

一株石油烃降解菌的细胞疏水性及其乳化性质

黄磊¹ 谢晶¹ 王方梅¹ 孙田甜¹ 史小凤¹ 廉景燕^{1*} 梁凤来²

(1. 天津理工大学 化学化工学院 天津 300384)

(2. 南开大学 生命科学学院 天津 300071)

摘要:【目的】从新疆油田石油污染土壤中分离到一株在 25 °C 条件下利用烃类产生生物表面活性剂的菌株红球菌(*Rhodococcus* sp.) HL-6, 对其菌体细胞疏水性及所产表面活性剂进行研究。【方法】通过细胞粘附性、表面张力及乳化活性测定对菌株所产表面活性剂进行性质研究。【结果】菌株 HL-6 在亲水性和疏水性基质中均能产生生物表面活性剂, 在疏水性基质中可以将培养液表面张力由初始的 62.487 mN/m 降到 30.667 mN/m, 培养液在 pH 6–9 及 NaCl 浓度 1%–5% 范围内乳化效果良好, 在 4 °C 到 55 °C 范围内乳化效果均为 100%, 菌株对柴油的耐受能力很高, 在 30% 柴油浓度下依然生长良好并且有 44% 的乳化活性。【结论】HL-6 菌株的细胞表面具有很强的疏水性, 这有助于菌体细胞对烃类的摄取。该菌株能够利用烃类基质产生生物表面活性剂, 可以明显降低培养液表面张力并且对石油烃具有良好的乳化作用。说明菌株 HL-6 能够适应海洋滩涂石油污染的环境, 并可用于严重石油污染区域的生物修复。

关键词: 烃降解, 红球菌, 疏水性, 乳化活性

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(No. 31100400); 天津市应用基础及前沿技术研究计划资助项目(No. 08JCYBJC03900)

*通讯作者: Tel: 86-22-60214259; ✉: swzy@tjut.edu.cn

收稿日期: 2012-11-05; 接受日期: 2013-01-15

Cell-surface hydrophobicity and emulsification of a hydrocarbon-degrading strain

HUANG Lei¹ XIE Jing¹ WANG Fang-Mei¹ SUN Tian-Tian¹

SHI Xiao-Feng¹ LIAN Jing-Yan^{1*} LIANG Feng-Lai²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Tianjin University of Technology,
Tianjin 300384, China)

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

Abstract: [Objective] A hydrocarbon-degrading strain HL-6 was isolated from oil contaminated soil of Xinjiang Oil Field and identified as *Rhodococcus* sp., which could use hydrocarbon as sole carbon source to produce biosurfactant. The bacterial cell hydrophobicity and biosurfactant production were studied. **[Methods]** Through cell adhesion, surface tension and emulsifying activity, the biosurfactant was studied. **[Results]** The strain could produce biosurfactant in both hydrophilic and hydrophobic substrate. The surface tension was reduced from the initial 62.487 mN/m to 30.667 mN/m when substrate was hydrophobic. Diesel could be well emulsified by strain HL-6 and the emulsion tolerated salinity, alkali and temperature. In addition, strain HL-6 could grow well in medium containing 30% of diesel and had 44% emulsification. **[Conclusion]** Strain HL-6 had a strong cell-surface hydrophobicity, which contributed to uptake hydrocarbons. This strain could use hydrocarbon to produce biosurfactant, significantly reduce the culture surface tension and had good emulsification of petroleum hydrocarbons. So strain HL-6 was able to adapt to the environment of the marine shoals oil pollution, especially serious oil pollution.

Keywords: Hydrocarbon-degrading, *Rhodococcus* sp., Hydrophobicity, Emulsification

生物表面活性剂是由细菌、酵母菌和丝状真菌在各种基质,特别是在疏水性基质如烃类上产生的,烃基质的疏水性是微生物降解烃类存在的主要问题。由于烃降解酶嵌入细胞膜中,烃基质必须通过外层亲水细胞壁才能进入细胞内,才能被烃降解酶利用^[1-2]。细胞的疏水性或是对烃基质的粘附是生物表面活性剂产生菌对烃摄取的限制因素,先前的研究发现对烃类化合物的粘附是一些烃降解微生物的重要特性,以烃为基质生长的细胞都在不同程度上表现出疏水性。同时,生物表面活性剂还可以乳化污染土壤中不溶性有

机物,使它们的水溶性增加^[3-4]。油的乳化可极大地提高油的分散程度,增加菌株和油珠的接触机会,促进微生物对石油烃的吸收、降解^[5]。目前对于石油污染土壤的生物修复研究主要集中在高效石油降解菌的筛选与构建、添加营养物质及增加土壤中空气流通等方面^[6-10]。因此,研究解烃菌的细胞表面疏水性及乳化活性对于探索其烃摄取机制及在石油开采和烃类污染的生物修复中的应用具有重要的理论指导意义。

作者从新疆油田石油污染土壤中分离、筛选到一株能利用烃类产生生物表面活性剂的菌株

红球菌(*Rhodococcus* sp.) HL-6, 对其利用不同基质时的细胞表面疏水性、表面张力变化和对石油烃的乳化活性进行了研究, 并证明该菌株对柴油的耐受浓度较高, 对该菌株的实际应用提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种和化学试剂

从新疆油田石油污染土壤中筛选到一株能够利用烃类基质产生表面活性剂的菌株, 经初步鉴定为红球菌属, 命名为 *Rhodococcus* sp. HL-6, 研究室保存。 *E. coli* K12: 该菌株为亲水性细胞, 作为细胞疏水性能研究的对照菌株, 由南开大学石油微生物实验室提供。

实验用化学试剂均为国产化学纯, 0[#]柴油购自天津某加油站。

1.2 培养基及缓冲液

种子培养基及烃降解培养基(g/L): Na₂HPO₄ 1.5, KH₂PO₄ 3.48, (NH₄)₂SO₄ 4, MgSO₄ 0.7, 酵母粉 0.01, pH 7.2。种子培养基中碳源为 0.5% (V/V) 工业乙醇; 烃降解培养基中碳源为 0.5% (V/V) 0[#]柴油。

PUM 缓冲液(g/L): K₂HPO₄ 22.2, KH₂PO₄ 7.26, Urea 1.8, MgSO₄·7H₂O 0.2, 加蒸馏水至 1 000 mL, pH 7.2。

琼脂培养基(g/L): 琼脂粉 10, 甘油 100 mL, 加蒸馏水至 1 000 mL。

1.3 接触角测量(CAM)

将菌株 HL-6 以 2% 接种量接种至烃降解培养基, 25 °C 振荡培养至对数期, 8 000 r/min 离心 20 min, 收集菌体, 用无菌水洗涤 2 次, 用硝酸纤维素膜(0.45 μm)过滤。将滤膜平铺在无菌琼脂培养基上, 室温放置 2 h 润湿均匀, 然后放在普通滤纸上干燥, 干燥后把滤膜放到接触角测量仪上, 测量其与蒸馏水的接触角。每张滤膜取不同位置

的 6 个点来测量, 其平均值为接触角 θ 。

1.4 菌体盐析聚集检测(SAT)

用 0.002 mol/L 的 NaH₂PO₄ (pH 6.8) 将 4.0 mol/L 的 (NH₄)₂SO₄ (pH 6.8) 以 0.2 mol/L 的梯度从 4.0 mol/L 稀释到 0.2 mol/L。将 HL-6 菌株培养至对数期, 离心收集菌体, 用 0.002 mol/L 的 NaH₂PO₄ 溶液洗涤细胞 2 次后重悬, 使生物量约为 10¹⁰ CFU/mL。取 10 μL 菌悬液置载玻片上, 与等体积 3.2 mol/L、1.8 mol/L 及 0.2 mol/L 的 (NH₄)₂SO₄ 溶液混合^[11], 25°C 条件下将载玻片轻轻摇动 2 min, 置显微镜下观察细菌发生聚集所需的最低 (NH₄)₂SO₄ 浓度。

1.5 细菌对烃的粘附性(BATH)测试

采用 BATH 方法对菌株 HL-6 菌体细胞表面疏水性进行测定, 细菌的疏水性用 CSH% 表示。具体方法参照文献[12]。

1.6 乳化活性的测定

以乳化指数(Emulsification index, EI₂₄)表示乳化物质的乳化活性, 具体方法参照文献[13]。

1.7 表面张力测定

采用吊环法 Q200 全自动表面张力仪测定。每个样品测定 3 次, 取平均值。具体方法参照文献[14]。

1.8 菌体生物量测定

采用紫外可见分光光度计在 OD₆₀₀ 处检测。

1.9 菌体细胞扫描电镜(SEM)检测

将菌株 HL-6 分别在 LB 培养基及烃降解培养基中培养到对数期, 离心收集菌体, 使用无菌水洗涤 2 次后进行 SEM 检测, 观察胞外产物情况。具体方法参照文献[15]。

2 结果与讨论

2.1 HL-6 菌细胞表面的疏水性

2.1.1 接触角的测量: 依据接触角的测量标准, 若细菌与水的接触角 $\theta > 90^\circ$, 表示菌体细胞疏

水; 若 $\theta < 90^\circ$, 则说明该菌株亲水。测试结果显示(图 1), HL-6 菌与水的接触角为 116.2° (图 1A), 表明该菌细胞呈疏水性; 对照株 *E. coli* 的接触角为 23.9° (图 1B), 表示其细胞具强亲水性。

2.1.2 盐析聚集检测: 细菌细胞与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液混合时可产生菌体细胞的聚集现象, 细胞聚集时所需的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 摩尔浓度越低表示细胞疏水性越强。对菌株 HL-6 在亲水性基质葡萄糖和疏水性基质柴油中生长后盐聚集所需 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 摩

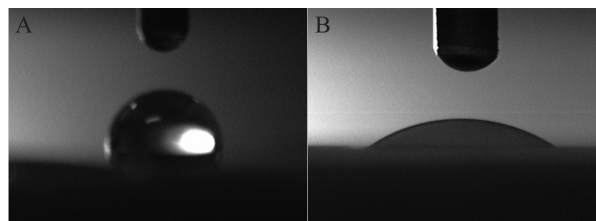


图 1 接触角的测试结果

Fig. 1 Result of the contact angle test

Note: A: HL-6; B: *E. coli*.

尔浓度的区别进行实验。图 2 结果表明, HL-6 菌株在柴油中生长后发生聚集现象所需的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 摩尔浓度仅为 0.2 mol/L , 而在亲水性基质葡萄糖中生长后发生聚集作用需要超过 4.0 mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。说明烃类等疏水性基质可以诱导菌体细胞表面产生疏水性变化。

2.1.3 细菌对烃的粘附性: 一般情况, 如果细菌的 $\text{CSH}\% > 70$, 说明细菌细胞表面呈高疏水性; 如果 $\text{CSH}\% < 30$, 则显示细菌细胞表面高度亲水。细菌对烃的粘附性越强, 表明其细胞表面疏水性越强。菌株 HL-6 在以柴油为唯一基质的烃降解培养基中生长的过程中, 每隔 24 h 取样测定菌体细胞粘附性。结果如表 1 所示, 可以看出菌株 HL-6 在经过 24 h 的适应后, 细胞疏水性开始增强, 在 96 h 时达到最大值即 76.71%, 之后随着菌体培养时间的延长, 疏水性迅速下降。据

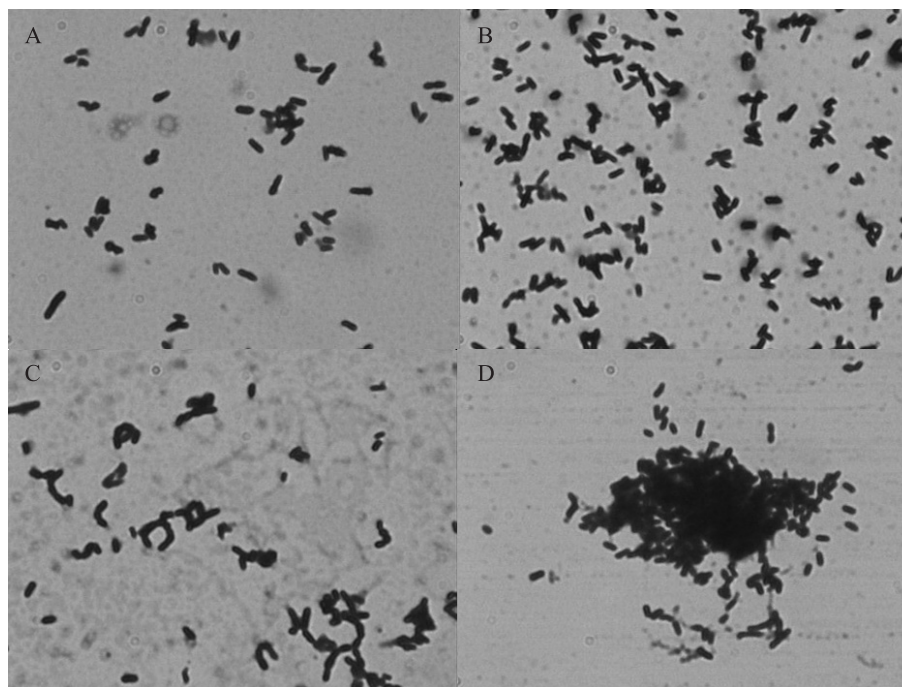


图 2 在不同基质中培养后的盐聚集光学显微照片(1 000×)

Fig. 2 Photomicrographs of bacterial HL-6 in different carbon resource (1 000×)

注: A、B: 葡萄糖中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4.0 mol/L) 处理前后; C、D: 柴油中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.2 mol/L) 处理前后。

Note: A, B: Treated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4.0 mol/L) in glucose; C, D: Treated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.2 mol/L) in diesel.

表 1 菌体细胞粘附性在生长过程中的变化
Table 1 Changes of bacterial cell surface hydrophobicity during the growth

生长过程 Growth process (h)	CSH (%)
24	48.08
48	58.51
72	65.99
96	76.71
120	46.73

Rosenberg 等^[16]报道, 在细菌培养过程中, 细菌的表面疏水性一般呈增强趋势, 但伴随着衰老进程, 表面疏水性降低。

2.2 细菌对烃的乳化作用

细胞具有疏水性的大多数解烃菌均可产生表面活性剂, 所产表面活性剂可乳化多种烃类化合物。将 HL-6 菌培养液和 0[#]柴油混合, 涡旋振荡 2 min 静置 24 h 后, 可观察到明显稳定的乳化层(图 3A), EI₂₄ 达 80%以上。该结果表明, HL-6 菌产生的表面活性物质具有良好的乳化性能; 可将石油烃完全乳化到基质中, 并形成稳定的乳状液。在相同的实验条件下, 大肠杆菌 *E. coli* K12 与 0[#]柴油形成的乳化层, 仅静置 2 min 便恢复到最初的油水分层状态(图 3B)。



图 3 HL-6 菌株培养液对柴油的乳化作用

Fig. 3 Emulsification of diesel oil by HL-6 fermentation liquor

注: A: HL-6 培养液; B: 大肠杆菌 K12 培养液。

Note: A: Fermentation liquor; B: *E. coli* K12 culture.

2.2.1 菌体细胞 SEM 检测: 分别将 LB 和柴油为唯一基质培养的培养液离心取菌体, 用无菌水洗净残留的培养基成分, 进行扫描电镜观察, 结果见图 4, 结果显示, 在 LB 培养基中生长的菌体表面比较干净, 未发现太多的分泌物(图 4A); 在烃降解培养基中生长的菌体表面则分泌了很多的粘性物质, 成丝状粘附在细胞表面(图 4B), 这可能是疏水性底物所诱导产生、分泌的胞外产物, 即表面活性剂类物质。电镜结果再次证明菌株 HL-6 可以通过分泌胞外产物来乳化烃类物质。

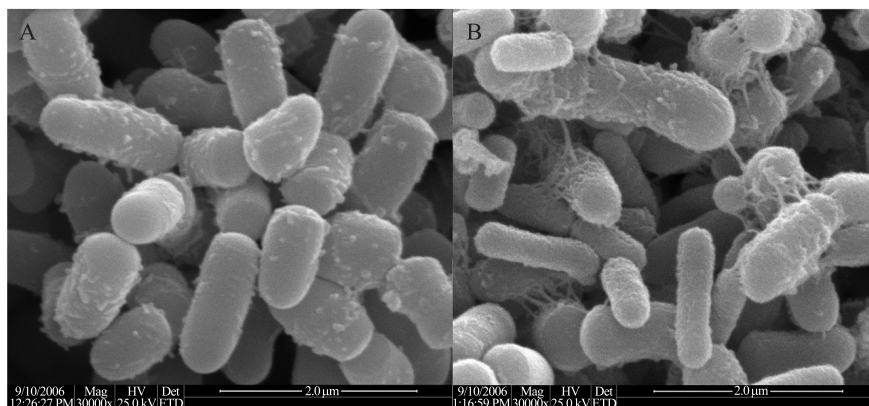


图 4 HL-6 菌株在不同底物中生长的扫描电镜照片

Fig. 4 Photo of scan electron microscope growing in different substrate of strain HL-6

Note: A: LB; B: Diesel oil.

2.2.2 细菌对柴油的耐受性: 考察菌株对于柴油的耐受性, 当柴油浓度为 5%–30% (V/V) 时, 菌株 HL-6 均生长良好, 在 30% 的高柴油浓度下培养 72 h, 选取 OD_{600} 进行生物量测定, 测定值为 1.25, 乳化活性达到 44% (图 5)。说明菌株对柴油的耐受能力较强, 可以应用于较重污染的海洋滩涂土壤的生物治理。据王世杰等报道^[17], 他们分离到一株可以耐受 30% 柴油浓度的菌株, 但是在 30% 柴油浓度时, OD_{600} 测定的生物量值仅为 0.8 左右, 菌株 HL-6 比其生物量高了 50% 以上。

2.2.3 细菌对 NaCl 的耐受性: 在培养基中添加 NaCl 来考察菌株的耐受性, 当浓度为 0–5% (W/V) 时, 菌株 HL-6 对柴油均表现出较好的乳化活性, 在 2% NaCl 浓度时乳化活性最高, 达到 91.82%,

在 5% 的 NaCl 浓度时仍然有超过 40% 的乳化活性; 柴油降解率也在 2% NaCl 浓度时最高, 达到 82.39%, 在 5% 的 NaCl 浓度时仍然有超过 50% 的柴油降解率, 说明菌株适宜应用于海洋滩涂的高盐环境(图 6)。

2.2.4 细菌对 pH 的耐受性: 调节培养基 pH 来考察菌株对酸碱的耐受性, 菌株 HL-6 在 pH 6–9 环境下均具有较好的生物量和乳化性能, 随着 pH 的升高, 生物量和乳化活性稍有一定增高。但是在 pH 为 5 的条件下没有生物量和乳化活性, 实验结果如图 7 所示。说明菌株对偏碱性土壤比较适应。据相关报道, 天津滨海滩涂土壤 pH 在 7.92–8.24 之间, 属于偏碱性的土壤。所以 HL-6 菌株能够很好地适应沿海滩涂土壤的酸碱度。

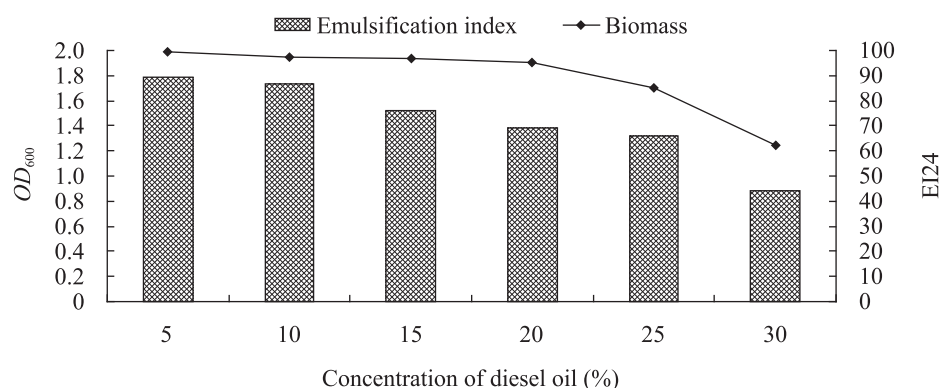


图 5 柴油浓度对生物量和乳化活性的影响

Fig. 5 Effect of biomass and emulsification activity by concentration of diesel oil

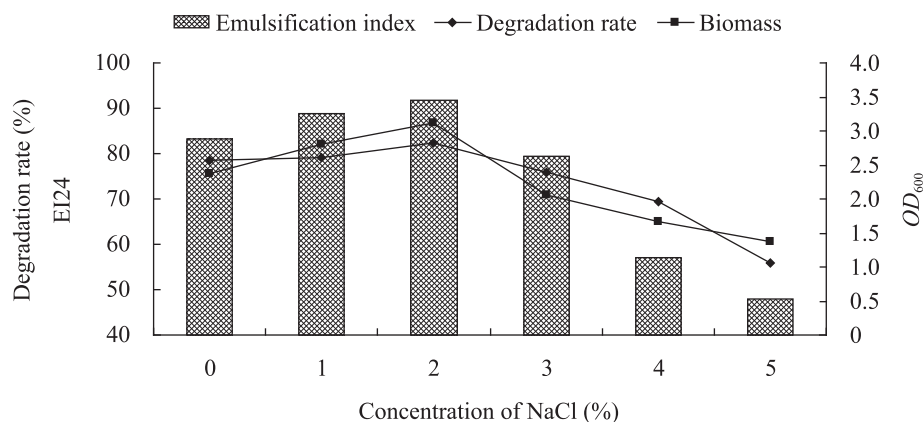


图 6 NaCl 浓度对生物量、降解率和乳化活性的影响

Fig. 6 Effect of biomass, degradation and emulsification activity by concentration of NaCl

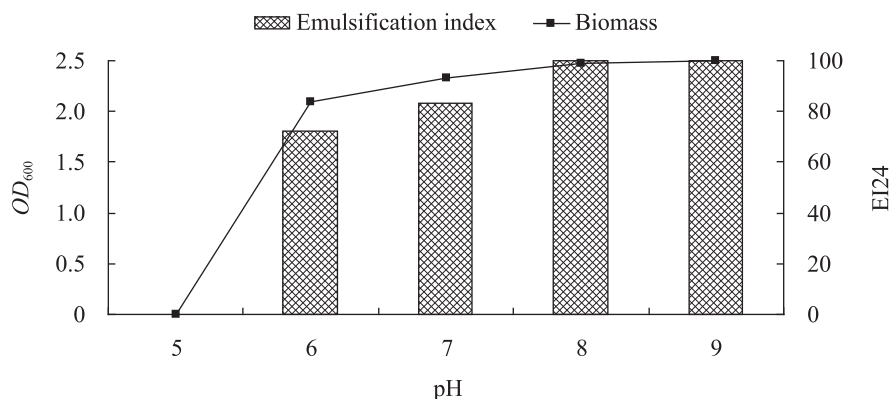


图 7 pH 对生物量和乳化活性的影响

Fig. 7 Effect of biomass and emulsification activity by pH

2.2.5 温度对乳化活性的影响: 将 HL-6 菌株培养液与柴油混合, 分别置于 4 °C、15 °C、25 °C、37 °C、55 °C 和 100 °C 处理 24 h, 取出将混合液涡旋振荡 2 min 后再分别置于各自恒温温度, 静置 24 h 后测定不同温度下乳化液的乳化活性。结果如图 8 所示, 在 4 °C、15 °C、25 °C、37 °C、55 °C 温度下, 菌株 HL-6 培养液均显示出良好的乳化性能, 乳化活性均能达到 100%; 而当处理温度为 100 °C 时, 乳化活性只有 35%。因为海洋滩涂土壤温度不会超过 55 °C, 所以说明菌株 HL-6 可以应用于海洋滩涂土壤石油污染的生物修复。

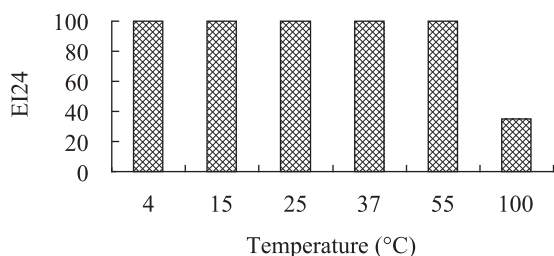


图 8 温度对乳化活性的影响

Fig. 8 Effect of emulsification activity by temperature

2.2.6 细菌对不同底物的乳化效果: 将 HL-6 菌株培养液与几种不同基质混合, 静置 24 h 后测定乳化活性。结果如图 9 所示, 说明菌株 HL-6 所产乳化剂对正构烷烃和芳香烃均有良好的乳化效果。

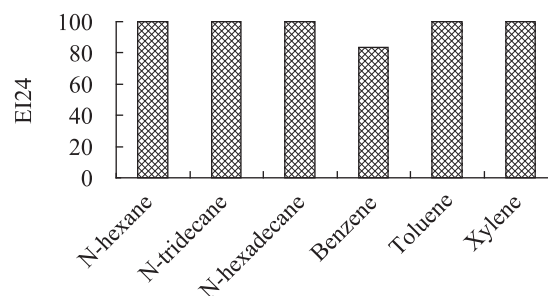


图 9 对不同烃类底物的乳化效果

Fig. 9 Effect of substance on emulsification activity

2.3 不同基质对菌体生长和产表面活性剂的影响

产表面活性剂的微生物大致可分为 3 类: 一类是严格以烷烃作为基质的微生物, 如 *Corynebacterium* sp.; 一类是利用水溶性基质的微生物, 如 *Bacillus* sp.; 另一类可以利用烷烃和水溶性基质两者的微生物, 如 *Pseudomonas* sp.^[18]。选择亲水和疏水的不同种基质进行实验, 考察菌株 HL-6 在不同种基质中生长情况和产表面活性剂情况。结果如表 2、图 10、图 11 所示, 可以看出在疏水性基质液蜡或柴油中, 培养液表面张力降低幅度明显大于亲水性基质, 由初始的 62.487 mN/m 降到 30 mN/m 左右, 说明菌体在疏水性基质中为了更好地接触到底物, 会分泌表面活性剂降低培养液表面张力; 菌体细胞粘附性也体现出了相似的规律性, 在疏水性基质中

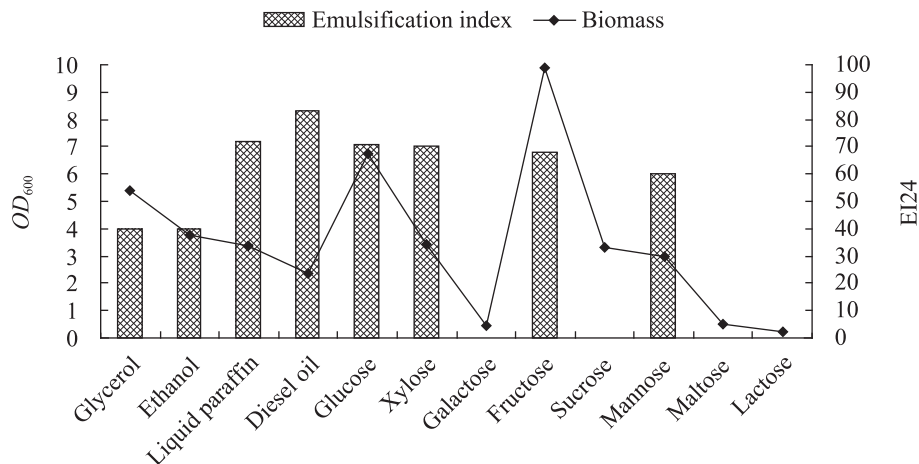


图 10 不同基质对生物量和乳化活性的影响

Fig. 10 Effect of biomass and emulsification activity by different carbon resource

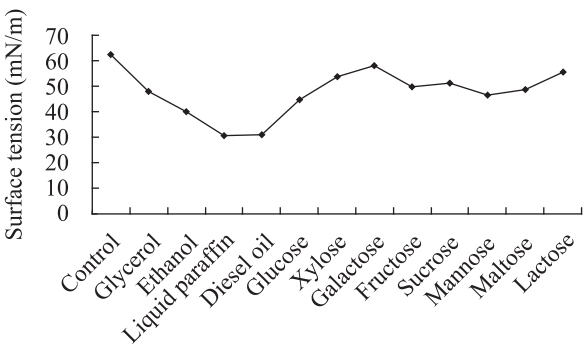


图 11 不同基质对表面张力的影响

Fig. 11 Effect of carbon resource on surface tension of the culture

表 2 不同基质对菌体细胞粘附性的影响	
Table 2 Effect of carbon resource on bacterial cell surface hydrophobicity	
基质	CSH (%)
Carbon resource	
Glycerol	5.66
Ethanol	12.62
Liquid paraffin	83.64
Diesel oil	72.56
Glucose	27.38
Xylose	40.35
Galactose	0
Fructose	0
Sucrose	16.92
Mannose	0
Maltose	0
Lactose	0

明显优于亲水性基质；生物量则在一些易于被细菌利用的亲水性糖类基质中更高；而乳化活性则在疏水性和某些亲水性基质中都有较好的效果。说明烃降解菌 HL-6 在亲水性和疏水性基质中都能产生生物表面活性剂。

3 结论

分离到的解烃菌 *Rhodococcus* sp. HL-6 能够利用烃类进行生长代谢，其细胞表面具有很强的疏水性能，增强了细菌对烃类物质的吸附利用，同时菌株 HL-6 产生的表面活性剂对石油烃具有很好的乳化作用，能够将石油烃乳化成微小的颗粒，因此，初步推测菌株 HL-6 通过两种模式协同摄取烃类，目前关于协同摄取烃类的报道较少。菌株在亲水性和疏水性基质中均能产生生物表面活性剂，可以耐受 1%–5% 的盐浓度，在 pH 6–9 范围内乳化效果良好，在 4 °C–55 °C 范围内乳化效果均为 100%，对柴油的耐受能力较高，在 30% 柴油浓度下依然生长良好并且有 44% 的乳化活性。说明菌株 HL-6 能够适应海洋滩涂石油污染的环境并能应用于较严重的石油污染区域，有望制备成生物修复菌剂进行海洋滩涂石油污染的生物修复。

参 考 文 献

- [1] Hua ZZ, Chen Y, Du GC, et al. Effects of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on the biodegradation of petroleum compounds[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004, 20(1): 25–29.
- [2] 张天胜. 生物表面活性剂及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 111–115.
- [3] Volkerling F, Breure AM, van Andel JG, et al. Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(5): 1699–1705.
- [4] Rahman KM, Banat IM, Thahira J, et al. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coirpith and rhamnolipid biosurfactant[J]. Bioresource Technology, 2002, 81(1): 25–32.
- [5] 田雷, 白云玲, 钟建江. 微生物降解有机污染物的研究进展[J]. 工业微生物, 2000, 30(2): 46–50.
- [6] Rone E, Rosenberg E. Role of fertilizers: biostimulation[D]. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology, 2010, Part 24, 2521–2529, DOI: 10.1007/978-3-540-77587-4-184.
- [7] Nikolopoulou M, Kalogerakis N. Biostimulation strategies for enhanced bioremediation of marine oil spills including chronic pollution[D]. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology, 2010, Part 24, 2501–2504, DOI: 10.1007/978-3-540-77587-4-187.
- [8] 郭娜, 李志敏, 叶勤. 烷烃降解菌的筛选、鉴定及优势菌株的降解特性[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(4): 572–576.
- [9] 王世杰, 王翔, 卢桂兰, 等. 低温微生物修复石油烃类污染土壤研究进展[J]. 应用生态学报, 2011, 22(4): 1082–1088.
- [10] Chang W, Klemm S, Beaulieu C, et al. Petroleum hydrocarbon biodegradation under seasonal freeze-thaw soil temperature regimes in contaminated soils from a sub-Arctic site[J]. Environmental Science and Technology, 2011, 45(3): 1061–1066.
- [11] Jonsson P, Wadström T. Cell surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* measured by the salt aggregation test(SAT)[J]. Current Microbiology, 1984, 10(4): 203–210.
- [12] 张明露, 马挺, 李国强, 等. 一株耐热石油烃降解菌的细胞疏水性及乳化、润湿作用研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(9): 1348–1352.
- [13] Plaza GA, Zjawiony IM, Banat IM. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils[J]. Journal of Petroleum Science and Engineering, 2006, 50(1): 71–77.
- [14] 王靖, 陈云. 生物表面活性剂及其评价方法[J]. 化学研究与应用, 2009, 21(2): 137–140.
- [15] Takei D, Washio K, Morikawa M. Identification of alkane hydroxylase genes in *Rhodococcus* sp. strain TMP2 that degrades a branched alkane[J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(8): 1447–1452.
- [16] Rosenberg M, Kjelleberg S. Hydrophobic interactions: role in bacterial adhesion[M]// Advances in Microbial Ecology. New York: Springer US, 1986: 353–393.
- [17] 王世杰, 王翔, 卢桂兰, 等. 柴油降解菌的筛选鉴定及降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(1): 49–54.
- [18] 王彦杰, 毕思宁, 左豫虎, 等. 一株表面活性剂产生菌的分离及抑菌活性[J]. 微生物学通报, 2012, 39(3): 353–360.