

一株石油降解菌降解条件的优化*

高小鹏, 徐盈, 边志波, 王跃, 刘仲仲

(延安大学生命科学学院, 陕西 延安, 716000)

摘要 利用 Minitab 软件, 采用 PB 设计, 选择温度、pH、接菌量、转速、初始加油量 5 个影响因素, 对从延安川口受石油污染土壤中分离筛选得到的可降解石油菌株 CT-6 的降解条件进行筛选优化, 结果为: 当温度为 39.6℃, pH 为 7.0, 转速为 198 r/min, 接菌量为 8%, 初始加油量为 2.9% 时, 菌株对石油降解率比优化之前提高了 28.3%, 达到 89.4%。

关键词 Minitab 软件, PB 设计, 响应面法, 降解条件, 优化

随着石油工业的发展, 我国石油污染问题日益凸显, 传统的理化方法处理石油污染存在着被动处理、费用昂贵以及容易产生二次污染等缺陷^[1]。大量研究表明, 一些微生物在合适的条件下对石油有很强的降解能力, 目前对于石油降解菌尤其是在石油降解菌的筛选及其降解性能的测定等方面已经做了大量深入的研究^[2-6], 但是对于降解条件优化的相关报道却较少, 且主要局限于采用单因子多水平和正交实验分析的优化方法^[7-10]。本试验从降解石油菌株的降解条件出发, 利用了 Minitab 软件中的 PB 设计和响应面分析对降解石油菌的降解条件进行了优化, 筛选出一组较优的降解条件, 有效地提高了降解率。使该菌株可高效降解石油污染物, 为建立环境友好型社会提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

试验用石油降解菌株 CT-6 由延安大学生命科学学院微生物实验室提供, 试验所用原油采自延安川口采油厂。

1.1.2 试剂

浓硫酸(95% - 98%, 西安三浦精细化工厂)、石油醚(90 - 120℃, 天津市科密欧化学试剂有限公司)、Na₂SO₄(天津市北方天医化学试剂厂), 均为分析纯试剂。

1.1.3 仪器

隔水式电热恒温培养箱(PYX-DHS-40 * 50-BS, 上海跃进医疗器械厂)、紫外分光光度计(UVmini-1240, 日本岛津)、pH 计(pHS-25C, 上海康仪仪器有限公司)、立式压力蒸汽灭菌锅(LS-B50L, 江阴滨江医疗仪器厂)。

1.1.4 培养基

LB 培养基、降解培养基^[11]。

1.2 方法

1.2.1 不同降解条件下 CT-6 的降解性能测定

将种子菌液按试验设计的量接种于降解液体培养基中培养 8 d 后, 利用紫外分光光度法^[12]测定菌株 CT-6 在不同条件下对石油的降解率。

1.2.2 试验设计

(1) Plackett-Burman 设计^[13-14]: 根据菌株降解石油过程中的影响因素, 本试验选取温度、pH、接菌量、转速、加油量 5 个因素进行考察; 选用实验次数 $N = 12$ 的 PB 实验设计, 对上述 5 个因素进行考察, 每个因素分别取高/低 2 个水平, 高水平应为低水平的 1.05 ~ 1.25 倍^[15], 响应值为降解率(Y)。每个试验组重复 3 次, 同时设对照组。

(2) 最陡爬坡实验(Steep ascent design)^[16]: 根据 PB 实验结果, 确定对石油降解影响最为显著的因子, 以试验值变化的梯度方向作为爬坡方向, 在 PB 实验低水平的基础上各自的变化步长为: 温度 +1℃, 转速 -10 r/min, 加油量 -0.1%, 对于另外的 2 个不显著因子, 取 pH 7.0, 接种量 2%。设置 9 个梯度的爬坡实验, 每组重复 3 次, 最陡爬坡设计见表 2。

(3) Box-Behnken 实验设计^[17]: 爬坡实验所得的数据组合并非为最佳组合, 为了更形象、直观地反映出最佳组合所在的区域, 以爬坡实验所得的数据组合

第一作者: 硕士, 讲师。

* 陕西省教育厅专项科研计划项目(No. 08JK493), 延安科技计划项目, 延安大学专项基金(No. YDK2007-33), 延安大学大学生科技创新训练计划项目(No. D2008-90)

收稿日期: 2008-11-14, 改回日期: 2009-02-26

为中心,根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理,利用 Minitab 软件设计 3 因素 3 水平共 15 个试验点的实验,同样每组试验重复 3 次。所确定的重要因素的水平及实验设计见表 3、表 4。

(4)优化实验结果验证^[18]:保持其余条件不变,分别在优化前后和优化后的降解条件下,利用紫外分光光度法^[12]测定菌株 CT-6 对石油的降解率。

2 结果与分析

2.1 影响 CT-6 菌株降解石油重要因素的确定

利用 Minitab 软件对 PB 实验各因素主效应分析的结果见表 1。

表 1 Plackett-Burman 试验因素水平及其主效应分析

因素 编号	名称	水平		T 值	P 值	重要性 排列
		低水平	高水平			
X_1	温度/℃	37	39	4.49	0.005	2
X_3	pH 值	7	8	0.14	0.897	5
X_5	接种量/%	6.4	8	-1.70	0.141	4
X_7	转速/(r·min ⁻¹)	180	225	-4.52	0.004	1
X_8	加油量/%	3.2	4	-3.74	0.010	3

由表 1 可知,转速、温度和加油量对石油降解影响最为显著,可信度在 95% 以上,而接菌量和 pH 2 个因素的可信度均低于 95%,因此确定转速、温度、初始加油量为主要影响因素。

2.2 最陡爬坡实验接近最大响应面区域

最陡爬坡实验结果见表 2。

表 2 最陡爬坡实验设计及结果

试验组	X_1	X_7	X_8	Y
1	37	230	3.2	0.705
2	38	220	3.1	0.752
3	39	210	3.0	0.806
4	40	200	2.9	0.893
5	41	190	2.8	0.831
6	42	180	2.7	0.785
7	43	170	2.6	0.714
8	44	160	2.5	0.687
9	45	150	2.4	0.634

从表 2 实验结果来看,最佳降解条件处于第 4 组与第 5 组之间,故以第 4 组为后续实验的中心点进行响应面分析。

2.3 Box-Behnken 实验

2.3.1 实验设计及结果

在爬坡实验所得数据的基础上,以转速 200 r/min,温度 40℃,加油量 2.9% 组合为中心,进行 Box-Behnken 实验,实验结果见表 4。

2.3.2 二次回归拟合及方差分析

以 Y 为响应值,运用 Minitab 软件进行回归拟

表 3 Box-Behnken 实验因素水平

变量名称	符号	水平		
		-1	0	1
温度/℃	X_1	39	40	41
pH	X_3	7.0	7.0	7.0
接种量/%	X_5	8	8	8
转速/(r·min ⁻¹)	X_7	180	200	220
加油量/%	X_8	2.8	2.9	3.0

表 4 Box-Behnken 实验设计及实验结果

X_1 (温度)/℃	X_7 (转速)/(r·min ⁻¹)	X_8 (加油量)/%	Y
0	0	0	0.892
1	0	1	0.847
-1	-1	0	0.851
-1	0	-1	0.864
0	0	0	0.891
0	-1	-1	0.801
-1	0	1	0.838
0	1	-1	0.813
0	-1	1	0.788
1	0	-1	0.800
-1	1	0	0.793
1	1	0	0.801
0	0	0	0.883
1	-1	0	0.784
0	1	1	0.796

合后,各实验因子对响应值的影响可用回归方程 $Y = 1.0157X_1 + 0.0234X_7 + 9.9471X_8 - 0.0218X_1^2 - 0.0001X_7^2 - 0.0218X_8^2 + 0.0009X_1X_7 + 0.1825X_1X_8 - 0.0005X_7X_8$ 表示。利用 Minitab 软件对回归方程进行方差分析,结果见表 5。

表 5 回归方程的方差分析

方差来源	自由度	均方差	F 值	P 值
回归	9	0.002306	13.71	0.005
一次项	3	0.000563	2.39	0.185
二次项	3	0.005441	32.35	0.001
交互项	3	0.000914	5.44	0.050
离回归偏差	0.0129686			
决定系数/%	96.11			

经 F 检验方程二次项、交互项作用的影响都是显著的。并且决定系数 $R^2 = 0.961$,离回归偏差 $S = 0.0129686$,说明回归方程的拟合程度较好^[19]。这样,就拟合了因素(温度、转速、初始加油量)和响应(降解率)间的全局函数关系,有助于快速建模,缩短了优化时间。

2.3.3 响应面分析及最优降解条件的确定

通过回归方程来绘制分析图,考察所拟合的响应面曲面的形状,响应面立体分析图见图 1。

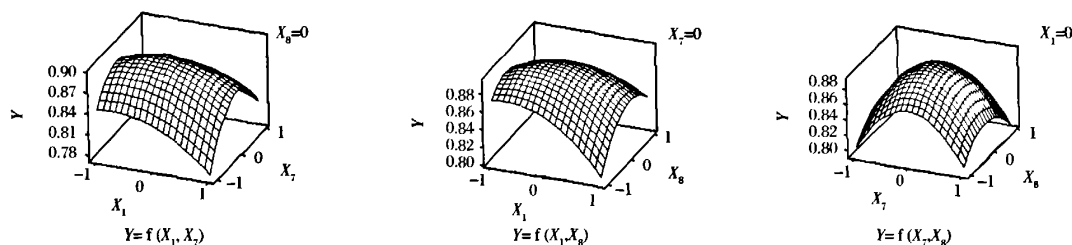


图 1 $Y=f(X_1, X_7)$, $Y=f(X_1, X_8)$, $Y=f(X_7, X_8)$ 响应面立体分析图

对该结果经过 RSA 分析,结果如图 2 所示。

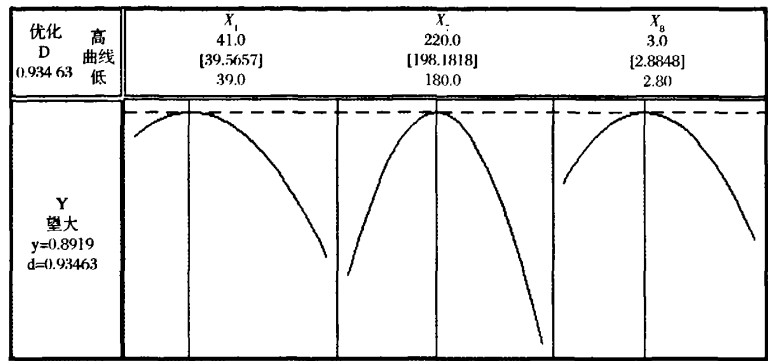


图 2 CT-6 降解条件最优化分析图

由此可确定 3 个因素(温度、转速、初始加油量)的最优实验点(X_1, X_7, X_8)分别为(39.6, 198, 2.9)。

2.4 优化实验结果验证实验

经过实验验证,在降解条件优化前后,石油降解率为分别为 61.1% 和 89.4%;优化后降解率提高了 28.3%,说明该降解条件更有利于菌株 CT-6 对石油的降解。

3 结论

(1) 本实验通过 PB 设计、最陡爬坡实验、Box-Behnken 实验及响应面分析,得到在温度、pH、接菌量、转速、初始加油量 5 个因素中,转速、温度、初始加油量是影响菌株 CT-6 降解石油的关键因素。优化后的降解条件为:温度 39.6℃、pH 7、转速 198 r/min、接种量 8%、初始加油量 2.9%,在该降解条件下,降解率达到了 89.4%,比优化前提高了 28.3%,取得了较好的效果。其原因可能是:①温度对微生物降解石油烃的影响主要是对石油烃物理状态、化学组成的影响以及对微生物本身酶活性的影响,所以石油烃降解速率与温度有关^[20]。在 39.6℃ 时,石油的理化状态可

能易于被降解,菌株 CT-6 的相应的酶的活性也达到最高。②转速直接决定溶氧量,氧对石油类化合物的降解十分重要,同时石油烃微生物降解过程中需要有分子态的氧作为呼吸链电子传递系统末端的电子受体^[21],但转速大于 200 r/min 时,石油降解率增幅不大,原因可能是过高的溶氧浓度限制了菌体生长及代谢^[22]。菌株 CT-6 在转速为 198 r/min 时,对石油降解率较高,与这一结论相吻合;③油量是石油降解菌唯一的碳源,一般而言,应是油越多,细菌生长越好;但是实验发现油量过大反而会抑制菌的生长。可能的原因是油量越大,覆盖于培养基表面的油膜面积越大,使得氧气难以进入,从而影响对石油降解菌供氧,抑制其生长^[22]。本实验中,最陡爬坡实验的结果也证明了这一结论。

(2) 目前对于石油降解菌的研究,尤其是在石油降解菌的筛选及其降解性能的测定等方面已有大量报道^[2-6],但对于降解条件优化的相关研究却相对较少,已有的报道大多采用单因素试验法和正交设计试验法^[7-10],但这 2 种方法本身存在诸如:不考虑因素间的交互作用;因素涉及模糊因子时,不能直接使用

等缺陷^[23]。由于影响菌株降解石油的多个因素之间,存在交互作用,同时,有些因素是模糊因子,因此本试验利用 Minitab 软件对降解条件进行优化,通过 PB 设计和响应面分析法,把因素与实验结果的关系函数化,构建了降解率和相关因素的数学模型,以此对因素进行响应面分析,从而找出各个因素对响应值最佳的水平值,使结果更直观、清楚。为石油降解菌降解条件的优化提供了一种简便、有效的方法,为微生物修复石油污染和下一步的科学研究奠定了坚实的科学基础,为构建环境友好型社会提供了科学的依据。

(3)影响石油降解菌的影响因素很多,由于实验条件所限所以无法全面的加以研究,本试验只是根据文献的报道选取其中 5 个因子作为研究对象,其他因子对降解率的影响还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 刘国良,苏幼明,顾书敏,等. 石油污染土壤生物修复研究新进展[J]. 化学与生物工程, 2008, 25(8): 1-4.
- [2] 郑金秀,张甲耀,赵晴,等. 高效石油降解菌的选育及其降解特性研究[J]. 环境科学与技术, 2006, 29(3): 1-3.
- [3] 贾燕,尹华,彭辉,等. 石油降解菌株的筛选、初步鉴定及其特性[J]. 暨南大学学报, 2007, 28(3): 297-301.
- [4] 刘真,邵宗泽. 南海深海沉积物烷烃降解菌的富集分离与多样性初步分析[J]. 微生物学报, 2007, 47(5): 869-873.
- [5] 杨雪莲,李凤梅,刘婉婷,等. 高效石油降解菌的选育及其降解特性[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(1): 230-233.
- [6] 苏莹,陈莉,汪辉,等. 海洋石油降解菌的筛选与降解特性[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(4): 518-522.
- [7] 白洁,崔爱玲,吕艳华. 石油降解菌对石油烃的降解能力及影响因素研究[J]. 海洋湖沼通报, 2007, 29(3): 43-46.
- [8] 孙玮. 油污染海水中高效石油降解的分离及其降解性能研究[D]. 青岛:青岛理工大学硕士学位论文, 2007.
- [9] 王春艳,丁永生. 石油降解菌的筛选及其降解特性[J]. 大连海事大学学报, 2008, 34(3): 11-12.
- [10] 李宝明,姜瑞波. 营养和环境条件对微生物菌群降解石油的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2008, 45(3): 79-82.
- [11] 杨乐,李春,鲁建江,等. 石油降解菌的筛选及其降解能力的初步研究[J]. 石河子大学学报, 2007, 25(4): 484-487.
- [12] 孙成. 环境监测实验[M]. 北京:科学出版社, 2003, 66-68.
- [13] Plackett RL, Burman JP. The design of optimum multi-factorial experiments[J]. Biometrika. 1946, 33(4): 305-325.
- [14] Akhnazarova S, Prapulla SG. Selection of alcohols through Packett-Burman design in lipase-catalyzed synthesis of anthranilic[J]. Springer Berlin, 2006, 78(1): 49-52.
- [15] 欧宏宇,贾士儒. SAS 软件在微生物培养条件优化中的应用[J]. 天津轻工业学院学报, 2001, 16(1): 14-27.
- [16] 曹小红,蔡萍,李凡,等. 利用响 Bacillus natto TK-1 产脂肽发酵培养基[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(4): 59-65.
- [17] 黄宇,孙宝盛,孙井梅,等. 枯草芽孢杆菌发酵条件的研究[J]. 河南科学, 2007, 25(1): 70-72.
- [18] 马小魁,陈五岭,陈勇. 利用 Minitab 软件优化酵母培养基[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(12): 72-75.
- [19] Kari KN. Metabolic engineering of Lactobacillus Helveticus CNRZ32 for production of Pure L-(+)-Lactic acid[J]. Appl Environ Microbial. 2000, 66(9): 3835-3841.
- [20] 苏荣国,牟伯中,王修林,等. 微生物对石油烃的降解机理及影响因素[J]. 化工环保, 2001, 21(4): 205-208.
- [21] 侯发可. 论影响微生物降解石油烃类物质的因素[J]. 湖南农机, 2007, 34(9): 158-159.
- [22] 苏莹,陈莉,刘兆普. 一株海洋石油降解菌的特性研究[J]. 环境科学研究, 2008, 21(5): 32-36.
- [23] 赵丽坤,郭会灿. 微生物培养基优化方法概述[J]. 石家庄职业技术学院学报, 2008, 20(4): 50-53.

The Optimizing of Degradation Conditions for One Oil-degrading Stain

Gao Xiaopeng, Xu Ying, Bian Zhibo, Wang Yue, Liu Zhongzhong

(College of Life Science, Yan'an University, Yan'an 716000, China)

ABSTRACT The experiment which used minitab software and applied Packett-Burman design selected five factors: temperature, pH, inoculate capacity, rotational speed and the initial amount of oil to optimize the degradation condition of oil degrading strain CT-6 which was isolated and screened from the soil polluted by oil of Chuankou in Yan'an. The result showed as follows: when the temperature was 39.6℃, pH 7.0, inoculate capacity 8%, rotational speed 198 r/min, the original amount of oil 2.9%, the strain CT-6 made the rate of oil degradating increase by 28.3%, which reached 89.4%.

Key words minitab software, packett-burman design, response surface methodology, degradating conditions, optimization.