

枯草杆菌及其热解物烃类的研究^①

吴庆余 章冰

(南京大学生物系, 南京 210093)

盛国英 傅家谟

(有机地球化学国家重点实验室, 广州 510640)

提 要 采用气相色谱和色谱—质谱联用仪对枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)游离烃类及热解烃类进行了分析。枯草杆菌热解产气率较高(67.8ml/g),正异构比值较低,乙烷乙烯比值较高。热解作用使氯仿抽提物含量大幅度提高,达热解前的10.74倍。枯草杆菌游离烷烃以正烷烃为主,主峰为正二十七烷,碳数分布范围为C₁₆—C₃₀。热解产物中烷烃以C₁₂—C₂₀支链烷烃、C₁₂—C₂₅正烷烃和C₁₅—C₂₀类异戊二烯烃为主,主峰为3-甲基十三烷,正烷烃以C₁₅含量最高。文章还讨论了热解作用提高枯草杆菌氯仿抽提物含量,改变烃类分布的可能原因及意义。

关键词 枯草杆菌 烃类

第一作者简介 吴庆余 男 39岁 教授 生物学

细菌存在于现代所有的沉积环境中。在南极、深海区、缺氧盆地、潮间带、盐沼、红树林区以及其它环境的沉积物中,都发现有细菌。它们是海洋和沿岸水体中超浮游生物的固有成分。据报道,在某些沉积物中细菌总数可高达10¹⁰个/克,细菌生物量可能相当于沉积物干重的1%^[1]。研究细菌烃类的组成对油气藏的评价、勘探与开发具有理论上的指导意义。以往的研究多是直接对原油、生油岩或化石样品中的有机质进行分离和分析。由于地质体情况极为复杂,有时难以判断有机质的地球化学特征与母质来源、环境因素、演化阶段之间的对应关系和变化规律。本文选用自然界广泛分布的一种兼性厌氧细菌——枯草杆菌,在实验室条件下纯培养,对培养所获产物的游离烃类和热解烃类进行了分离和分析。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验材料枯草杆菌(*B. subtilis*)由南京农业大学微生物教研室提供,菌种在斜面培养基上室温保存。

1.2 枯草杆菌样品的制备

枯草杆菌的培养采用Spizizen培养基,其成份如下:(NH₄)₂SO₄ 2g, K₂HPO₄ 14g, KH₂PO₄ 6g, 柠檬酸钠(·2H₂O) 1g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, 葡萄糖 5g, 蒸馏水 1000ml。将培养基分装于

^① 国家自然科学基金和有机地球化学国家重点实验室基金资助项目

500ml 锥形瓶中,于 121—126℃(0.1—0.14MPa)灭菌 25min。在超净工作台内从斜面接种少量枯草杆菌于锥形瓶中,放在恒温振荡器内于 35℃培养 4 天 4 夜。将培养所得枯草杆菌浓菌液在 5000 转/分下离心 15min,经洗涤并同样离心两次后,取沉淀置于红外快速干燥器中低温干燥,得枯草杆菌样品。

1.3 热模拟降解实验

将枯草杆菌样品 1.0g 装入安瓿中,用高纯氮气多次连续吹洗和抽气,除去空气,然后抽真空封口。将安瓿置于马弗炉中,以 300℃恒温持续热解 100h,得加热样品。

1.4 热解气体的分离分析

热解后将装有样品的安瓿从马弗炉中取出,用液氮冷冻后按排水取气法取气。用国产 SC-4 型气相色谱仪对 CO₂、H₂、N₂ 进行分析,CO₂ 用 GDX104 柱,H₂ 用 5A 分子筛柱,N₂ 用 13X 分子筛柱加活性炭,柱温均为 50℃,H₂ 用高纯氮气,其余 2 种用氢气作载气。用美国产 HP-5890II 型气相色谱仪对 C₁—C₅ 烃类进行分析,用 Al₂O₃/KCl 柱,采用 50m 长毛细管柱,内径 0.53mm,柱温 60—150℃,60℃保留 4min,升温速率 30℃/min,载气为 N₂。

1.5 可溶有机质的分离和分析

热解前后的两个枯草杆菌样品分别以氯仿为溶剂进行 72h 索氏抽提获可溶有机质,用石油醚沉淀沥青后上硅胶氧化铝柱,用石油醚、苯和丙酮相继洗脱,将可溶有机质分离为烷烃、芳烃和非烃等 3 种组分。用美国 Finnigan—MAT TSPQ 70B GC—MS—MS 仪对烷烃组分进行色谱—质谱分析,色谱柱为 SPB-5 毛细管柱,柱长 60m,程序升温 60—295℃,升温速率 3℃/min,终温恒温 20min,氢气为载气。

2 结 果

2.1 热解产气分析结果

枯草杆菌在常压 300℃下热解产气分析结果见表 1。其热解产气率较高(67.8ml/g)。正异构比值较低($nC_4/iC_4=1.19$, $nC_5/iC_5=0.50$),说明热解气体中存在较多的异构烃气。乙烷与乙烯比值(9.36)较高,说明热解气体中饱和烃气相对含量较高。

表 1 热解产气组分

Table 1 Gases thermally generated from *B. subtilis*

产气率 (ml/g)	产 气 组 分 (%)										
	CH ₄	C ₂ H ₄	C ₂ H ₆	C ₃ H ₈	iC ₄	nC ₄	iC ₅	nC ₅	H ₂	CO ₂	N ₂
67.8	4.38	0.33	3.09	2.34	0.22	0.26	0.04	0.02	1.09	59.1	11.9

2.2 可溶有机质分析结果

2.2.1 枯草杆菌热解前后氯仿抽提物分析

枯草杆菌热解前后产出的有机质中氯仿抽提物含量及热解产物中烷烃、芳烃、非烃三种组分相对百分比的分析结果如表 2 所示。枯草杆菌热解前氯仿抽提物含量为 3.92%,热解作用使其氯仿抽提物含量提高了 9.74 倍,达到 42.11%。但其中烷烃组分的含量仍很低,只有 3.21%。

表 2 氯仿抽提物的含量和组成

Table 2 Contents and compositions of the chloroform extractable organic matter

氯仿抽提物名称	占细胞干重 (%)	族 组 分 (%)		
		烷 烃	芳 烃	非烃+沥青质
枯草杆菌氯仿抽提物	3.92			
热解产物氯仿抽提物	42.11	3.21	6.78	90.0

2.2.2 枯草杆菌游离烷烃特征

枯草杆菌游离烷烃组成较为简单(图1),以正烷烃为其主要成分。图1中主峰经鉴定为正二十七烷,正烷烃分布范围为 C_{16} — C_{30} 。在枯草杆菌游离烷烃中还发现一些在总离子流图上看不出来的微量生物标志物,包括姥鲛烷和植烷,环己烷系列化合物 C_nH_{2n} ($n=20,21,22,23$)和 C_{20} 二环烷烃。游离烷烃中甾烷、萜烷类生物标志物含量极低。共检测出甾烷3种,萜烷4种。其中甾烷为 $5\alpha,14\alpha,17\alpha,20R$ -胆甾烷, 24 -甲基- $5\alpha,14\alpha,17\alpha,20R$ -胆甾烷和 24 -乙基- $5\alpha,14\alpha,17\alpha,20R$ -胆甾烷。萜烷为 $17\alpha,21\beta$ -藿烷, $16\alpha,21\beta$ -30-降藿烷, C_{23} 三环二萜烷和 C_{26} 三环二萜烷。萜烷中明显地以藿烷占优势。

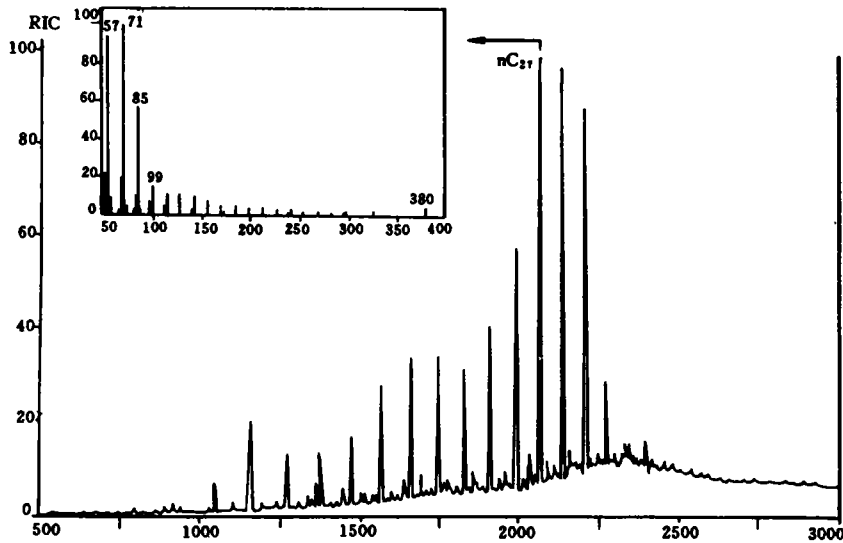


图 1 枯草杆菌游离烷烃组份总离子流图和相关质谱图

Fig. 1 RIC fragmentogram and relative mass spectrum of the saturated hydrocarbons from *B. subtilis* before thermal degradation

2.2.3 枯草杆菌热解产物中的烷烃特征

枯草杆菌热解产物中烷烃组分较游离烷烃复杂。其色谱-质谱分析结果如图2和表3所示。正构烷烃、支链烷烃和类异戊二烯烃是枯草杆菌热解烃类中烷烃的主要组成部分。正构烷

烃碳数分布范围为 $C_{12}-C_{25}$, 集中分布在 $C_{13}-C_{17}$, 其中以 C_{15} 正烷烃含量最高。支链烷烃在低碳数范围占据明显优势, 3-甲基十三烷为主峰。类异戊二烯烃碳数分布范围为 $C_{15}-C_{20}$, 其中 2,6,10-三甲基十二烷、2,6,10-三甲基十三烷、2,6,10-三甲基十四烷含量较高。枯草杆菌热解烃类烷烃组分中甾烷的含量明显比游离烷烃中高(峰号 34,35)。另外, 还检测到了 C_{16} 环己烷(峰号 16)。

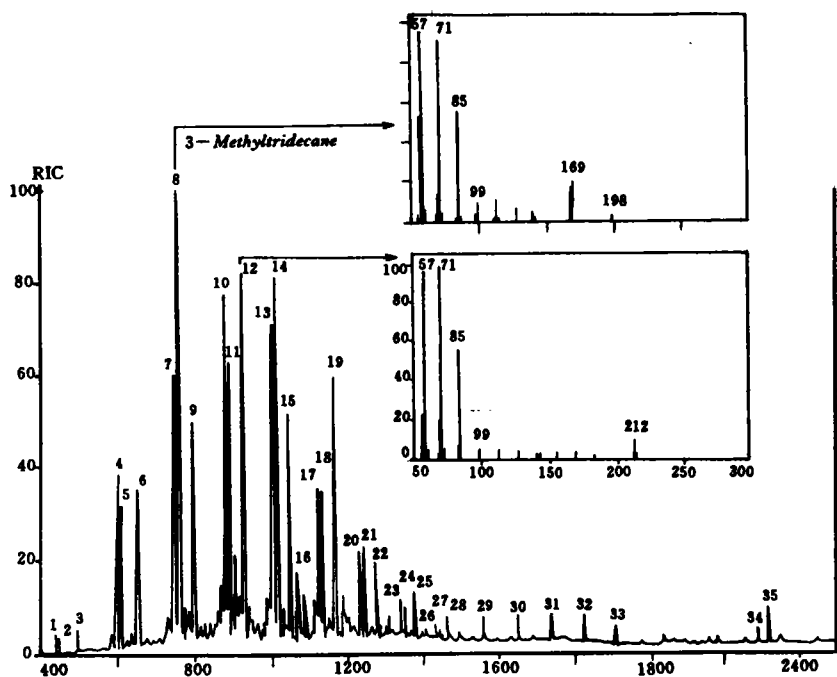


图 2 枯草杆菌 300°C 热解烷烃组份总离子流图和相关质谱图

Fig. 2 RIC fragmentogram and relative mass spectra of the saturated hydrocarbons from *B. subtilis* after thermal degradation at 300°C

类似于游离烷烃, 在热解烃类烷烃组分中也存在一些微量生物标志物。它们包括, 环己烷系列化合物 C_nH_{2n} ($n=16, 17$) 和二环烷烃系列化合物 C_nH_{2n-2} ($n=16, 17, 18, 19, 20$)。甾烷生物标志化合物除含量较高的 24-乙基-5 α , 14 α , 17 α , 20R-胆甾烷和 24-乙基-5 α , 14 β , 17 β , 20R-胆甾烷外, 还检测到了 5 α , 14 α , 17 α , 20R-胆甾烷和 24-乙基-5 α , 14 α , 17 α , 20S-胆甾烷。萜烷含量很低, 仅有微量 17 α , 21 β -藿烷。

3 讨 论

3.1 热解条件下氯仿抽提物含量增加的可能来源

从表 2 看出, 热解作用可大幅度提高枯草杆菌中氯仿抽提物的含量。我们推测氯仿抽提物含量的提高, 可能来源于常温下不溶的类干酪根成分在高温作用下向可溶有机质转化。由实验结果我们认为, 枯草杆菌来源的类干酪根具有较好的生油潜力, 这从一个方面反映了细菌作为

重要的生油母质的可能性。

3.2 热解前后正烷烃碳数分布的变化及其意义

枯草杆菌热解前游离正烷烃碳数分布范围为 $C_{16}-C_{30}$, 主峰为正二十七烷。热解后其正烷烃碳数分布范围为 $C_{12}-C_{25}$, 主峰为正十五烷。热解作用使正烷烃碳数分布向低碳数移动, 主峰碳也前移。碳数分布范围及主峰碳前移的原因可能有两个, 一是长链正烷烃在高温下的断裂, 二是样品中低分子量脂肪酸在热解作用下脱羧生成短链烷烃⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾。细菌中最普遍报道的脂肪酸为十六碳烯酸和十八碳烯酸⁽¹⁾, 因此加热样品中, 主峰正十五烷可能来自于枯草杆菌中的十六碳烯酸。同时, 相对丰度亦较高的正十七烷可能来自于十八碳烯酸。

表3 热解产物中主要烷烃组分

Table 3 Main n -alkanes thermally generated from *B. subtilis*

峰号	特征碎片	分子量	分子式	化合物
1	85	170	$C_{12}H_{26}$	2-甲基十一烷
2	85	170	$C_{12}H_{26}$	3-甲基十一烷
3	85	170	$C_{12}H_{26}$	正十二烷
4	85	184	$C_{13}H_{28}$	2-甲基十二烷
5	85	184	$C_{13}H_{28}$	3-甲基十二烷
6	85	184	$C_{13}H_{28}$	正十三烷
7	85	198	$C_{14}H_{30}$	4-甲基十三烷
8	85	198	$C_{14}H_{30}$	3-甲基十三烷
9	85	198	$C_{14}H_{30}$	正十四烷
10	85	212	$C_{15}H_{32}$	4-甲基十四烷
11	183	212	$C_{15}H_{32}$	2,6,10-三甲基十二烷
12	85	212	$C_{15}H_{32}$	正十五烷
13	183	226	$C_{16}H_{34}$	2,6,10-三甲基十三烷
14	85	226	$C_{16}H_{34}$	3,5-二甲基十四烷
15	85	226	$C_{16}H_{34}$	正十六烷
16	83	224	$C_{16}H_{32}$	C_{16} 环己烷
17	85	240	$C_{17}H_{36}$	4-甲基十六烷
18	183	240	$C_{17}H_{36}$	2,6,10-三甲基十四烷
19	85	240	$C_{17}H_{36}$	正十七烷
20	85	254	$C_{18}H_{38}$	4-甲基十七烷
21	183	254	$C_{18}H_{38}$	2,6,10-三甲基十五烷
22	85	254	$C_{18}H_{38}$	正十八烷
23	85	268	$C_{19}H_{40}$	4-甲基十八烷
24	183	268	$C_{19}H_{40}$	2,6,10-三甲基十六烷
25	85	268	$C_{19}H_{40}$	正十九烷
26	85	282	$C_{20}H_{42}$	4-甲基十九烷
27	183	282	$C_{20}H_{42}$	2,6,10-三甲基十七烷
28	85	282	$C_{20}H_{42}$	正二十烷
29	85	296	$C_{21}H_{44}$	正二十一烷
30	85	310	$C_{22}H_{46}$	正二十二烷
31	85	324	$C_{23}H_{48}$	正二十三烷
32	85	338	$C_{24}H_{50}$	正二十四烷
33	85	352	$C_{25}H_{52}$	正二十五烷
34	217	400	$C_{29}H_{52}$	24-乙基-5 α ,14 α ,17 α ,20R-胆甾烷
35	217	400	$C_{29}H_{52}$	24-乙基-5 α ,14 β ,17 β ,20R-胆甾烷

过去对细菌来源的地质样品的研究中, 以 C_{17} 或 C_{25} 为正烷烃主峰碳均有报道⁽⁵⁾。我们从实验结果推测, 较低成熟度细菌来源的正烷烃主峰碳为高数碳, 较高成熟度细菌来源的正烷烃主

峰碳为低碳数。

3.3 加热样品中支链烷烃的大量出现及其意义

中部单甲基支链烷烃系列已在许多沉积物和石油中发现,关于其来源有几种推测^[6]。一种认为是支链烷烃的直接贡献,另一种则认为是成岩转化的产物。对中部单甲基支链烷烃可能直接为生物来源的讨论主要集中在蓝细菌上,因为它们是已知生物合成这种烷烃的唯一微生物^[6]。在我们的实验中加热样品中部单甲基支链烷烃和双甲基支链烷烃大量出现(表3),表明不含支链烷烃的细菌样品经热解作用后也可生成大量支链烷烃。因此我们认为,古代沉积物中存在的中部单甲基支链烷烃和双甲基支链烷烃可能是具官能团的类脂先驱物(如异构-和反异构-羧酸)或正烷烃成岩转化的产物。

收稿日期:1994年10月5日

参 考 文 献

- [1] R. B. 约翰斯主编,1991,沉积记录中的生物标志物,王铁冠等译,北京:科学出版社,171—182。
 [2] 吴庆余等,1993,异养黄化藻类产烃研究新发现,中国科学(B辑),23(4),423—429。
 [3] Philp, R. P., 1980, Comparative organic geochemical studies of recent algal mats and sediments of algal origin. In: P. A. Trudinger, M. R. Walter and B. J. Ralph (Editors), Biogeochemistry of Ancient and Modern Environments. Australian Academy of Science, Canberra, A. C. T., 173—187。
 [4] David, R., 1992, Comments on the source of petroleum hydrocarbons in hydrous pyrolysis, Org. Geochem. 18(1):79—81。
 [5] R. P. 菲尔普著,1987,化石燃料生物标志物,傅家谟、盛国英译,北京:科学出版社,11—13。
 [6] Shiea, J. et al., 1990, Mid-Chain branched mono- and dimethyl alkanes in hot spring cyanobacterial mats: A direct biogenic source for branched alkanes in ancient sediments? Org. Geochem. 15(3),223—231。

Study on the Free and Pyrolyzed Hydrocarbons of *Bacillus. Subtilis*

¹Wu Qingyu ¹Zhang Bing ²Sheng Guoying and ²Fu Jiamo

(1. Department of Biology, Nanjing University, Nanjing 210093)

(2. Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640)

Abstract

The free hydrocarbons and vacuum pyrolyzed hydrocarbons of *B. subtilis* were analyzed by GC and GC-MS system. The gas generation rate in *B. subtilis* during thermal degradation was high (67.8ml/g), the ratio of normal and isomeric alkanes was low, and that of ethane to ethylene was high. The content of chloroform extractable organic matter increased by 9.74 times after thermal degradation. The free hydrocarbons were mainly composed of C₁₆-C₃₀ n-alkanes with C₂₇ as a main peak. The pyrolyzed hydrocarbons were mainly composed of C₁₂-C₂₀ branched-chain alkanes, C₁₂-C₂₅ n-alkanes and C₁₅-C₂₀ isoprenoid alkanes, with 3-Methyltridecane as a main peak, the content of C₁₅ n-alkane was the highest among all n-alkanes.

Key words: *B. subtilis* Hydrocarbon