 d。

2) 样品中性瓶培养:在 250 mL 锥形瓶中加入 1.1.2 配制的液体培养基 100 mL,加入 1 mL 菌液,不接润滑油。培养温度 30 ± 1 , 170 r/min~200 r/min 避光振荡培养 21 d。

3) 样品毒性瓶培养:在 250 mL 锥形瓶中加入 1.1.2 配制的液体培养基 100 mL,加入 2 mL 蓖麻油基润滑油做为碳源,不接菌。再加入浓度为 0.03 mol/L 的 HgCl_2 溶液^[4] 1.0 mL。培养温度 30 ± 1 , 170 r/min~200 r/min 避光振荡培养 21 d。

1.2.2 参比油品生物降解三组瓶实验:选择某一已知降解率的润滑油做为参比油品,其降解率公布值为 100%。

参比油样的降解培养方式与 1.2.1 相同。所不同的是将蓖麻油基润滑油换成参比油品。

1.2.3 国内常规实验方法:在进行实验方案验证的同时,用国内常规实验方法进行润滑油降解实验,并分析其降解效果与 1.2.1 结果的差别。

1) 样品培养瓶培养:在 250 mL 锥形瓶中加入 1.1.2 配制的液体培养基 100 mL,加入 2 mL 蓖麻油基润滑油做为碳源,灭菌。加入 1 mL 菌液。培养温度 30 ± 1 , 170 r/min~200 r/min 避光振荡培养 21 d。

2) 样品对照瓶培养:在 250 mL 锥形瓶中加入 1.1.2 配制的液体培养基 100 mL,加入 2 mL 蓖麻油基润滑油做为碳源,灭菌,不接入菌液。培养温度 30 ± 1 , 170 r/min~200 r/min 避光振荡培养 21 d。

将 1.2.1 的实验设计方案与国内常规实验方法进行优劣比较,分析哪种实验方案更具有合理性和科学性。

1.2.4 样品预处理:对于 1.2.1、1.2.2 和 1.2.3 中的实验样品在完成一个培养周期后分别用如下预处理方式进行处理:

培养液 8000 r/min 高速离心 15 min 沉淀去细胞

→ 取离心上清液, 用CCl₄作萃取剂共萃取 3 次, 每次CCl₄用量 50 mL, 剧振 5 min, 静置分层 → 收集萃取液下层有机相, 放入磨口瓶中, 加入无水MgSO₄约 10 g, 干燥 24 h → 取样, 红外检测。

1.2.5 红外检测: 用 Bio-Rad FTS 6000 傅立叶红外光谱仪测定 1.2.4 中萃取液的红外光谱, 波数范围 0 cm⁻¹~4000 cm⁻¹, KBr液池厚度 0.1 mm。采用基线法对IR图谱在 2930 cm⁻¹±10 cm⁻¹处的吸光度进行定量处理^[4]。

1.2.6 润滑油生物降解率计算: 1) 待测样品和参比油品降解三组瓶实验降解率计算

样品培养瓶样液IR吸收值 $r_{\text{培养}}$

样品中性瓶样液IR吸收值 $r_{\text{中性}}$

样品毒性瓶样液IR吸收值 $r_{\text{毒性}}$

则降解率计算公式:

$$W = \frac{r_{\text{毒性}} - (r_{\text{培养}} - r_{\text{中性}})}{r_{\text{毒性}}} \times 100\%$$

2) 国内常规实验方法降解率计算

样品培养瓶样液IR吸收值 $I_{\text{培养}}$

样品对照瓶样液IR吸收值 $I_{\text{对照}}$

则降解率计算公式:

$$W = \frac{I_{\text{对照}} - I_{\text{培养}}}{I_{\text{对照}}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 微生物降解样品三组瓶实验测试结果

将参比油品和蓖麻油基润滑油优化条件后的降解测试结果列于表 1 进行比较。

表 1 三组瓶样品降解测试结果
Table 1 Degradation rates obtained by the three-bottle experiments

	$r_{\text{培养}}$ r_c	$r_{\text{中性}}$ r_n	$r_{\text{毒性}}$ r_p	降解率 Degradation rates (%)
蓖麻油基润滑油 (Caster oil-based lube oil)	0.490205	0.429734	0.520073	88.37
参比油品 (The control)	0.654897	0.715628	0.839571	100.00
蓖麻油基润滑油 (Caster oil-based lube oil)	0.307321	0.259673	0.349173	86.35
参比油品 (The control)	0.541897	0.542519	0.713295	100.00
蓖麻油基润滑油 (Caster oil-based lube oil)	0.486537	0.418977	0.511239	86.79
参比油品 (The control)	0.513729	0.506817	0.571743	98.79

从上表数据可以看出, 采用本实验设计方案, 细菌对润滑油的降解能力: 参比油品为 99.60%, 蓖麻油基润滑油为 87.17%, 已知参比油品公布的降解率为 100%, 对比可以看出, 实验值与公布值相差 <0.5%。以降解率来计算, 平行实验最大误差为 1.21%。实验数据具有较好的重复性和稳定性。

实验采用红外光谱检测碳-氢组合的最大吸收值表示降解残余物含量, 其检测结果较可靠、准确。

实验过程中, 中性瓶因为不加入润滑油, 细菌缺乏碳源, 因而不能生长。中性瓶的作用是扣除因加入菌液所产生的红外光谱值。毒性瓶因加入了润滑油, 虽然没有接入菌液, 仍需要加入HgCl₂, 目的是为了抑制杂菌对润滑油可能发生的降解。

实验过程中的样品预处理采用了离心去细胞的方式。理论分析认为细菌通过降解润滑油而获得了大量的增殖, 可用离心的方法把细菌细胞从培养基中除去, 残余油品及其各种降解中间物主要存在于上清液中, 离心上清液是下一步实验的处理对象。这一点与唐秀军等^[7]采用的实验方法不同, 他们采用的是超声波破碎细胞的方式。细胞经超声波破碎后, 细胞内容物质都溶解在溶液之中, 这对萃取进而对红外光谱的结果都有影响。关于这一点不同, 进一步的分析可能会看到两种分析方法的差别。有待以后研究。

2.2 国内常规实验方法测试结果

优化条件后的实验测试结果如表 2。

表 2 国内常规实验方法样品降解测试结果
Table 2 Degradation rates obtained by the domestic routine experiments

$I_{\text{培养}}$ I_b	$I_{\text{对照}}$ I_c	降解率 Degradation rates (%)
0.211075	0.892494	76.35
0.196577	0.890294	77.92
0.119401	0.545627	78.12

将 2.1 和 2.2 测试结果进行比较可以看出, 由本实验方案得到的润滑油降解率要高于国内常规实验方法约 10% 左右, 说明了本实验设计方案与国内常规实验方法对研究该润滑油的可降解性的优劣差别。

国内常规实验方法具有难以克服的实验误差: 实验中, 空白对照瓶不加入菌液, 然而样品培养瓶加入了菌液。由加入菌液而引起的实验误差无法克服。

目前评价生物降解能力的方法有很多种, 如检测生物降解过程中产生的 CO_2 来评价生物降解能力的 STURM 法; 检测生物降解过程中 O_2 的消耗量, 以 BOD/COD 为度量指标的 MITI 法; 检测生物降解前后油品含量的变化, 以其为度量指标来评判生物降解能力的 CEC-L-33-T-82 实验方法等^[8,9]。此外, 还有根据这些方法进行改进的实验方法^[10]以及其它的实验方法等等^[3,5]。但是大多方法因所受干扰因素太多而缺乏较好的可靠性和准确性^[7]。上述的 CEC-L-33-A-93 实验方法检测油品含量的变化, 有较好的准确性和重复性, 欧洲协调委员会将其指定为润滑油生物降解性能评定标准方法^[4]。此法已经成为润滑油行业测试方法的标准。本实验方案在 CEC-L-33-A-93 实验方法和国内常规实验方法的基础上加以改进, 建立了润滑油生物降解的分析检测方法, 虽然它也是通过检测液相中油品含量的变化(碳氢类化合物含量的变化)来体现微生物对润滑油的降解能力, 但较 CEC-L-33-A-93 实验方法要简单、快捷而同样精确; 然而又比目前国内常规方法逻辑更加严密, 精确度更高。因而克服了前两种方法各自存在的缺点。

生物降解是一个复杂的生化过程, 衡量这个反应过程必须有一套科学、合理的分析方法。本实验基于这一设想, 进行分析方法的建立及其润滑油降解实验。经过实验验证, 本分析方法具有一定的科学性和较好的合理性。

3 结论

采用三组瓶-培养瓶、中性瓶、毒性瓶-实验方案对蓖麻油基润滑油在避光条件下的生物可降解性进行研究。建立了一套包括样品降解培养、样品预处理、分析检测方法选择以及实验结果分析处理等内容在内的润滑油生物降解性评价分析检测方法, 具有较好的重复性和稳定性。该方法设计严谨, 简单快捷而又不失准确性, 可作为润滑油降解研究的一种基本分析方法, 应用于蓖麻油基润滑油以及其它类型润滑油的生物降解分析检测。

应用本实验方法, 在最适培养条件下, 测得微生物对该润滑油的降解率达到 88.37%, 比国内常规实验方法约高出 10.25% (国内常规实验方法降解率为 78.12%) 表明两种实验方法之间存在明显的差别。

参 考 文 献

- [1] 黄文轩. 环境兼容润滑剂的综述. 润滑油, 1997, 12(4): 1-8.
- [2] Battersby NS. The Biodegradability and Microbial Toxicity Testing of Lubricants. *Chemosphere*, 2000, 257(41): 1011-1027.
- [3] 唐秀军, 汪孟言. 润滑剂的结构和组成与生物降解性能的研究. 北京: 石油大学学报, 1999, 67(1): 42-46.
- [4] Co-ordinating of European Council. CEC-L-33-A-93. Biodegradability of two stroke cycle outboard engine oils in water. *CEC Standard*, 1995.
- [5] 冯克权. 润滑剂生物降解性实验方法. 润滑油, 1999, 14(2): 43-46.
- [6] Jiang Zh P, Shi Sh Q, Zhang F, *et al.* Research on the assessment of aerobic biodegradability of organic substances based on the output of CO_2 . *Environmental Science*, 1996, 17(3): 11-14.
- [7] 唐秀军, 汪孟言. 润滑油生物降解能力评定方法. 石油商技, 1999, 17(1): 24-26.
- [8] Nagai H. Evaluation of the Newly Developed Test Methods for Lubricant biodegradability. *Lubricant Oils*, 1999, 42(1): 45-51.
- [9] 陈波水, 方建华等主编. 环境友好润滑剂. 北京: 中国石化出版社, 2006, pp.207-209.
- [10] 吕 刚, 解世文. 二冲程汽油机润滑油生物降解性及其评定方法的研究. 润滑与密封, 2006, 1(173): 51-56.