

## 专家组稿专栏

**编者按:**清洁生产是一个系统工程,其核心是“节能、降耗、减污、增效”。利用清洁生产理念与先进技术改造传统产业,将污染物削减以至消除在生产过程中,将成为传统产业走新型工业化道路的重要途径。推行清洁生产,对食品工业调整产业结构,转变经济增长方式,实施可持续发展战略,具有重要意义。本期刊登的这篇文章,在工艺及设备方面对食品行业的清洁生产工作,做了一些实际探索,可圈可点。

(栏目主持人:宋焕禄教授)

文章编号:1671-1513(2011)06-0015-05

## 高效降解废弃蓖麻基润滑油降解菌的分离筛选及特性研究

刘亚琼<sup>1</sup>, 王昌禄<sup>1</sup>, 何东<sup>1</sup>, 张丽红<sup>1</sup>, 陈勉华<sup>1</sup>, 王玉荣<sup>1</sup>,  
何良年<sup>2</sup>, 叶锋<sup>2</sup>

(1. 天津科技大学 食品工程与生物技术学院/食品营养与安全教育部重点实验室, 天津 300457;  
2. 南开大学 蓖麻工程研究中心, 天津 300071)

**摘要:**从内蒙古某蓖麻榨油厂排污口采样,分离筛选出10株能降解废弃蓖麻基润滑油菌株,其中T-9菌株降解润滑油的能力较强,该菌株最适降解pH值为5.0,降解温度30℃,在1%~5%的NaCl中能较好生长。通过菌落形态与生理生化实验,初步鉴定该菌株为假单胞菌属(*Pseudomonas*)。在润滑油质量浓度为10 g/L,初始pH值为5.0,180 r/min,30℃下培养7 d后,采用改进的CEC-L-33-A-93方法测得其对废弃蓖麻基润滑油的降解率为72%。采用GC/MS对降解产物进行分析,测得其对废弃蓖麻基润滑油降解率为80%,该菌株具有良好的蓖麻基润滑油降解能力。

**关键词:**蓖麻基润滑油; CEC-L-33-A-93方法; GC/MS; 降解特性

**中图分类号:** TQ64; TS225.1

**文献标志码:** A

随着润滑油的广泛使用,人们越来越关注它对环境产生的影响<sup>[1]</sup>,润滑油在使用过程中,不可避免地会通过泄漏、溢出或不恰当的排放等途径进入环境,而这些油品中的大多数组分不能被生物降解,且具有一定的生态毒性,严重污染大气、土壤和水资源,破坏生态环境和生态平衡<sup>[2]</sup>。石油污染土壤的治理方法主要有物理法、化学法及生物修复技术,其中生物修复技术被认为最有生命力。目前,大多数研究是通过添加N、P等营养物质刺激土壤中土著微生物的活性来实现污染土壤的生物修复<sup>[3-4]</sup>,但由于土著微生物生长缓慢、数量有限,往往使生物修复过程受到限制。

向石油污染土壤中投加环境适应强、降解效能高的菌种或菌群是提高石油污染土壤生物修复效率的主要手段。可生物降解润滑油的研究主要包括基础油、添加剂和生物降解性能试验方法等<sup>[5-7]</sup>,目前,对于生物降解标准研究甚少。

本研究从内蒙古蓖麻榨油车间排污口采取土样和水样,分离菌株,对其形态及生理生化特性进行研究,对CEC-L-33-A-93方法<sup>[8]</sup>进行了改进,使其培养周期缩短,根据润滑油的溶解性选择合适的萃取剂,确保润滑油结构官能团在2930 cm<sup>-1</sup>处有特征吸收峰。研究菌株的生理生化特性及降解后产物的分析,为深入进行降解机理研究奠定基础。

收稿日期:2011-07-14

作者简介:刘亚琼,女,硕士研究生,研究方向为废弃蓖麻基润滑油的生物降解;

王昌禄,男,教授,博士生导师,主要从事食品生物技术方面的研究。通讯作者。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源及培养基

从内蒙古蓖麻榨油车间排污口采取土样和水样;废弃蓖麻基润滑油由南开大学蓖麻工程研究中心提供。

矿物降解培养基:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.4 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.5 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4.0 g;  $\text{MgSO}_4$  0.7 g;  $\text{NaCl}$  1.6 g; 酵母粉 0.01 g; Tween-80 0.6 mL, 蓖麻基润滑油 5.0 mL, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值为 7.0~7.2, 121 °C 灭菌 20 min。

富集培养基: 葡萄糖 3 g;  $\text{NaCl}$  5 g; 酵母膏 3 g; 蛋白胨 3 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  2.7 g; 蒸馏水 1 000 mL; pH 值为 7.2; 115 °C 灭菌 15 min。

### 1.2 降解菌的分离筛选

将采集的样品经 24 h 曝气处理后, 在无菌操作条件下取少量样品, 加入 50 mL 无菌水, 搅拌, 制成悬浮液。用移液枪取 0.1 mL 悬浮液, 放入以废弃蓖麻基润滑油为唯一碳源的筛选培养基平板上, 用无菌涂布器连续涂布 4 个平板, 分别放置于 30 °C 恒温培养箱中。培养 2~3 d, 挑取生长较快和不同菌落形态的菌株, 进一步分离纯化复筛, 从中筛选出能以废弃蓖麻基润滑油为唯一碳源生长的菌株。

### 1.3 降解特性的研究

从筛选的 T-9 菌株斜面培养基中, 挑取一环接种于 LB 液体活化培养基中, 培养 12 h, 分别取 1 mL 加入不同初始 pH 值 (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0) 的矿物降解培养基中, 180 r/min, 培养 12 h 后, 测定不同初始 pH 值时生物量, 获得最适 pH 值。同理, 在不同培养温度: 15, 20, 25, 30, 35, 40 °C 环境中, 180 r/min, 培养 12 h 后, 测定不同培养温度时生物量, 获得最适生长温度。在培养条件一致情况下, 在 250 mL 三角瓶中装入 100 mL 富集培养基, 将菌株 T-9 以相同接种量接入  $\text{NaCl}$  质量分数为 1%, 3%, 5%, 7%, 9% 的富集培养基中, 30 °C, 180 r/min, 培养 3 d。用紫外及可见分光光度计测试  $\text{OD}_{600}$  值。

### 1.4 菌落形态及生理生化实验

在牛肉膏蛋白胨固体培养基上观察菌株 T-9 的菌落特征, 观察生理生化实验结果, 初步确定菌株的分类地位<sup>[9]</sup>。

### 1.5 蓖麻基润滑油降解实验

#### 1.5.1 培养基: 见 1.1

#### 1.5.2 锥形瓶的准备

测试需要的不同种类测试烧瓶制备中各添加物的含量见表 1。

表 1 测试瓶样品的制备

Tab. 1 Preparation of test bottles

	V(矿物培养基)/mL	V(菌液)/mL	m(废弃蓖麻基润滑油)/g	V(0.03 mol/L $\text{HgCl}_2$ 溶液)/mL
中性瓶	100	1	1	—
培养瓶	100	1	1	—
毒化瓶	100	—	—	0.03

### 1.5.3 测试三角瓶最小数量的确定

测试需要的不同种类测试烧瓶的最小数量见表 2。

表 2 生物降解性试验所需烧瓶数量及分配

Tab. 2 Number and distribution of flask required in biodegradability tests

培养时间/d	每种待测油的测试瓶数/个	每种待测油的毒化瓶数/个	中性瓶数/个
0	3	—	2
7	3	2	—

注: “0 d” 烧瓶应该在试验开始后准备, 并立即对其进行萃取。

T-9 菌株活化后进行废弃蓖麻基润滑油的生物降解试验, 从种子培养基中吸取 1 mL 种子液, 接入到 1.5.2 中需要添加菌液的锥形瓶中, 30 °C, 180 r/min 振荡培养 7 d。

### 1.5.4 破乳和破细胞壁实验

培养期结束后, 在各锥形瓶中加入约 1 mL 1 mol/L  $\text{HCl}$  和 20 g  $\text{NaCl}$ , 摇瓶振荡, 待  $\text{NaCl}$  完全溶解后, 采用超声波细胞破碎仪将培养基中的微生物细胞壁破碎, 使内容物释放及进一步破乳。间歇式超声波破碎条件: 200 W, 2 min, 工作 2 s, 停止 1 s, 破碎后待三角瓶内溶液温度冷却至室温后再进行分离萃取。

### 1.5.5 萃取

培养液 10 000 r/min 离心 10 min, 去除细胞, 取上清液, 将各样品倒入 250 mL 分液漏斗中, 分 3 次加入四氯化碳进行萃取, 每次加入 30 mL, 剧烈摇动 1~2 min, 经常开启活塞排气; 静置至分层后, 开启漏斗下部活塞, 将下层有机相收入装有无水硫酸钠的带玻璃容量瓶密闭振荡, 或在 25 mL 带玻塞容量瓶中操作, 静置去水 24 h 后, 置入 10 mm 光路长的 IR 室, 测量  $\text{CH}_3-\text{CH}_2-$  的 C-H 红外伸缩振动吸收峰 (在  $2930 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ ) 的峰高。

### 1.5.6 IR 分析及生物降解率计算

用红外光谱分析仪测定萃取液, 波数范围 2 500~3 500  $\text{cm}^{-1}$ , 用装样的石英比色皿进行扫描, 对  $2930 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$  处吸收峰的吸光度进行定量处理, 测定各毒化瓶和测试瓶 ( $E_{\text{烧瓶}}$ ) 萃取液的 IR 吸收, 根据式(1)计算残余油含量。

$$\text{余油含量}/\% = \frac{(E_{\text{烧瓶}} - E_{\text{中性瓶}}) \times 100}{X_E} \quad (1)$$

式(1)中  $X_E$  为“0 d”瓶 IR 吸收的平均值。

生物降解率按式(2)计算。

$$\text{生物降解率 } W/\% = \frac{(P - T) \times 100}{P} \quad (2)$$

式(2)中,  $P$  为毒化瓶中残余油含量(平均值), %;  $T$  为测试瓶中残余油含量(平均值), %。

采用红外光谱鉴定四氯化碳中 C—H 含量, 用四氯化碳做空白, 确保萃取剂中无干扰。

## 1.6 降解产物分析

取废弃蓖麻基润滑油降解后的培养液, 10 000 r/min 离心 10 min, 沉淀去细胞, 取离心上清液, 加入浓硫酸, 使其质量分数为 1.0%, 70 °C 水浴加热 30 min 进行甲酯化处理, 用正己烷作萃取剂共萃取 3 次, 每次用量 30 mL, 刷振 2 min, 静置分层, 收集萃取液上层有机相, 放入三角瓶中, 用约 10 g 无水  $\text{MgSO}_4$  除去水分后, 进行 GC/MS 分析。GC/MS 条件: 进样量 1  $\mu\text{L}$ , 进样口温度 320 °C, 分流比 20:1, 程序升温 初始温度 130 °C, 以 8 °C/min 升到 320 °C, 保留时间 10 min, 柱流速 1 mL/min, 柱型号 VF-5 ht, 柱规格 30 m  $\times$  0.25 mm, 0.10  $\mu\text{m}$ , 4 000 MS 型质谱仪 (Agilent 公司), 质量扫描范围  $m/z$  50 ~ 1 000, 离子源 EI, 质量分析器 离子阱, 传输线温度 280 °C, 离子阱温度 220 °C, 检索谱库 NIST 05。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离及筛选

从内蒙蓖麻榨油厂排污口采取土样和水样, 分离筛选出 10 株细菌, 编号 T-1 至 T-10。将分离得到的菌株经过诱导驯化后, 选取能在废弃蓖麻基润滑油为唯一碳源培养基上生长较好的菌株 T-9 作为试验菌株。

### 2.2 菌株降解条件的特性研究

#### 2.2.1 最适 pH 值的确定

在其他条件一致的情况下, 培养基的初始 pH 值对菌株 T-9 的生长具有较大影响, 每种细菌都有最适生长 pH 值, 不处于最适生长 pH 值, 菌株就不能良好地生长繁殖。菌株 T-9 在 pH 值为 5 ~ 10 中都能较好生长, 如图 1, 即在酸、碱性条件下都能适应并生长。最适 pH 值为 5.0。

#### 2.2.2 最适生长温度的选取

温度影响着微生物体内一系列生物化学反应, 它对生物有机体的影响表现在两个方面: 一方面, 随着温度的上升, 细胞中的生物化学反应速率和生长

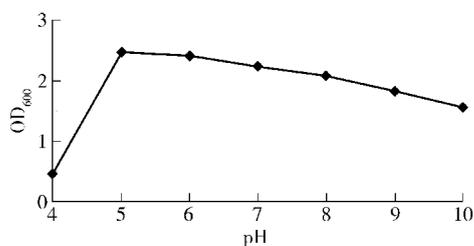


图1 初始 pH 值对菌株 T-9 生长的影响

速率加快; 另一方面, 机体的重要组成如蛋白质、核酸和催化反应的酶等对温度都很敏感, 随着温度的增高可能受到不同程度的破坏<sup>[10]</sup>。因此, 适宜的温度对选取的菌种性能至关重要。培养温度对菌株 T-9 生长的影响见图 2。

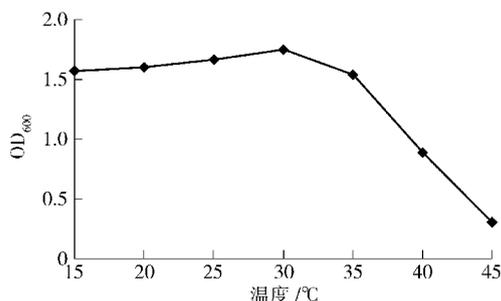


图2 培养温度对菌株 T-9 生长的影响

Fig.2 Effect of temperature on the growth of T-9 strain

由图 2 可以看出, 在不同的培养温度下, 菌株 T-9 在 30 °C 时生物量略高, 但在 15 ~ 35 °C 时 T-9 菌株的生物量变化不大, 表明 T-9 菌株有较广的生长温度, 30 °C 比较适宜。超过 35 °C, 生物量显著降低, 表明更高温度不适于其生长。

#### 2.2.3 耐盐性实验结果

在微生物的实地修复环境中, 土壤的盐碱性对菌株生长有一定影响。将 T-9 菌株以相同接种量接入 NaCl 质量分数为 1%, 3%, 5%, 7%, 9% 的富集培养基中, 30 °C, 180 r/min 培养 3 d, 测定 OD<sub>600</sub> 值, 结果见图 3。

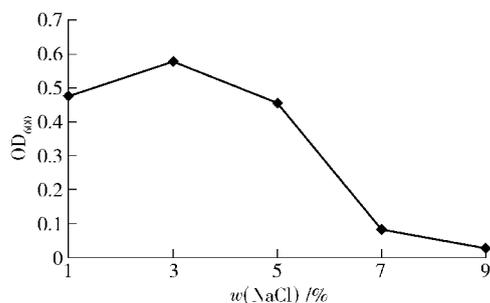


图3 菌株耐盐性实验结果

Fig.3 Results of salt tolerance test

由图3可知,菌株T-9在NaCl质量分数为3%时生长良好,当NaCl质量分数为7%时生长受到抑制,但菌株在NaCl质量分数为1%~5%都能较好生长,说明菌株具有一定的耐盐性。

### 2.3 菌落形态及生理生化实验鉴定结果

菌落光滑呈圆形、较大、湿润,中间隆起,乳白

色,边缘整齐。短杆状,有鞭毛,运动,革兰氏阴性,能利用葡萄糖、乳糖、木糖、甘露醇、谷氨酸钠等作为碳源生长,不能利用硝酸钠作为氮源,但能利用亚铁氰化钾为氮源。葡萄糖产酸产气,淀粉水解为阴性等实验结果及菌落特征见表3,初步鉴定菌株T-9为假单胞菌属。

表3 T-9菌株生理生化特征

Tab.3 Physiological and biochemical characteristics of T-9 strain

菌株编号	菌落特征	个体形态	革兰氏染色	半固体穿刺接种	明胶穿刺接种	果聚糖形成	淀粉水解	葡萄糖发酵	需氧性
T-9	黄白色光滑湿润	短杆状	阴性	运动有鞭毛	液化	阴性	阴性	产酸产气	好氧

### 2.4 废弃蓖麻基润滑油降解处理后红外光谱分析

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。毒性瓶加入了润滑油,虽然没有接入菌液,仍需要加入H<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,目的是为了抑制杂菌对润滑油可能发生的降解。

在降解率的计算方法上,本试验同样消除了培养瓶由于加入菌液而引起的实验误差,较CECL-33-A-93方法简单、快捷,比目前国内常用方法逻辑更加严密,精确度更高<sup>[11]</sup>。

菌株T-9培养7d后经过前期处理萃取后进行红外检测,结果如图4。

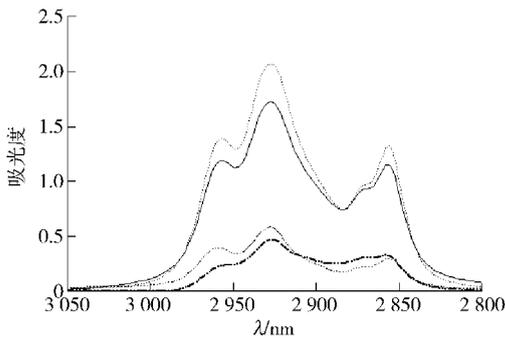


图4 菌株T-9 FT-IR检测谱图

Fig.4 FT-IR spectra of T-9 strain

由图4可知,4组瓶实验中,在2930 cm<sup>-1</sup>处都有特征吸收峰,从上到下依次是毒化瓶,0d测试瓶,7d测试瓶和中性瓶。根据特征峰在2930 cm<sup>-1</sup>处通过J法积分后得出各组瓶的J值,再根据式(1)、(2)计算余油含量和生物降解率。通过计算得出菌株T-9的降解率为72%。

### 2.5 废弃蓖麻基润滑油降解产物的GC/MS分析

废弃蓖麻基润滑油降解产物的GC/MS分析结果如图5。

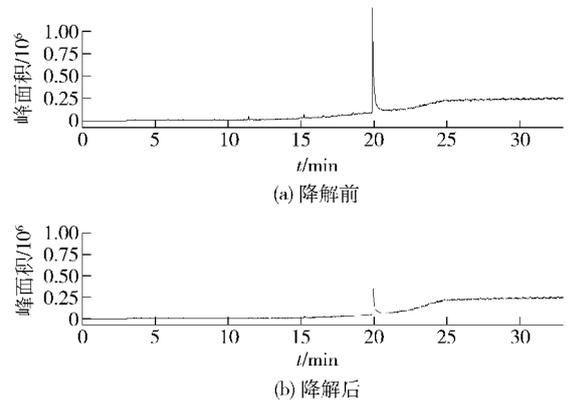


图5 废弃蓖麻基润滑油降解气相色谱分析

Fig.5 Degradation of waste castor oil-based analyzed by gas chromatography

从图5可以看出,(a)、(b)两图均只出现了一个峰,但(b)图的峰高大大降低。根据峰面积计算得出,废弃蓖麻基润滑油降解率为80%左右。

## 3 结论

从蓖麻榨油厂排污口废水中分离筛选出一株高效降解废弃蓖麻基润滑油的菌株T-9,在润滑油质量浓度为10 g/L,初始pH值为5.0,摇床转速为180 r/min,30℃下培养7d后,采用改进的CECL-33-A-93方法测得其对废弃蓖麻基润滑油的降解率为72%。采用GC/MS对降解产物进行分析,测得其对废弃蓖麻基润滑油降解率为80%。经形态学、生理生化实验,初步鉴定为假单胞菌属。

T-9菌株是从自然界中通过驯化分离得到,对其进行废弃蓖麻基润滑油降解实验,并用GC/MS检测降解后的产物,发现蓖麻基润滑油的基础油的降解比较彻底,没有发现其他中间代谢产物,进一步的机理研究还需要探讨。其中,初始pH值、培养温度、营养条件等都对微生物的代谢产物有影响,其主要作用在于:引起细胞膜电荷的变化,从而影响微生物

对营养物质的吸收,影响代谢过程中酶的活性. 另一方面,温度是影响微生物各种特性的重要因素,温度升高,细胞中的生物化学反应速率和生长速率加快,机体的重要组成如蛋白质、核酸和催化反应的酶等可能会受到不同程度的破坏.

蓖麻基润滑油作为一个复杂的化学混合体系,其降解途径因各物质的结构和降解微生物的不同而不同,蓖麻基润滑油基础油的降解性能,决定了它的生物降解性. 因此,绿色蓖麻基润滑油很有希望成为无二次污染的再生能源.

#### 参考文献:

- [1] 张访宜, 田惠琴. 生物降解润滑油的发展及应用[J]. 润滑油, 2001, 16(2): 13-18.
- [2] Goyan L R. Biodergradable lubricants [J]. Lub Eng, 1998, 54(7): 10-17.
- [3] 何良菊, 魏德州, 张维庆. 土壤微生物处理石油的研究[J]. 环境科学进展, 1999, 17(3): 110-115.
- [4] Oprea S. Dependence of fungal biodegradation of PEG/castor oil-based polyurethane elastomers on the hard-seg-

ment structure [J]. Polymer Degradation and Stability, 2010, 95(12): 2396-2404.

- [5] 王卓颖, 王磊, 桂晓琳, 等. 高效降解机油微生物的筛选及除油效果初探[J]. 工业微生物, 2006, 36(1): 26-33.
- [6] Beran E. Experience with evaluating biodegradability of lubricating base oils [J]. Tribology International, 2008, 41: 1212-1218.
- [7] 吴新世, 吴诗坡, 叶启军, 等. 蓖麻油基润滑油生物降解实验方法的改进[J]. 天津师范大学学报: 自然科学版, 2008, 28(4): 13-15.
- [8] Coordinating of European Council. CEC-L-33-A-93. Biodegradability of two stroke cycle outboard engine oils in water[S]. CEC Standard, 1995.
- [9] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 1996: 104-106.
- [10] 游游, 朱琳, 张艳, 等. 含油废水中一株高效油脂降解菌的筛选和鉴定[J]. 生态环境学报, 2010, 19(6): 1378-1382.
- [11] Wu Bo, Wang Changlu, Liu Yaqiong, et al. 2010 first international conference on cellular, molecular biology, biophysics and bioengineering[C]. Qiqihar: Institute of Electrical and Electronics Engineers, 2010: 459-462.

## Isolation of Castor Oil-based Waste Degrading Bacteria and Its Degradation Characteristics

LIU Ya-qiong<sup>1</sup>, WANG Chang-lu<sup>1</sup>, HE Dong<sup>1</sup>, ZHANG Li-hong<sup>1</sup>, CHEN Mian-hua<sup>1</sup>,  
WANG Yu-rong<sup>1</sup>, HE Liang-nian<sup>2</sup>, YE Feng<sup>2</sup>

- (1. School of Food Engineering and Biotechnology/Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;
2. Engineering Research Center for Castor, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** Ten strains which can degrade the waste lubricants were isolated from sewage samples of the outfall of a castor oil extraction plant in Inner Mongolia, China, and T-9 strain showed the strongest lubricant degradation ability. The optimal degradation condition of T-9 strain was pH 5.0, and temperature 30 °C. T-9 strain could grow well in the medium containing 1% ~ 5% NaCl. T-9 strain was identified as *Pseudomonas* by the colony morphology, physiological and biochemical characteristics. By improved CEC-L-33-A-93 method, the degradation rate of castor oil-based waste lubricants was 72% when incubated for 7 days under the conditions as following: 10 g/L oil, initial pH 5.0, rotation speed of 180 r/min, and 30 °C. By GC/MS analysis of degradation products, degradation rate was 80%, indicating that the T-9 strain had good castor-based oil degradation ability.

**Key words:** castor based lubricants; CEC-L-33-A-93; GC/MS; degradation characteristics

(责任编辑:叶红波)