

# 生物表面活性剂产生菌的筛选及其发酵条件的初步优化<sup>①</sup>

梁艳玲<sup>1,2,3</sup>, 骆永明<sup>2,3\*</sup>, 刘五星<sup>2,3</sup>, 王纯利<sup>1</sup>, 李振高<sup>2,3</sup>

(1 新疆农业大学资源与环境学院, 乌鲁木齐 830052;

2 中国科学院南京土壤研究所土壤环境与污染修复重点实验室, 南京 210008;

3 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 (中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

**摘要:** 以石油为 C 源, 经过富集培养从石油污染土壤中筛选出 15 株具有较强产生生物表面活性剂能力的菌株。其中菌株 BS-5 产生生物表面活性剂的能力最强, 该菌发酵液的表面张力可达 27.3 mN/m (空白发酵液表面张力为 54.5 mN/m)。通过红外光谱分析发现该菌产生的生物表面活性剂为糖脂类物质。另外, 通过正交试验对该菌的培养基条件进行初步优化, 结果以植物油 10 g/L、MgSO<sub>4</sub> 0.2 g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L、蛋白胨 1.0 g/L、FeSO<sub>4</sub> 0.05 g/L、CaCl<sub>2</sub> 0.02 g/L、初始 pH 值 7.5 为最佳。通过 16S rDNA 测序结果表明该菌为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。

**关键词:** 生物表面活性剂; 菌株筛选; 正交试验; 培养条件优化

**中图分类号:** X172

生物表面活性剂是微生物合成的具有双亲性(分子结构中同时具有亲水性和亲油性基团)的一类化合物<sup>[1]</sup>。微生物产生的生物表面活性剂包括许多不同的种类<sup>[2]</sup>, 如糖脂、脂肽、多糖-脂类复合物、磷脂、脂肪酸和中性脂等。它们主要是由利用碳氢化合物作为 C 源的微生物产生, 并可以乳化这些 C 源, 以利菌体的吸收<sup>[3]</sup>。有研究表明, 添加生物表面活性剂有利于石油烃污染土壤的修复<sup>[4]</sup>。目前市场上大部分表面活性剂都是化学合成的, 使用化学表面活性剂可能会产生二次污染。与化学表面活性剂相比, 生物表面活性剂由于具有降低表面张力、稳定乳化液、无毒、能生物降解等特点, 因此在石油工业和环境工程中展示出独特的应用前景<sup>[5]</sup>。目前, 生物表面活性剂已在石油的降黏、提高原油采收率、重油污染土壤的生物修复等领域得到广泛应用<sup>[6]</sup>。刘五星等<sup>[7]</sup>分离得到一株醋酸钙不动杆菌 X13, 该菌具有很强的乳化柴油的能力, 发酵液与柴油漩涡振荡均匀静置 24 h 后, 乳化层所占比例明显。有研究表明, 用产生生物表面活性剂菌株的菌液直接进行石油污泥洗脱处理, 石油去除率较好, 取得了很好的除油效果<sup>[8-9]</sup>。另外, 它们在药物、食品、化妆品、个人卫生用品及其他行业的应用也越来越广

泛。

本文拟在平板分离石油污染土壤中优势菌株的基础上, 通过测定发酵液的表面张力从中筛选出具有较强产生生物表面活性剂的菌株。并利用薄层层析、红外光谱分析和 16S rDNA 对菌株及表面活性剂的成分进行鉴定。以及采用正交试验对菌株最优产生生物表面活性剂的培养条件进行初步优化, 为后续的工业化生产奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 富集培养基 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g、葡萄糖 2 g、KCl 1.1 g、NaCl 1.1 g、FeSO<sub>4</sub> 0.028 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g、MgSO<sub>4</sub> 0.5 g、微量元素 5 ml、原油 10 g、去离子水 1000 ml、pH 7~7.5。微量元素溶液(g/L): ZnSO<sub>4</sub> 0.02、CaCl<sub>2</sub> 0.024、CuSO<sub>4</sub> 0.025、MgSO<sub>4</sub> 0.017。

1.1.2 斜面培养基 牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂 15~20 g、去离子水 1000 ml、pH 7.0~7.2。

1.1.3 发酵培养基 柠檬酸钠 10 g、MgSO<sub>4</sub> 0.2 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1.0 g、FeSO<sub>4</sub> 0.05 g、CaCl<sub>2</sub> 0.02 g、去离子水 1000 ml、pH 7.0~7.2。

①基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2002CB410809)、国家自然科学基金重点项目 (40432005) 和中国科学院南京土壤研究所知识创新工程领域前沿项目 (ISSASIP0724) 资助。

\* 通讯作者 (ymluo@issas.ac.cn)

作者简介: 梁艳玲 (1981-), 女, 山西运城人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物方面研究。E-mail: lylzcc@163.com

## 1.2 试验方法

**1.2.1 菌株富集与分离** 称取石油污染土样 10 g, 加入 90 ml 无菌水, 200 r/min 摇床振荡 2 h; 静置 30 min 后取上清液 10 ml 接种到装有 100 ml 富集培养基的摇瓶中, 于 30℃、200 r/min 的恒温摇床上振荡培养 3 天, 以摇瓶中的培养菌液作为菌种, 在同样条件下进行二次转接培养。

将二次培养菌液做适当稀释, 取适当稀释度的菌悬液在细菌分离培养基上进行平板涂布分离, 选择生长较好的菌株进一步在平板上划线纯化, 挑取单菌落保存在斜面培养基上。

**1.2.2 菌体形态观察及 16S rDNA 鉴定** 通过革兰氏染色, 显微镜观察菌体形态; 菌种自斜面接种到 LB 培养基中, 30℃、200 r/min 摇床培养 24 h。镜检确定无杂菌后 5000 r/min 离心 15 min 收集菌体。菌体 DNA 的分离纯化使用 FastDNA<sup>®</sup> 试剂盒。根据文献设计引物如下: Primer 1, 8f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; Primer 2, 1541r: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' (f 代表正向引物, r 代表反向引物)。Primer 1 和 Primer 2 用于 DNA 的 PCR 扩增和 DNA 测序。16S rDNA 的扩增参照文献[6]描述的方法。

**1.2.3 发酵培养** 将斜面保存菌株接种到发酵培养基中, 30℃、200 r/min 振荡培养 3 天。

**1.2.4 发酵液表面张力测定** 采用环法测定发酵液表面张力, 仪器为山东海诺仪器有限公司生产的 ZL-2100 型全自动界面张力测定仪。

**1.2.5 薄层层析分析** 取 20 ml 发酵液 4000 r/min 离心 5 min, 上清用等体积氯仿/甲醇 (2/1, v/v) 混合, 静置 5 min, 6000 r/min 离心 10 min, 取上清进行薄层层析, 展开剂为氯仿/甲醇/水 (65/15/2, v/v/v)<sup>[10]</sup>。显色剂为: ①苯酚-硫酸试剂; ②钼酸铵-高氯酸显色剂<sup>[11]</sup>; ③0.5% 茚三酮丙酮溶液。

**1.2.6 红外光谱分析** 取 200 ml 发酵液 10000 r/min 离心 20 min, 2 次, 上清用盐酸调 pH 值为 2.0, 再用等体积的乙酸乙酯萃取, 取上层萃取液于 50℃ 蒸去溶剂, 100℃ 烘干得生物表面活性剂粗品。粗品用二氯甲烷溶解, 而后过硅胶柱, 用氯仿-氯仿/甲醇 (2/1, v/v) 依次洗脱, 收集并蒸去溶剂<sup>[12-13]</sup>。取生物表面活性剂适量, KBr 压片, 用 FT-IR 670 型红外光谱仪进行红外光谱分析。

**1.2.7 培养条件优化** 以发酵培养基为基础, 对 C 源、N 源的种类及装液量、初始 pH 值、培养温度设置不同的水平 (表 1), 其他成分及水平不变。种子液按一定的接种量接于发酵培养基 (250 ml 摇瓶) 中, 200 r/min 培养 16 ~ 20 h, 采用正交试验方法对各因素水平进行初步优化, 发酵结束后测定菌体发酵液的表面张力。

表 1 试验因素水平表 [L<sub>25</sub>(6<sup>5</sup>)]

Table 1 Factors and levels in orthogonal experiment [L<sub>25</sub>(6<sup>5</sup>)]

水平	C 源	N 源	pH	装液量 (ml/250 ml)	温度 (℃)
1	葡萄糖	蛋白胨	6.0	30	20
2	糖蜜	硝酸铵	7.0	50	25
3	植物油	酵母膏	7.5	100	30
4	柠檬酸钠	尿素	8.0	150	35
5	石蜡	豆粕粉	8.5	200	40

## 2 结果与讨论

### 2.1 生物表面活性剂产生菌的筛选及鉴定

在菌种筛选过程中, 选择合理的培养基可以减少筛选生物表面活性剂菌株的工作量。本试验采用石油作为选择性培养基的唯一 C 源, 对油泥样品中的微生物种群经过富集培养、平板分离, 共获得 57 株细菌, 并对各菌株进一步发酵培养, 测定发酵液的表面张力, 得到产表面活性剂较强及稳定性较好的菌株 15 株, 发现这些菌株都能使发酵液的表面张力从 54.5 mN/m 降

到 30 mN/m 以下 (纯水的表面张力为 71.5 mN/m) (表 2)。说明这些菌株的代谢产物有明显降低表面张力的作用, 其中有 3 株菌使发酵液的表面张力分别降到 27.8、27.3、27.4 mN/m, 而效果最好的一株菌编号为 BS-5。

菌株 BS-5 菌落半透明, 表面光滑, 隆起; 经过革兰氏染色为 G<sup>-</sup>、杆状、无芽孢。在此基础上利用 FastDNA<sup>®</sup> kit 提取, 并采用 PCR 扩增得到该菌株的 16S rDNA。经测序, 菌株的 16S rDNA 扩增片段长度

表 2 筛选菌株产表面活性剂的表面张力

Table 2 Surface tensions of the strains screened producing biosurfactant

菌株号	表面张力(mN/m)	菌株号	表面张力(mN/m)
1	28.0	9	29.6
2	28.3	10	29.3
3	27.8	11	28.2
4	28.2	12	29.4
5	27.3	13	29.2
6	29.7	14	30.0
7	28.7	15	29.0
8	27.4		

注：空白发酵液表面张力为 54.5 mN/m，纯水表面张力为 71.5 mN/m。

为 1528 bp。在 GenBank 中的登陆注册号为 EU381200。用 BLAST 程序对菌株 BS-5 的 16S rDNA 序列与 GenBank 的核苷酸序列进行相似性分析，结果发现菌株 BS-5 与铜绿假单胞菌的相似性为 99%，可以判断 BS-5 菌株为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。

### 2.2 发酵液表面张力的变化与生长曲线

以发酵培养 24 h 的发酵液为种子液，4% 的接种量接入新鲜发酵培养基中培养，每 4 h 取样测其发酵液的表面张力和生物量 (OD 值) 变化，结果如图 1 所示。图 1 表明该菌株在 4 h 左右进入对数生长期，发酵液的表面张力随菌体量的增加而降低。16 h 后菌体量进入稳定期，此时发酵液的表面张力达到最低值，且在 12 h 以后，发酵液的表面张力趋势一致，表明该菌株所产的生物表面活性剂有较好的稳定性。

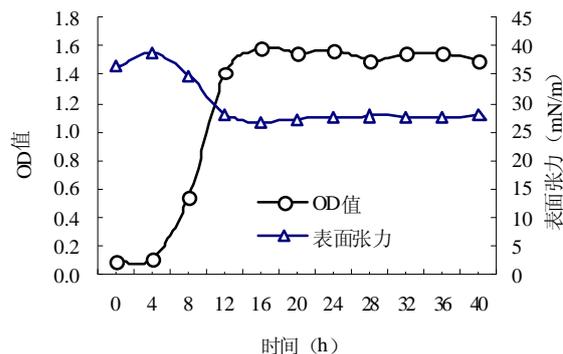


图 1 发酵液表面张力变化与生长曲线的关系

Fig. 1 Changes of surface tension and cell growth in the culture with time

### 2.3 生物表面活性剂成分分析

生物表面活性物质经硅胶薄层层析，经特异性显色剂处理显示糖脂斑点，可判断该菌株产糖脂类生物表面活性剂。

通过红外光谱对其产物进行测定 (图 2)，图中有几个明显的吸收峰，分析表明存在着下列基团：3403.61  $\text{cm}^{-1}$  波段吸收峰表明分子中有大量羟基存在；3100 ~ 2900  $\text{cm}^{-1}$  波段吸收峰是糖类 C-H 的伸缩振动，1400 ~ 1200  $\text{cm}^{-1}$  是 C-H 变角振动；1719.63  $\text{cm}^{-1}$  是 C=O 的双键振动；1075.29  $\text{cm}^{-1}$  为 C-O-C 键伸缩振动，说明分子中有一个五元环状内酯和糖苷键存在。根据图谱分析和文献 [14]，此菌所产的生物表面活性剂为一种糖脂类物质，其分子的具体结构还有待进一步研究。

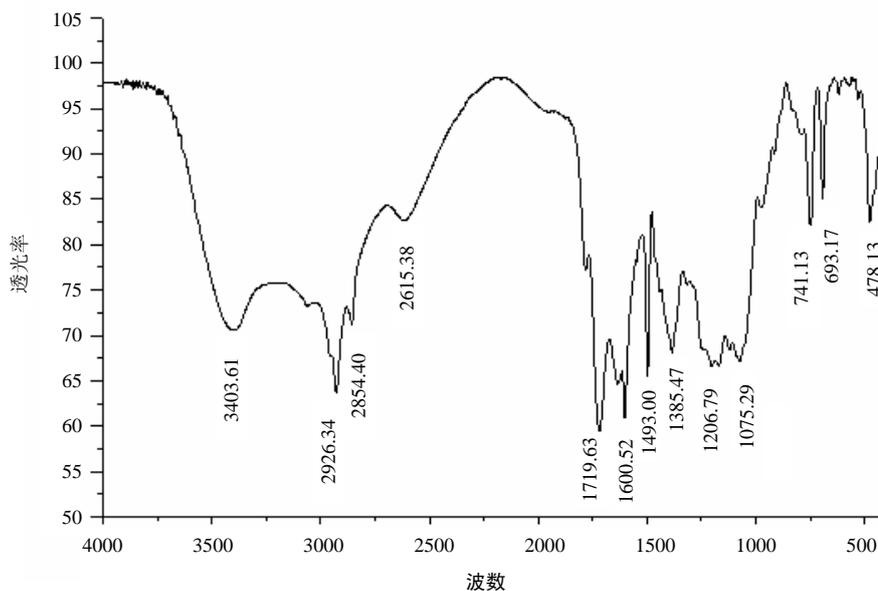


图 2 表面活性物质的红外光谱

Fig. 2 Infrared spectrum of surfactant

## 2.4 培养条件优化

生物表面活性剂是微生物在一定条件下产生的代谢产物,不同的微生物生长所需最佳环境不同,可以通过优化发酵条件及各种营养物质使生产菌最有效地产生生物表面活性剂。C 源是构成细胞物质和供给微生物生长发育所需要的能量,为细胞和代谢产物中 C 的来源提供营养物质。本试验采用正交实验方法,在原发酵培养基的基础上,对培养基的 C 源、N 源以及装液量、初始 pH 值、培养温度等条件进行了优化(接种量 4%, 200 r/min)。

发酵液表面张力值的方差分析见表 3。由表中可以看出,各因素对发酵液表面张力的影响主次顺序为: C 源 > 温度 > 装液量 > pH > N 源,并且 C 源、装液量和温度 3 因素对发酵液的表面张力影响较大, C 源达到极显著水平 ( $F > F_{0.01}$ ),装液量和温度达到显著水平 ( $F_{0.05} < F < F_{0.01}$ ),为主要影响因素。N 源和 pH 两因素对发酵液表面张力的影响程度较小,未达到显著水平 ( $F < F_{0.05}$ ),为次要因素。其中,在 C 源为糖蜜、N 源为蛋白胨、初始 pH 值 7.0、温度 35℃、装液量 100 ml 的条件下,发酵液的表面张力可达到 25.2 mN/m。

表 3 正交试验结果的方差分析

Table 3 ANOVA analysis results of orthogonal experiment

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
C 源	1227.38	4	29.58	**
N 源	97.85	4	2.36	
pH	264.49	4	6.37	
装液量	317.54	4	7.65	*
温度	637.09	4	15.35	*
误差	41.5	4		

注: \*\* 表示极显著 ( $p < 0.01$ ), \* 表示显著 ( $p < 0.05$ )。

本试验通过不同的 C 源和 N 源来对菌株 BS-5 进行发酵培养,然后测其表面张力,发现培养基中 C 源的改变对表面张力的影响特别显著,根据结果选取植物油为最佳 C 源;蛋白胨为最佳 N 源;根据能使发酵液表面张力降到最低时各因子水平的组合,此次优化结果为:植物油、蛋白胨、初始 pH 值 7.5、温度 35℃,装液量选用 150 ml (空白发酵液表面张力为 44.1 mN/m)。为了实验室摇瓶发酵的方便,装液量选用 100 ml。其最优方案还需进一步研究。

## 3 结论

本试验以原油为唯一 C 源,从石油污染土壤中分离获得一株产表面活性剂较强的菌株 BS-5。经 16S

rDNA 基因序列分析结果,判断 BS-5 菌株为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。该菌能显著降低发酵液表面张力,在分离培养基中发酵培养 3 天,可使发酵液的表面张力降为 27.3 mN/m (空白发酵液表面张力为 54.5 mN/m)。另外,经过红外光谱和薄层层析分析,初步鉴定该菌产生的生物表面活性物质为糖脂类物质。通过正交试验方法对该菌株的培养条件进行了初步优化。该菌有较强的产生生物表面活性剂的能力,具有潜在的应用价值。

## 参考文献:

- [1] Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 56: 339-347
- [2] 潘冰峰,徐国梁,施邑屏,李江云,李祖义.生物表面活性剂产生菌的筛选. *微生物学报*, 1999, 39(3): 265-267
- [3] 崔中利,刘卫东,齐耀程,孙亮亮,陈兵.生物表面活性剂产生菌的分离培养及其产物特性研究. *土壤*, 2004, 36(6): 644-647
- [4] 牛明芬,韩晓日,郭书海,李凤梅,牛之欣,冷延慧,杨雪莲.生物表面活性剂在石油污染土壤生物预制床修复中的应用研究. *土壤学报*, 2005, 36(5): 712-715
- [5] Harvey S, Elashvili I, Valdes JJ, Kamely D, Chakrabarty AM. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. *Bio/Technology*, 1990, 8: 228-230
- [6] 陈坚,华兆哲,伦世仪.生物表面活性剂在环境生物工程中的应用. *环境科学*, 1996, 17(4): 84-87
- [7] 刘五星,骆永明,滕应,李振高,吴龙华.石油污染土壤的生态风险评价和生物修复 I.一株具有乳化石油能力的细菌分离鉴定. *土壤学报*, 2006, 43(3): 461-466
- [8] 陈忠喜,郭书海,刘广民,朱玉萍,牛明芬,任南琪,李永峰.除油生物表面活性剂产生菌的分离及其特性. *哈尔滨工业大学学报*, 2007, 39(4): 586-588
- [9] 宁长波,沈薇,孟广荣,杨树林.产生生物表面活性剂菌种的一种快速筛选模型. *微生物学通报*, 2004, 31(3): 55-58
- [10] Deziel E, Paquette G, Villemur R. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62(6): 1908-1912
- [11] Egon S. *Thin layer chromatography: A laboratory handbook*. New York: Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1969: 259-260
- [12] 王琰.鼠李糖脂表面活性剂的制备及产生菌的筛选. *表面技术*, 2006, 35(5): 69-70

- [13] Wei YH, Chou CL, Chang JS. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 2005, 27: 146-154
- [14] 谢丹平, 尹华, 彭辉, 叶锦韶, 张娜, 王俊. 生物表面活性剂对菌 XD-1 降解原油的作用. *暨南大学学报 (自然科学版)*, 2004, 25(3): 365-369

## Screening and Primary Optimizing of Cultural Medium of Biosurfactant Producing Strain

LIANG Yan-ling<sup>1,2,3</sup>, LUO Yong-ming<sup>2,3</sup>, LIU Wu-xing<sup>2,3</sup>, WANG Chun-li<sup>1</sup>, LI Zhen-gao<sup>2,3</sup>

(1 College of Resources and Environment Sciences, Xinjiang Agriculture University, Urumqi 830052, China;

2 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China;

3 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China)

**Abstract:** Biosurfactant producing strains were screened through enrichment from the oil sludge with crude oil as sole carbon source and 15 strains which could produce higher yield of biosurfactant were obtained. Strain BS-5 could produce highest biosurfactant and be able to reduce the surface tension of fermentation broth to 27.3 mN/m (the surface tension of pure water is 71.5 mN/m). Analytic results by FT-IR showed that the biosurfactant of the strain was a kind of glycolipid. In addition, the cultural conditions of the strain were primarily optimized by using orthogonal experiment method. The best result was: vegetable oil 10 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.2 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L, peptone 1.0 g/L, FeSO<sub>4</sub> 0.05 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.02 g/L and initial pH 7.5. The strain was identified as *Pseudomonas aeruginosa* according to microscope observation and the 16S rDNA gene sequence.

**Key words:** Biosurfactant, Strain screening, Orthogonal experiment method, Cultural condition optimization