

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

鹽度對 rhamnolipids 去除底泥顆粒中重金屬的影響 Effect of salinity on remobilization of heavy metals from sediment particles

計畫編號：CNIS 91-06

執行期限：91 年 1 月 1 日至 91 年 12 月 31 日

主持人：何先聰 嘉南藥理科技大學工業安全衛生系

一、中文摘要

使用由 *Pseudomonas aeruginosa* 產生之含生物界面活性劑 rhamnolipids 之萃取液，直接運用於受重金屬污染之底泥，進行重金屬釋出研究，雖重金屬銅之釋出百分比只有約 10-12.5% 之移除率，不如純化過之生物界面活性劑之有效果，但以成本及方便性考量卻有其應用價值存在。另探討浚堦自感潮河段之底泥，使用含生物界面活性劑 rhamnolipids 之萃取液作用時，發現含高鹽度環境下，有助於增加銅自底泥顆粒中釋出百分比。

關鍵詞：鹽度、重金屬、生物界面活性劑

Abstract

The study focuses on the remobilization of copper from contaminated river sediment, which was dredged from the Ell-Ren River, located in the southern Taiwan, with extract of *Pseudomonas aeruginosa* culture broth which contained rhamnolipids- one kind of biosurfactant. The remobilization ratio of Cu from contaminated sediment was only 10-12.5% when compared with the purified rhamnolipids. But it is valuable to consider the convenient use and economic prices. When the contaminated sediment existed in high salinity environment, the extract containing rhamnolipids also was useful for the remobilization of Cu. The higher the salinity existed, the increment of remobilized ratio.

Keywords: Salinity, Heavy Metal,
Biosurfactant

二、緣由與目的

生物界面活性劑漸受到重視，乃因其相對於化學合成之界面活性劑具有下列特性：低毒性，高生物分解性。約 30 幾種具有國際專利之生物界面活性劑已用於食品、家用清潔劑、化妝品、廢污油分解回收、環境保護及農業用途等【1】。生物界面活性劑 (biosurfactant) 乃由細菌、真菌、放線菌等微生物於生長過程中產生，自然環境中許多種優勢菌種皆可於生長過程中製造分泌大量的 biosurfactant。

biosurfactant 具有類似人為合成之界面活性劑性質，且具有比人工合成製造之界面活性劑更易在環境中被分解，其分解代謝產物毒性較人工合成之界面活性劑低之特點【2, 3, 4】。被浚堦到陸地上之受重金屬污染底泥，如能移除底泥中重金屬含量至合乎法規標準將可提高底泥再利用性。採用酸洗法或加入化學合成螯合劑等污染整治方法，雖可去除底泥中重金屬等污染物，但皆可能改變土壤的化學性質及殘留高毒性、不易分解的化學物質，影響日後底泥之再生利用。如果生物界面活性劑可擔任移除底泥中重金屬的工作，則使用後殘留之生物界面活性劑，依其性質推測應可被自然界中微生物分解利用，較沒有難分解物質殘留的問題，可減輕人為污染整治方法對環境造成之負面影響【5, 6】。國外對生物界面活性劑在污染整治領

域的應用才剛起步，可供研究及改良的應用方式及對環境之衝擊等特性仍待探討及改良，期望藉由此研究能開啟國內受污染之土壤及河川底泥污染整治方法的新方向及思維。

Mulligan et. al. 【7】曾使用 rhamnolipid 進行受油及重金屬污染土壤中 Zn, 及 Cu 的溶出試驗。結果經單批次生物性界面活性劑的淋洗，12% rhamnolipid 溶液，可溶出 20% Zn、35% Cu；如經同樣濃度生物性界面活性劑淋洗 5 次，最高可達 100% (Zn) 去除率。

但生物界面活性劑之收集步驟繁複，將增加成本，不利於大量應用於實際之環境上。參考 Mulligan 等的培養條件【7】，四種微生物的培養溫度接設定為 35°C，曝氣速率每分鐘 2.5mL，pH 控制在 6.7，收集培養基上面聚集的泡沫，利用 12000 rpm 高速離心機 (5 min) 去除細菌細胞，加濃 HCl 調整 pH 值降到 2.0，加入 Dichloromethane (1:1, v/v) 放入分液漏斗中，搖動，丟棄水層，重複 3 次，以減壓蒸發法蒸發有機層除去溶劑，收集到之固體物再溶於 pH 8.0 之水中，以濾紙 (Whatman No.1) 過濾除去不純物，再加入濃 HCl 及 Dichloromethane 進行萃取，收集到之固體物即為 Rhamnolipid，收集到的粉末存於 4°C 冰箱中保存。

因此本研究將使用由 *Pseudomonas aeruginosa* 產生之含生物界面活性劑 rhamnolipids【6】之萃取液，直接運用於受重金屬污染之底泥，探討在不同鹽度條件下，對二仁溪下游受嚴重污染河川底泥中重金屬 (銅) 移除效果的影響。

三、研究方法及步驟

(一) 試驗材料及分析方法：

1、人工海水配製：採【8】建議之組

成份，加蒸餾水配製成各種鹽度(5, 10, 15, 20 及 30%)之人工海水。

2、受銅污染之底泥：取二仁溪下游與三宮爺溪交會口之受嚴重污染河川底泥 (0-5 cm) 混合泥樣，經室溫乾燥後研磨待用。

3、含 Rhamnolipids 之萃取液：由細菌 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (CCRC 11633) 及 *Pseudomonas aeruginosa* (CCRC 10303) 培養產生，使用培養基皆為 medium 66。菌種來源為財團法人食品工業研究所-生物資源保存及研究中心 (CCRC)。

4、重金屬含量：以火焰式原子吸收光譜儀分析重金屬含量。

(二) 實驗步驟：

改變重金屬溶出試驗溶液中鹽度 (以人工海水配置)，分成 0%、5%、10%、15%、20%、30%，將含有 Rhamnolipids 之萃取液 5mL，加入不同鹽度溶液 20mL，以 12.5:1 (w/w) 比例和 2.0g 受測試底泥在離心管中混合，離心管先置放在旋轉式攪拌器上攪拌 2 天及 5 天，然後以 10,000 rpm 離心 10 min 獲取上澄液，以原子吸收光譜儀測上澄液中重金屬濃度，研究上澄液中重金屬濃度受鹽度影響。

四、結果與討論

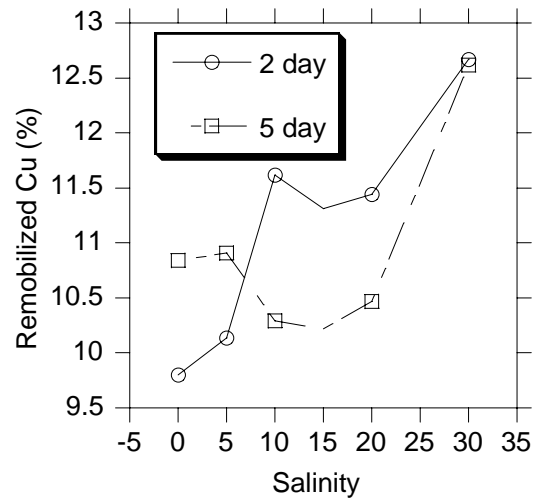
(一) 底泥特性分析

取二仁溪經室溫乾燥後底泥，藉由逐步連續萃取法及重金屬分析測得底泥中總可萃取銅含量為 1050mg/kg。

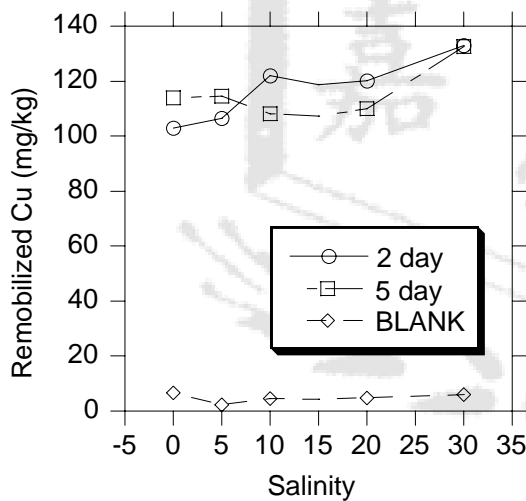
(二) 鹽度影響生物界面活性劑 rhamnolipids 對重金屬銅之釋出

本研究使用之含生物界面活性劑 rhamnolipids 之萃取液是各別由二種 *Pseudomonas aeruginosa* 產生。如圖一及二所示，使用菌種萃取液 (CCRC 11633) 和底泥作用 2 天後，水中鹽度愈高 (由 0 增加至 30%)，銅之釋出濃度愈高 (由 103 mg/kg 增加至 133 mg/kg)，銅之釋出濃度

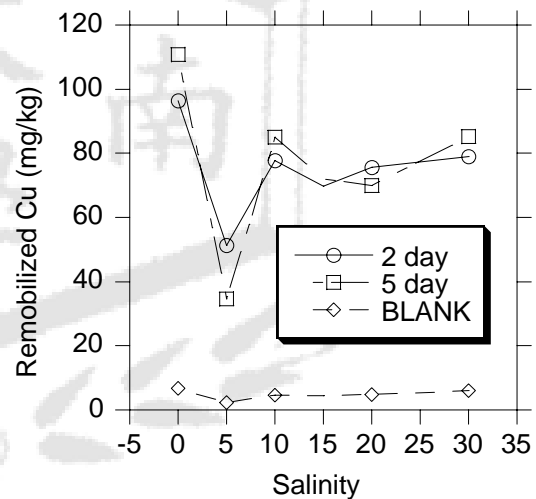
百分比也愈高（由 9.8% 增加至 12.7%），雖比不上 Mulligan et.al. 【7】發表之結果那麼有效：經純化之 12% rhamnolipid 溶液，可自受重金屬污染之土壤溶出 20% Zn、35% Cu，但如以經濟成本考量所省下之純化步驟及費用是值得採用的。如果增加底泥和菌種萃取液反應時間至 5 天，則鹽度低於 5‰ 較好，鹽度繼續增加則去除效果反而減低，推測其原因可能是有效之生物界面活性劑 rhamnolipids 成分在 5 天內被快速分解，使得原來被釋出到水相之銅子，因此又被吸附到底泥顆粒中。另種 *Pseudomonas aeruginosa* (CCRC 10303) 萃取液對底泥中銅之釋出效果較差，水中鹽度愈高（由 5 增加至 30‰），銅之釋出濃度愈高（由 51 mg/kg 增加至 79 mg/kg），銅之釋出濃度百分比也愈高（由 4.9% 增加至 7.5%），如圖三及四所示。



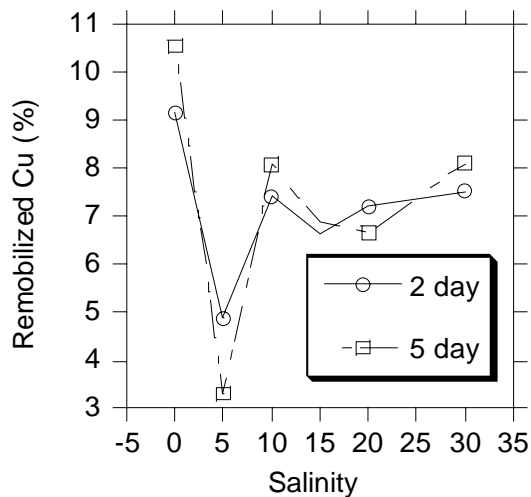
圖二、鹽度影響 *Pseudomonas aeruginosa* (CCRC 11633) 萃取液對底泥顆粒中銅之釋出效果(%)



圖一、鹽度影響 *Pseudomonas aeruginosa* (CCRC 11633) 萃取液對底泥顆粒中銅之釋出效果



圖三、鹽度影響 *Pseudomonas aeruginosa* (CCRC 10303) 萃取液對底泥顆粒中銅之釋出效果



圖四、鹽度影響 *Pseudomonas aeruginosa* (CCRC 10303) 萃取液對底泥顆粒中銅之釋出效果(%)

五、計畫成果自評

本計畫初步探討直接將 *Pseudomonas aeruginosa* (CCRC 10303) 及 *Pseudomonas aeruginosa* (CCRC 11633) 萃取液分別和含重金屬銅之底泥顆粒接觸，發現銅之釋出效果良好，可做為後續模廠化研究之基礎，另底泥中存在之鹽度可增加銅之釋出，將有助於計算河川河口感潮河段底泥中蓄積之重金屬接觸生物界面活性劑 rhamnolipids 時之釋出量。

六、參考文獻

- [1] Hung, H.C.; Shreve, G.S. Effect of the hydrocarbon phase on interfacial and thermodynamic properties of two anionic glycolipid biosurfactants in hydrocarbon/water systems. J. phys. chem. B (in press), 2001.
- [2] Desai, J.D.; Banat, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997, 61, 47–64.
- [3] Lang, S.; Wullbrandt, D. Rhamnolipids – biosynthesis, microbial production and application potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999, 51, 23–23.

- [4] Kitamoto, O.; Yanagishita, H.; Endo, A.; Nakaiwa, M.; Nakane, T.; Akiya, T. Remarkable antiagglomeration effect of a yeast Biosurfactant, Diacylmannosylerythritol, on ice-water slurry for cold thermal storage. Biotechnol. prog. 2001, 17, 362–365.
- [5] Mulligan C.N.; Yong R.N.; Gibbs B.F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. Journal of Hazardous Materials 2001, 85, 111–125.
- [6] Mulligan C.N.; Yong R.N.; Gibbs B.F. On the use of biosurfactants for the removal of heavy metals from oil-contaminated soil. Process Safety Progress. 1999, 18 (1), 50–54.
- [7] Mulligan C.N.; Gibbs B.F. Recovery of Biosurfactants by Ultrafiltration. J. Chem. Tech. Biotechnol. 1990, 47, 23–29.
- [8] Hsieh K.M., Lion L.W., Shuler M.L., 1985. Bioreactor for the study of defined interactions of toxic metals and biofilms. Applied and Environ. Microbiology. 50(5), 1155-1161.

Pseudomonas SP. 的培養：(存於土壤中)

- 一. 自食品工業研究所菌種保存中心購買菌種 *Pseudomonas aeruginosa* CCRC 15561 (以 nutrient agar slope 郵寄)
- 二. 將菌種放入裝有液態培養液 Medium 66 (0.8%, v/v, 50mL) 的三角瓶中進行活化培養，於 30°C，150 rpm 轉速下振盪，隔夜培養。
- 三. 取 500 ml 錐形培養瓶，裝入 300mL 液態培養液 (0.8%, v/v)。植種已經步驟二活化之菌種溶液 (0.1%, v/v)，於 25°C，150 rpm 轉速下振盪培養 15 小時。
- 四. 使用的培養基成分 (Medium 66)：

Tryptic soy agar (Difco 0369)	
Tryptone	15g
Soytone	5g
NaCl	5g
Agar	15g

Distilled water 1.0L
Adjusted pH to 7.



