

曹娟, 刘怡辰, 张振华, 等. 2009 脂肽类生物表面活性剂产生菌的分离及特性研究 [J]. 环境科学学报, 29(10): 2056–2062

Cao J, Liu Y C, Zhang ZH, et al. 2009 Isolation and characterization of lipopeptide biosurfactant-producing microorganism Y8A [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 29(10): 2056–2062

脂肽类生物表面活性剂产生菌的分离及特性研究

曹娟¹, 刘怡辰¹, 张振华¹, 冉炜², 沈标^{2*}

1 南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095

2 南京农业大学资源和环境科学学院, 江苏省固体废弃物资源化高新技术研究重点实验室, 南京 210095

收稿日期: 2008-04-22 修回日期: 2009-03-31 录用日期: 2009-08-13

摘要: 从石油污染土壤中分离筛选获得一株产生生物表面活性剂菌株 Y8A, 经生理生化实验、16S rDNA 序列分析等将其鉴定为芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)。Y8A 能在 22h 内将发酵液的表面张力从 $68.3 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 降到 $23.5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 。经 TLC 和傅立叶红外光谱分析, 菌株 Y8A 产生的生物表面活性剂为脂肽类。 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}^{2+}$ 和 Fe^{2+} 能显著促进其生长和表面活性剂的产生; 菌株 Y8A 在 20~30°C, pH 5~12 范围内产生表面活性剂的能力较强; LB 培养基中添加 1% 乳糖对生长的影响不大, 但能够明显促进 Y8A 产生生物表面活性剂, 而葡萄糖、蔗糖抑制表面活性剂的产生。Y8A 能够促进石油降解菌 Y1D 和 F1-1 对石油的降解和功夫菊酯降解菌 ZZH 对功夫菊酯的生物降解。

关键词: 生物表面活性剂; 分离鉴定; 发酵工艺优化; 生物修复

文章编号: 0253-2468(2009)10-2056-07 中图分类号: X171 文献标识码: A

Isolation and characterization of lipopeptide biosurfactant-producing microorganism Y8A

CAO Juan¹, LIU Yichen¹, ZHANG Zhenhua¹, RAN Wei², SHEN Biao^{2*}

1 Key Laboratory of Agricultural Environment of Microbiological Engineering Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Nanjing 210095

2 Jiangsu Provincial Key Lab for Organic Solid Waste Utilization, College of Natural Resource and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

Received 22 April 2008 received in revised form 31 March 2009; accepted 13 August 2009

Abstract A biosurfactant-producing bacterium Y8A was isolated from the petroleum-polluted soil. Strain Y8A was identified as *Bacillus* sp. according to its morphological features, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequences. Strain Y8A could decrease the surface tension of the medium from $68.3 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ to $23.5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ after 22h incubation. The biosurfactant produced by strains Y8A was identified as lipopeptide by TLC and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}^{2+}$ and Ca^{2+} could promote the growth of Y8A and production of biosurfactant. Addition of 1% lactose in LB medium was helpful to the production of biosurfactant by strain Y8A although no obvious promotion to the growth was observed. Strain Y8A grew better and produced more biosurfactant at 20~30°C, pH 5~12. Y8A could enhance the biodegradation of petroleum-oil by Y1D and F1-1 and the biodegradation of insecticide by ZZH.

Keywords biosurfactant; isolation and identification; fermentation condition optimizing; bioremediation

1 引言 (Introduction)

生物表面活性剂 (Biosurfactant) 是微生物在一定条件下产生的一些具有一定界面活性, 集亲水基和疏水基结构于一体的两亲化合物 (左晶等 2005)。正是由于具有这种既亲油又亲水的两亲性分子结构, 生物表面活性剂才能具有分散、加溶、润

湿、渗透等性能。生物表面活性剂促使烃类在水溶液中有效分散, 调节微生物细胞与烃类的有效接触, 促进细胞对烃类的吸收。与化学合成的表面活性剂相比, 它们除了具有降低表面张力、稳定乳液和发泡等相同特性外, 还具有一般化学合成表面活性剂所不具备的无毒、可生物降解等特性 (Nitschke et al., 2007), 有利于环境保护。因此, 近

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 30870081, 20677027)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30870081, 20677027)

作者简介: 曹娟 (1982-), 女, E-mail vky-1007@hotmail.com; * 通讯作者 (责任作者), E-mail sherbiao@njau.edu.cn

Biography: CAO Juan (1982-), female, E-mail vky-1007@hotmail.com; * Corresponding author, E-mail sherbiao@njau.edu.cn

年来对生物表面活性剂的研究日益增多,并在石油污染的生物降解与生物修复、提高原油采收率等领域得到广泛应用 (M akkar *et al*, 2003; Maria *et al*, 2005). 1968年, Arima 等首次发现 *Bacillus subtilis* FO3039能够产生脂肽类生物表面活性剂 (Arima *et al*, 1968). KyungHee Shin 等研究表明,通过添加生物表面活性剂可促进对菲污染土壤的修复作用 (Kyung *et al*, 2006). 表面活性剂的自然降解过程还没有定论,其用于土壤修复后对土壤成分是否有影响的研究还很少 (Catherine *et al*, 2005). 本文从胜利油田分离出一株高产表面活性剂细菌,研究了其生理生化特性、产表面活性剂的条件,以及在促进石油和农药降解中的作用.

2 材料和方法 (Materials and method)

2.1 土壤样品及菌株

石油污染土壤采自山东胜利油田,用于分离产表面活性剂的微生物和进行生物修复试验. 试验菌株 *Bacillus* sp Y8A, *Chryseobacterium* sp Y1D, *Sphingomonas* sp F1-1为本研究分离,功夫菊酯降解菌 *Bacillus* sp ZZH 为本实验室分离保藏.

2.2 培养基

无机盐培养基 (MM 培养基 $g \cdot L^{-1}$): NH_4NO_3 6H₂O 1.0, KH_2PO_4 1.0, K_2HPO_4 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.5×10^{-5} , pH 7.0

富集培养基: 100mL MM 培养基中加入 0.5mL 液体石蜡, pH 7.0

发酵培养基: 即 LB 培养基 ($g \cdot L^{-1}$), 酵母粉 5, 蛋白胨 10, NaCl 10, pH 值 7.0

血琼脂培养基: 购于南京普朗医药设备有限公司.

2.3 生物表面活性剂产生菌的分离、筛选

称取石油污染土壤 2g 加 100 mL 无菌水, 摇床上振荡 2 h, 取上清液 10 mL 接种到装有 90 mL 富集培养基的摇瓶中, 于 30 °C、170 $r \cdot m \cdot min^{-1}$ 的恒温摇床上振荡培养 3 d, 取培养液转接到富集培养基中, 转接 2 次. 取富集液进行稀释, 将不同浓度的稀释液分别涂布在血琼脂培养基上, 经培养后选择产生溶血圈的菌落, 在 LB 平板上划线纯化, 获得初筛纯培养菌株. 再根据排油能力 (Adria *et al*, 1998; Lin *et al*, 1998) 和表面张力的测定进一步筛选产生表面活性剂能力强的菌株.

2.4 菌株的鉴定

对分离纯化得到的菌株进行生理生化试验、16S rDNA 序列同源性分析等, 确定其分类地位. 生理生化试验参照文献 (东秀珠等, 2001), 菌株的 16S rDNA 克隆参照文献 (Sambrook *et al*, 2002) 进行. 正向引物: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物: 5'-TACCTGTACGACTT-3'. 16S rDNA 序列由 Invitrogen 公司测序. 在 RDP 数据库比对分析, 选取同源性较高的序列根据 Bioedit MEGA3.1 软件采用邻接法构建系统进化树.

2.5 发酵条件对菌体生长及表面活性剂产生的影响

液体种子按 1% 接种量接于 50mL 发酵培养基中, 一定温度下 170 $r \cdot m \cdot min^{-1}$ 摇床培养 24 h, 分别从碳源、通气量、初始 pH 值、培养温度、金属离子等几个方面进行研究. 发酵结束后测定菌体发酵液的 OD₆₀₀ 及表面张力值.

2.6 分析测定方法

菌体生物量的测定: 采用比色法 (范秀荣等, 1993) 测定培养液的 OD₆₀₀.

表面张力测定: 采用环法 JYW-200A 自动界面张力仪 (承德实验机有限责任公司生产) 测定表面张力, 每个样品测定 3 次, 取其平均值. 具体方法参见文献 (Cooper *et al*, 1981).

乳化性能测定: 取两个刻度试管, 一支加入 5mL 石蜡和 5mL 水作为空白对照, 另一支加入 5mL 石蜡和 5mL 菌体发酵液, 用 AS2060B 型超声波发生器 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司) 处理 30min, 然后一定时间内分别测量乳化液和油相的体积. 相同实验条件下 3 次重复取平均值.

生物表面活性剂的萃取与分析: 取发酵液, 12000 $r \cdot m \cdot min^{-1}$ 离心 20 min 去除菌体; 上清液用浓 HCl 调 pH 值至 2.0, 出现絮状沉淀, 4 °C 静置过夜, 然后 12000 $r \cdot m \cdot min^{-1}$ 离心 15 min 收集沉淀; 用 pH 2.0 的酸水洗涤 1 次, 随后将该沉淀溶于 NaOH 溶液, 使最终 pH 为 7.0, 用 CH₂Cl₂ 抽提, 取有机相, 待 CH₂Cl₂ 挥发后得固体表面活性剂粗品 (Cooper *et al*, 1981).

薄层层析 (TLC) 分析: 取表面活性剂粗品, 溶于二氯甲烷中, 将样品点在硅胶板上, 以氯仿/甲醇/水 (V:V:V = 65:15:2) 为展开剂展开, 用不同的显色剂显色: ①苯酚-硫酸试剂 糖脂类显棕色斑点; ②茚三酮显色剂 脂肽类显红色; ③蒽酮硫酸显色剂

糖脂类显黄色。

生物表面活性剂的 FT-R 分析: 采用德国布鲁克光谱仪器公司生产的 TENSOR27 傅立叶红外光谱仪。

原油的测定: 采用重量法, 参考文献 (麦伟清等, 1999)。

功夫菊酯的测定: 全量萃取待测样品。待测样品 30mL, 加入 5mL 二氯甲烷, 剧烈振荡 5min, 静置分层, 用移液管小心吸取上层二氯甲烷层, 下层水相再加入 5mL 二氯甲烷提取 1次; 合并 2次收集的有机相, 加入 5g 无水 Na_2SO_4 , 除去有机相中的少量水分。用 SHMADZU 型号为 UV-2401PC 紫外分光光度计测定, 功夫菊酯在波长为 230nm 处具有最大吸收峰。

2.7 生物表面活性剂产生菌的应用

2.7.1 表面活性剂产生菌在石油污染土壤生物修复中的应用 石油污染土壤风干后过筛混匀, 分为 6组进行对比试验, 每组设计 5个平行: ①加入产生生物表面活性剂菌株 Y8A 菌液; ②加入烷烃降解菌株 Y1D 菌液; ③加入芳香烃降解菌株 F1-1 菌液; ④加入 Y8A 和 Y1D 菌液; ⑤加入 Y8A 和 F1-1 菌液; ⑥加入 Y8A、Y1D 和 F1-1 菌液。土壤为 500g 接菌量均为 1.1×10^8 个 $\cdot \text{g}^{-1}$, 混匀, 以不加菌液土壤为对照。容器表面覆盖塑料薄膜, 扎孔通气, 30℃ 培养 30d 采用重量法测定土壤中原油残留量。

2.7.2 表面活性剂产生菌在促进功夫菊酯生物降解中的作用 将 Y8A 和功夫菊酯降解菌 ZZH (本实验室分离、保存) 接种在加入 $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 功夫菊酯 (质量浓度为 99.7%) 的 MM 培养基 (30mL) 中, 接种量为 1%, Y8A 和 ZZH 的接种比例为 1:1。30℃, $170\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养 2d 后测定功夫菊酯的降解率。

3 结果 (Results)

3.1 菌株的分离、筛选

石油污染土壤经过富集培养、血平板初筛, 排油活性以及表面张力测定复筛, 最终获得一株高效产生表面活性剂的菌株 Y8A。菌株在发酵培养基中培养 24h 后, 可将发酵培养基的表面张力由起始的 $68.3\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 下降到 $32.4\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 。

3.2 菌株的鉴定

3.2.1 菌株 Y8A 的生理生化特性 Y8A 在 LB 平板上培养 2d 后菌落呈淡黄色、圆形、不透明、边缘不平整、表面扁平、湿润粗糙。菌体呈长杆状, 革兰氏

染色阳性, 菌株的生理生化特性见表 1。

表 1 菌株 Y8A 的生理生化特征

Table 1 Characteristics of Y8A			
特性	Y8A	特性	Y8A
革兰氏染色	+	过氧化氢酶	+
M. R 试验	-	硝酸盐利用	+
V. P 试验	+	产 H_2S	-
吲哚试验	-	产氨	+
明胶液化	+	糖发酵	蔗糖 -
苯丙氨酸脱氢酶	-		麦芽糖 +
柠檬酸盐试验	+		乳糖 -
水解淀粉	-		葡萄糖 +
水解纤维素	-		甘露醇 +

3.2.2 16S rDNA 序列同源性及系统发育分析 将 Y8A 的 16S rDNA 序列 (EU 293156) 在 RDP 数据库比对分析, 选取数据库中同源性较高的 16S rDNA 序列, 采用 Bioedit MEGA 3.1 软件对 Y8A 进行系统发育分析, 构建系统进化树 (图 1)。结果表明, Y8A 与 *Bacillus pumilus*^(T) (AF234854) 同源性最高 (100%), 再结合以上生理生化特性, 将 Y8A 初步鉴定为芽孢杆菌属。

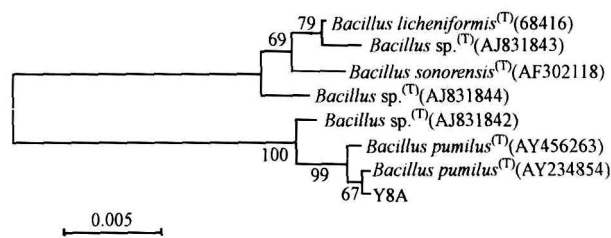


图 1 根据 Y8A 及其相关菌株的 16S rDNA 构建的系统发育图

Fig 1 Phylogenetic tree constructed by the neighbor joining approach based on the 16S rDNAs of Y8A and related strains

3.3 发酵培养基及发酵条件的优化

3.3.1 菌体生长与发酵液表面张力的关系 菌体生长和培养液表面张力值之间的关系如图 2 所示。

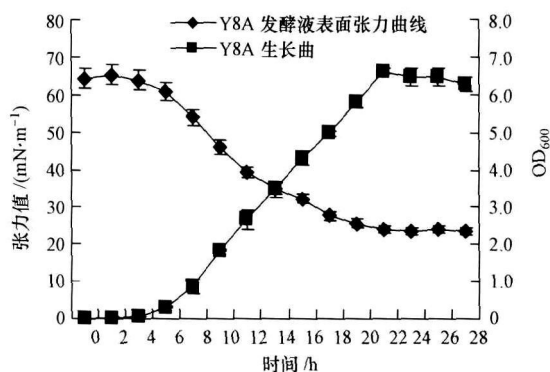


图 2 Y8A 的生长曲线和表面张力曲线

Fig 2 The relationship between growth of Y8A and surface tension

菌体生长量与发酵液表面张力呈反比, 菌株 Y8A 的表面张力随着菌体生长而下降. 菌株 Y8A 生长的延迟期为 8h, 8h 后进入对数生长期直至 22h, 菌体浓度达到最大, 与之相应的培养液的表面张力达到最小. 在生长衰亡期, 张力值比较稳定.

3.3.2 不同碳源对菌体生长和产表面活性剂的影响 如图 3a 所示, 在 LB 培养基中加入蔗糖、葡萄

糖、乳糖、麦芽糖和木糖 (终浓度为 10 g L^{-1}), 其中葡萄糖、乳糖和麦芽糖对生长的影响不大, 而加入蔗糖和木糖还不利于菌体的生长. 乳糖能够明显降低 Y8A 发酵液的表面张力, 最低达到 $28.6 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, 麦芽糖和木糖对发酵液的表面张力影响不大, 而加入蔗糖、葡萄糖反而使发酵液表面张力值升高.

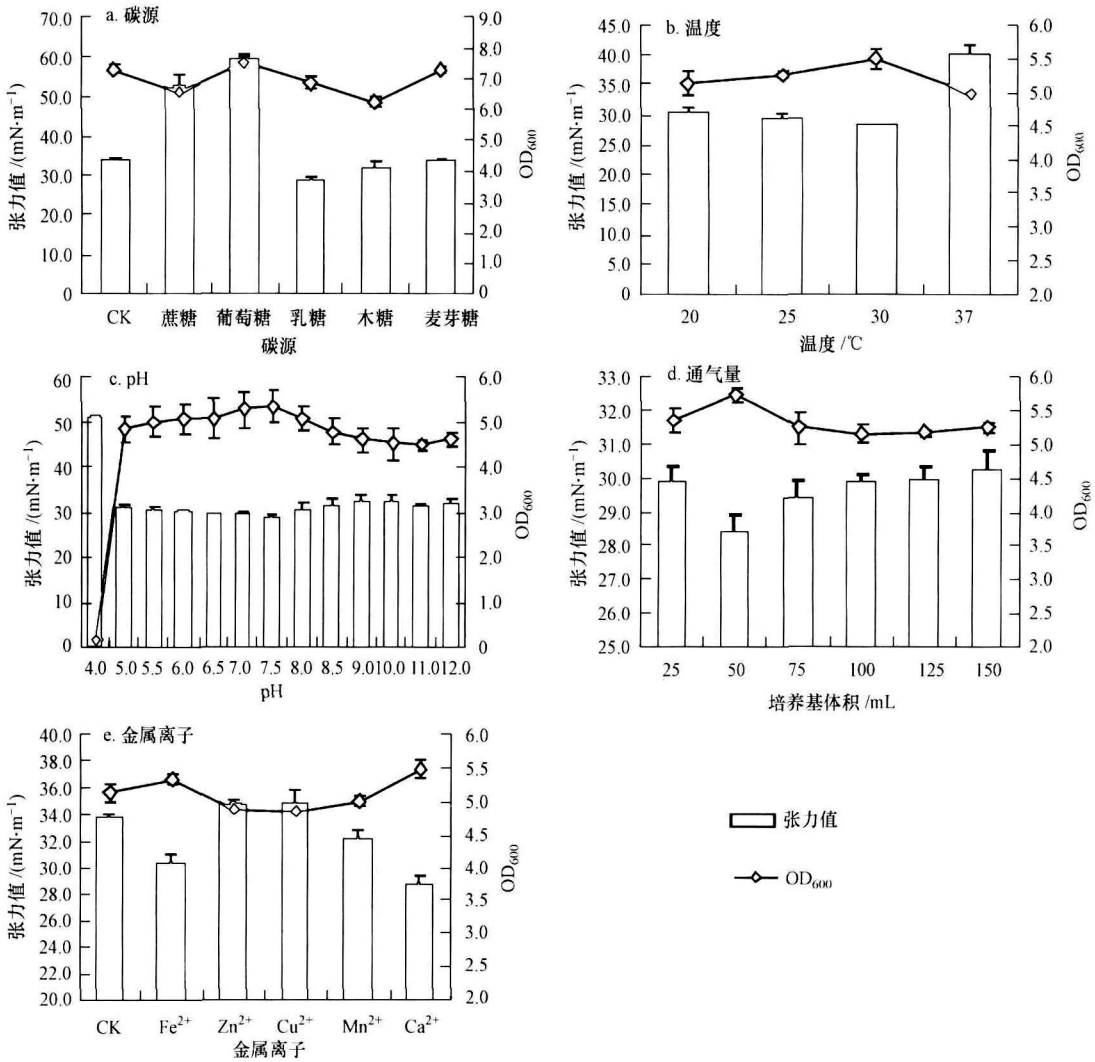


图 3 环境因素对发酵液表面张力和菌体生长的影响

Fig 3 Effect of environmental factors on growth of Y8A and surface tension of the culture

3.3.3 温度对菌体生长和表面活性剂产生的影响 培养温度分别选取 20°C、25°C、30°C、37°C, 不改变其它发酵条件, 结果如图 3b 所示. 从图 3b 可以看出, 30°C 为 Y8A 的最适生长温度, 产生的表面活性剂量最大, 发酵液表面张力值最低达到 $28.3 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$. 但 20°C 和 25°C 时菌体生长和表面活性剂的产生也较好, 表明其具有较宽的温度适应范围. 虽然 37°C 对菌体的生长影响不大, 但明显影响表面

活性剂的产生.

3.3.4 pH 值对菌体生长和表面活性剂产生的影响 将发酵培养基的初始 pH 分别调至 4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、10.0、11.0、12.0 30°C 培养 22h, 其它培养条件同上, 结果如图 3c 所示. Y8A 具有很宽的 pH 适应范围, 但最适宜的 pH 为中性及偏酸, 偏碱的环境对生长稍有抑制. pH 对产生表面活性剂的影响与对生长的影响相一致, 但

总的来说影响不显著. 在 pH 4.0时, 生长和产表面活性剂均受到严重抑制.

3.3.5 通气量对菌体生长和表面活性剂产生的影响 在 250mL三角瓶中分别加入 25、50、75、100、125、150mL发酵培养基, 其它发酵条件不改变. 如图 3d所示, 在装液量为 50mL时生长最好, 培养液的张力值最低, 而在其他装液量时, 生长和培养液表面张力都差不多.

3.3.6 金属离子对菌体生长和表面活性剂产生的影响 在培养基中分别加入各种金属离子 (Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+}), 使其终浓度均为 20 mg L^{-1} . 其它发酵条件不改变, 22h后取样, 测定发酵液的 OD_{600} 及表面张力值. 图 3e结果表明 $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ 能够显著促进 Y8A的生长和表面活性剂的产生, 使发酵液表面张力降低 ($29.7 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$), 其次为 Fe^{2+} ; 而 $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ 和 Cu^{2+} 抑制 Y8A的生长和表面活性剂的产生. $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ Mn}^{2+}$ 对 Y8A的生长和表面活性剂的产生有轻微的促进作用.

3.4 Y8A的表面活性剂的乳化性能

将发酵液与石蜡混合后, 每隔 8h检测乳化体积的变化, 连续监测 48h结果表明与空白对照相比, Y8A发酵液能很好的乳化石蜡, 混合后 24h内, 乳化体积保持 100%. 虽然随着时间的延长, 乳化体积有所下降, 但下降速度非常缓慢, 48h仍使乳化体积达到 80%. 也能使原油的乳化状态保持较长的时间, 放置 7d后, 乳化体积仍可以达到 70%.

3.5 表面活性剂的定性分析

Y8A发酵产生的生物表面活性剂粗品 TLC分析结果如图 4所示, 表面活性剂与茚三酮显色剂显色后呈现紫红色, 初步判定菌株产生的是脂肽类生物表面活性剂.

如图 5所示, 在 FT-IR谱图上, 3291.23 cm^{-1} 是由分子链间氢键引起的 NH收缩振动谱带, 3071.74 cm^{-1} 是 NH基团的分子内氢键引起的 NH伸缩谱带, 1653.49 cm^{-1} 、 1534.97 cm^{-1} 分别为酰胺谱带 I 和 II. 这些特征吸收表明该表面活性剂分子含有肽链. 谱图上 $2960 \sim 2870 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1455 \sim 1380 \text{ cm}^{-1}$ 的两处吸收是脂肪族碳链的 C-H伸缩振动, 1231.19 cm^{-1} 和 699.51 cm^{-1} 附近是内酯的特征吸收, 表明该表面活性剂分子含有脂肪酸分子. 因此, 该表面活性剂分子是脂肽类分子.

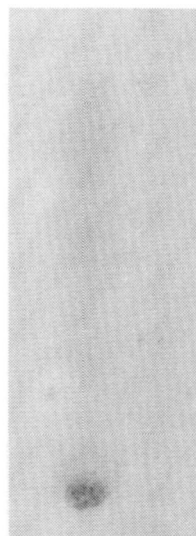


图 4 Y8A 薄层层析照片

Fig. 4 Thin-layer chromatography of the biosurfactant produced by Y8A

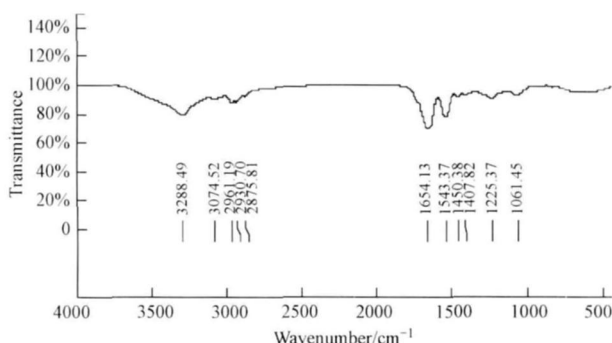


图 5 菌株 Y8A 产生的生物表面活性剂的红外吸收光谱图

Fig. 5 FT-IR profile of biosurfactant from strain Y8A

3.6 生物表面活性剂产生菌的应用

3.6.1 促进石油降解作用 混菌试验结果(表 2)表明, 将石油降解菌和生物表面活性剂产生菌种 Y8A 共同接种于石油污染土壤中, 原油的降解率显著增加. 菌株 Y1D、F1-1单独用于石油污染修复时, 石油的降解率分别为 48.13% 和 43.69%; 而添加 Y8A 后, 石油的降解率分别提高到 79.62% 和 74.51%. 说明 Y8A产生的生物表面活性剂对石油

表 2 Y8A 对石油污染生物修复的促进作用

Table 2 Promotion of bioremediation of crude oil-polluted soil			
处理	降解率	处理	降解率
A	12.76%	A + B	79.62%
B	48.13%	A + C	74.51%
C	43.69%	A + B + C	83.26%

注: A: Y8A, B: Y1D, C: F1-1.

降解具有促进作用。

3.6.2 促进农药降解作用 拟除虫菊酯类农药是一类高效、广谱农药, 且具有低毒性和能被生物降解之特性, 但其残留却给人们的健康带来了巨大的威胁。功夫菊酯是拟除虫菊酯类农药中的一种, 不溶于水。

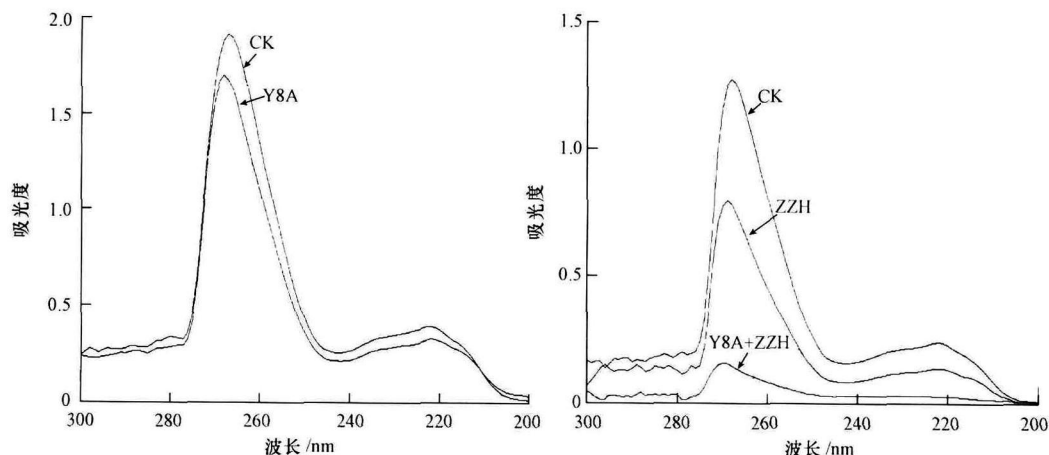


图 6 生物表面活性剂产生菌 Y8A 对农药降解的促进作用 (a Y8A 在农药培养基中的生长; b 混菌后 Y8A 对 ZZH 有促进农药降解的作用)

Fig 6 Biosurfactant-producing bacteria Y8A can enhance the degradation of pesticide (a Y8A growth in the medium with pesticide; b enhancement of pesticide degradation of strain ZZH by mixed culture)

4 讨论 (Discussion)

目前已经报道的产生物表面活性剂的微生物虽然较多, 但其中大多数微生物产生表面活性剂的能力较弱, 发酵液的表面张力主要集中在 $30 \sim 35 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 之间。有些生物表面活性剂产生菌如假单胞菌等虽然使发酵液表面张力较低, 但需要较长培养时间才能达到较低的表面张力值 (梁生康等, 2005)。

有关表面活性剂的应用研究有很多, 但在促进农药残留降解方面还鲜有报道。我国是一个农业大国, 农药的大量使用势必造成环境的污染。拟除虫菊酯类农药是一类广泛使用的农药, 不溶于水, 其残留给人们的健康带来了巨大的威胁。菌株 Y8A 能显著提高拟除虫菊酯降解菌 ZZH 对拟除虫菊酯的降解率, 这对于农药土壤污染的生物修复作用具有十分重要的意义。

石油烃类化合物的微生物降解是一个复杂的过程, 影响石油烃降解的因子很多, 如石油烃的组成、物理状态、温度、时间、供氧及营养物质等, 其中石油烃的物理状态对其降解有显著影响。研究表明, 表面活性剂具有增溶、分散等作用, 能增加难溶烃类化合物在水中的溶解度, 乳化油类以利于油类

试验结果 (图 6) 表明: Y8A 能在含有农药的 LB 培养基中生长但几乎没有降解效果, 功夫菊酯降解菌 ZZH 单独培养时, 功夫菊酯的降解率为 33.7%, ZZH 和 Y8A 共同培养时, 功夫菊酯的降解率为 87.7%。结果表明生物表面活性剂产生菌能显著地促进农药的降解。

与微生物接触, 从而促进了石油烃的降解 (Cybulski *et al.*, 2003)。菌株 Y8A 能利用石蜡产生表面活性剂, 其本身能用于石油污染的生物修复, 而且产生的表面活性剂能促进石油的分解, 这比利用其他底物产生表面活性剂用于生物修复具有更大的意义。

5 结论 (Conclusions)

1) 本研究从石油长期污染的土壤中分离出一株产生物表面活性剂菌株 Y8A, 经形态观察、生理生化实验、16S rDNA 序列分析将其鉴定为芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)。

2) 生物表面活性剂粗品经 TLC 分析和 FT-IR 测定, 判定为脂肽类生物表面活性剂。在 LB 培养基中加入 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ca^{2+} , 在温度为 30°C 、pH 值为 7.5 装液量为 50 mL 的条件下, Y8A 产生表面活性剂的能力最强, 发酵液表面张力值最小降到 $23.5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 。

3) 本试验菌株能够促进烷烃降解菌 Y1D 和芳香烃降解菌 F1-1 对石油的降解, 使石油降解率分别从 48.13%、43.69% 上升到 79.62%、74.51%。同时, 菌株 Y8A 还能促进 ZZH 菌株对功夫菊酯的降解。

责任作者简介: 沈标 (1960—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为土壤微生物学。主持或参与国家自然科学基金面上项目、国家“863”课题、国家重大专项研究课题等, 涉及到环境污染物的微生物降解及修复技术以及土传病害的生物防治, 发表学术论文 50 余篇, 主编教材 1 部, 参与编写专著 2 部; 已获国家专利 2 项, 获国家科技进步二等奖 1 项, 省级科技进步 3 等奖 1 项。

参考文献 (References):

- Adria A, Bodour A A, Raina M, *et al* 1998 Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms [J]. *Journal of Microbiological Methods* 32: 273—280
- Arima K, Akinuma A, Tamura G. 1968 Surfactin a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 31 (3): 488—494
- Catherine N M. 2005 Environmental applications for biosurfactants [J]. *Environmental Pollution* 133: 183—198
- Cooper D G, Macdonald C R, Duff S B J. 1981 Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions [J]. *Appl Environ Microbiol* 42 (3): 408—412
- Cybulski Z, Dziurka E, Kaczorek E, *et al* 2003 The influence of emulsifiers on hydrocarbon biodegradation by Pseudomonadacea and Bacillaceae strains [J]. *Spill Sci & Technol Bull* 8: 503—507
- 东秀珠, 蔡妙英. 2001 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 62—65
- Dong X Z, Cai M Y. 2001. *Manual of Systematic and Determinative Bacteriology* [M]. Beijing: Science Press, 62—65 (in Chinese)
- 范秀荣, 李广武, 沈萍. 1993 微生物学实验 (第 2 版) [M]. 北京: 高等教育出版社
- Fan X R, Li G W, Shen P. 1993. *Microbiology Experiment* (2nd ed) [M]. Beijing: High Education Press (in Chinese)
- J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 2002 分子克隆实验指南 (第 3 版) [M]. 北京: 科学出版社
- Sambrook J, Russell D W. 2003 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed) [M]. Beijing: Science Press (in Chinese)
- Kyung H S, Kyung W K, Yeonghee A. 2006. Use of biosurfactant to remediate phenanthrene-contaminated soil by the combined solubilization-biodegradation process [J]. *Journal of Hazardous Materials* 137: 1831—1837
- 梁生康, 王修林, 陆金仁, 等. 2005 假单胞菌 O-2-2 产鼠李糖脂的结构表征及理化性质 [J]. *精细化工*, 22(7): 499—502
- Liang S K, Wang X L, Lu J R, *et al*. Structure characterization and physico-chemical properties of rhamnolipids produced by pseudomonas O-2-2 [J]. *Fine Chemicals* 22(7): 499—502 (in Chinese)
- Lin S C, Lin K G, LO C C. 1998. Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant [J]. *Enzyme Microb Technol* 23: 267—273
- 麦伟清, 谷巍, 齐大勇. 1999 重量法测定污水中矿物油含量的改进 [J]. *石油化工*, 28: 402—403
- Mai W Q, Gu W, Qi D Y. 1999. Improvement of a standard gravimetric method for determination of mineral oil in sewage [J]. *Petrochemical Technology*, 28: 402—403 (in Chinese)
- Makkar R S, Rockne K J. 2003. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Environ Toxicol Chem*, 22 (10): 2280—2292
- Maria S, Kuyukina Irena B, *et al* 2005. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system [J]. *Environment International* 31: 155—161
- Nischke M, Costa S G V A O. 2007. Biosurfactants in food industry [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 18: 252—259
- 左晶, 王学川. 2005. 生物表面活性剂的应用 [J]. *化学工业与工程技术*, 26(2): 23—26
- Zuo J, Wang X C. 2005. Application of biosurfactants [J]. *Journal of Chemical Industry & Engineering* 26(2): 23—26 (in Chinese)