

一株表面活性剂产生菌的筛选及其特性研究*

贾燕 尹华** 彭辉 叶锦韶 秦华明 张娜 强婧

(暨南大学环境工程系 广州 510632)

摘要 从氧化沟含油污水中分离得到1株能产生物表面活性剂菌株 S_6 (*Pseudomonas* sp.), 经生理生化实验和16S rDNA序列分析鉴定 S_6 为铜绿假单胞菌。红外光谱分析得知 S_6 在代谢过程中能够产生糖脂类表面活性物质。其临界胶束浓度(CMC)为50mg/L, 可将水的表面张力由72mN/m降到33.9mN/m。发酵液的表面张力和排油直径的测定结果显示发酵液在不同的盐度、pH和溶解氧量条件下, 具有较稳定的表面活性。通过正交实验确定了优化培养基条件为葡萄糖10g、尿素5g、磷酸二氢钾1g、微量元素液2mL、pH 8.0、水1000mL。 S_6 在优化培养基中合成生物表面活性剂的产量为0.173g/L。

关键词 生物表面活性剂, 石油烃降解, 特性, 生物修复

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)06-1066-05

Isolation and Characteristics of Biosurfactant-producing Microorganism*

JIA Yan YIN Hua** PENG Hui YE Jin-Shao QIN Hua-Ming ZHANG Na QIANG Jing

(Department of Environmental Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract A biosurfactant-producing strain (S_6) was isolated from oil-containing wastewater in oxidation ditch and identified as *Pseudomonas aeruginosa* based on physiological and biochemical experiments and 16S rDNA sequence analysis. Infrared spectrum analysis revealed that S_6 produced glucolipid in the process of metabolism. It was observed that S_6 decreased the surface tension of water from 72 mN/m to 33.9 mN/m with the critical micelle concentration (CMC) of 50mg/L. The measurement of oil displacement and surface tension demonstrated that the fermented liquid had stable surface activity at varying range of salinity, pH, amount of dissolved oxygen. The optimal culture condition was obtained through orthogonal experiment: glucose 10g/L, urea 5g/L, KH_2PO_4 1g/L, liquor of microelement 2mL, pH 8.0, water 1000mL; and the biosurfactant production under optimal culture condition was 0.173g/L.

Key words Biosurfactant, Petroleum degradation, Characteristics, Bioremediation

生物表面活性剂是由微生物产生的具有表面活性的两性化合物。除具有降低表面张力、稳定乳化液和发泡等与化学表面活性剂相同的特性外, 还具有一般化学合成表面活性剂所不具备的环境友好特性。生物表面活性剂在医药、化妆品、洗涤剂 and 食品等工业方面具有潜在的应用价值, 此外在难降解有机化合物如 PAH、PCBs、石油烃的修复中, 也具有重要的作用^[1-5]。因此, 近年来, 生物表面活性剂受到人们越来越多的关注。在石油污染的生物处理中, 石油降解菌利用石油为碳源而对其降解, 为达到高效生物降解, 加入生物表面活性剂可以减小石油物

质与水溶液间的界面张力, 增加石油的溶解性, 使微生物和石油更有效的接触, 加速石油的生物降解^[6]。本文主要介绍了含油污水中生物表面活性剂产生菌的筛选及生物表面活性剂的制备方法, 并对生物表面活性剂的一些理化特性进行了研究, 以期为进一步拓展其生物修复功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种来源 中石化广州分公司氧化沟含油污水。

* 国家自然科学基金项目(No. 50578070)

** 通讯作者 Tel: 020-85220564, E-mail: ohjgc@jnu.edu.cn

收稿日期: 2006-11-07, 修回日期: 2007-04-28

1.1.2 试剂:原油,由中石化广州分公司提供;16S rDNA 序列测定所用的酶和试剂由广东省微生物研究所和上海英骏生物技术有限公司提供,其余试剂均购自广州化学试剂厂。

1.1.3 培养基及培养条件:营养培养基:葡萄糖 5g,蛋白胨 2g,酵母粉 1g, pH7.5,水 1000mL。

原油培养基:原油 1g, NH_4NO_3 3g, KH_2PO_4 0.5g, K_2HPO_4 0.5g,微量元素液 2mL, pH7.5,水 1000mL。

正交优化的产表面活性剂发酵培养条件:葡萄糖 10g,尿素 5g, KH_2PO_4 1g,微量元素液 2mL, pH 为 8.0,水 1000mL,培养 48h。

微量元素液: MgSO_4 0.4%, CuSO_4 0.1%, MnSO_4 0.1%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, CaCl_2 0.1%。

培养条件: 30℃摇床振荡培养,转速 165r/min。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的筛选和鉴定:将污水稀释后涂布于原油培养基上,培养 3d ~ 5d 后,观察平板上是否出现乳化圈或噬油斑的菌落,将这些菌落在营养培养基上分离、纯化、保种,得到菌株 S_0 ,根据形态学观察/生理生化实验和 16S rDNA 序列分析进行鉴定。

1.2.2 16S rDNA 序列测定:①将 S_0 纯培养物于 6000r/min 离心 5min 后,收集菌体加入 2.7mL DNA 抽提 Buffer,充分悬浮,加入 20 μ L 10mg/mL 的蛋白酶 K 37℃振荡 30min。②加入 0.3mL 20% SDS,混匀后于 65℃恒温静置 2h,期间每 20min 上下颠倒几次,6000r/min 离心 10min。③将上清液转至离心管中,加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1, V/V)抽提 10min,于 6000r/min 离心 10min。重复该步骤 3 次。④将上清转至离心管中,加入 0.6 倍体积的异丙醇,混匀,室温静置 1h 后于 14000r/min 离心 20min 收集粗 DNA。⑤沉淀的粗 DNA 用 70% 冰乙醇轻轻刷洗,弃刷洗液后晾干。⑥加入无菌超纯水溶解 DNA 后用核酸/蛋白分析仪于 Nucleic Acid 程序下测定。⑦ PCR 扩增反应程序:94℃ 5min,94℃ 1min,56℃ 1min,72℃ 2min,30 个循环;72℃,7min。⑧取扩增产物 1 μ L 电泳,于 UVI 凝胶成像系统分析结果。⑨将扩增产物送上海英骏生物技术有限公司进行测序。测序结果用 Blast 软件进行同源性比较。

1.2.3 排油直径的测定^[7,8]:在洁净培养皿中倒入一定量的蒸馏水,然后滴加少量预热至 45℃的原油均匀分散于水表面,使其形成一层薄的油膜,将发酵

液于 3700r/min 离心 30min,在油膜中央滴加一小滴上清液,中心油膜被挤向四周形成排油圈,排油圈直径与表面活性剂含量和活性成正比。测量其最大排油直径,重复 3 次,取平均值。

1.2.4 表面张力的测定:采用金属环法测定上清液的表面张力,仪器为 JZHY-180 型界面张力仪。

1.2.5 发酵液乳化性能测定^[9]:取等体积的发酵液与原油剧烈振荡 1min 后,于室温条件下放置,在不同时间测定两相体积变化。

1.2.6 表面活性剂的提取及红外扫描:粗提:将 S_0 的发酵液于 3700r/min 离心 30min,用氯仿/甲醇(2:1, V/V)萃取上清液 2 次,若出现乳化层,则将乳化层于 12500r/min 离心 5min,收集有机相在 44℃旋转蒸发,得到的固体物质为生物表面活性剂粗品。

精提:将粗品用少量水超声溶解后于 5000r/min 离心 15min,取上清液加入等体积的甲醇 5000r/min 离心 15min,将沉淀真空干燥,此为表面活性剂纯品。取表面活性剂纯品用红外光谱扫描。

1.2.7 表面活性物质的定性分析:取表面活性剂粗品进行 TLC 层析,以氯仿/甲醇/水(70:10:0.5, V/V/V)为展开剂展开,用不同的显色剂显色。(1)茚三酮显色剂:0.5g 茚三酮溶于 100mL 的无水丙酮中,脂肽显红色。(2)蒽酮显色剂:1g 蒽酮和 5mL 硫酸溶于 95 mL 的乙醇中,糖脂显黄色斑点。

1.2.8 临界胶束浓度(CMC)的测定:测定不同质量浓度表面活性剂溶液的表面张力,由表面张力浓度曲线求得 CMC。

1.3 性能评价

分别考察不同盐度、pH、氧气体量和培养时间对发酵液排油直径和表面张力的影响。

1.4 碳、氮源对产表面活性剂的影响

分别利用葡萄糖、蔗糖、乳糖、石蜡、淀粉为碳源,以蛋白胨为氮源,培养测量表面活性剂的产量。

分别利用尿素、硫酸铵、硝酸铵、氯化铵、蛋白胨为氮源(初始量为 0.5% (W/W)),以葡萄糖为碳源,接种 S_0 培养 48h,分别测量表面活性剂的产量。

确定产表面活性剂的最佳碳源和氮源。

1.5 产表面活性剂培养基的正交优化

用正交实验对培养基各成分进行优化,确定最佳的产表面活性剂的最佳条件和各组分对产表面活性剂的影响。

2 结果与分析

2.1 菌种鉴定结果

根据生理生化实验结果(见表1),初步鉴定 S_6 为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)。再将菌株 S_6 的 16S

rDNA 测序结果与 GenBank 中的序列进行同源性比较,发现 S_6 与铜绿假单胞菌的同源性达到 99.9%。因此确定 S_6 为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

表1 菌株的形态观察和生理生化特征鉴定结果

菌落形态	菌落颜色	菌形状	革兰氏	产芽孢	氧化酶	过氧化氢酶	运动性	葡萄糖利用	柠檬酸盐利用	硝酸盐还原	M.R	V.P
边缘整齐,光滑,湿润	绿色透明	短杆状有鞭毛	-	-	+	+	+	氧化产酸	-	+	+	-

2.2 发酵液乳化性能

将发酵液与原油各 8mL 混合,振荡 1min 后,油水形成均匀的乳化液,瓶壁不挂油。此时原油粘度由原来的 1123mPa·s 降低至 195mPa·s,降低了 82.67%。室温静置 2d,油水相略有分离,16d 后,油水相完全分离,此时,油相体积降低为 6mL,说明部分原油已溶于发酵液,形成了长时间的微乳状液。

2.3 发酵液性能评价

2.3.1 盐度对发酵液性能的影响:用 NaCl 将培养基盐度分别调至 2g/L、4g/L、6g/L、8g/L、10g/L 后培养,考虑到原液中的表面活性剂的浓度已超过 CMC 值,故将发酵液稀释 1 倍。室温下测定原液和 1 倍稀释液的表面张力和排油直径,由实验结果作表 2。

表2 盐度对性能的影响

盐度(g/L)	发酵液原液		1 倍稀释液	
	表面张力 (mN/m)	排油直径 /mm	表面张力 (mN/m)	排油直径 /mm
2	33.9	110	36.9	83
4	33.9	105	37.7	80
6	34.0	100	38.3	78
8	34.1	95	39.8	73
10	33.9	92	40.3	70

由表 2 中原液和稀释液的表面张力和排油直径值可知,盐度对发酵液性能的影响很小,且在盐度小于 6g/L 范围内比较稳定。盐度在 2g/L ~ 10g/L 范围时,表面张力值随盐度的增加稍上升,而排油直径随盐度的增加有轻微下降的趋势。盐度在 2g/L 时,表面张力最小,排油直径最大,此时表面张力和排油直径分别为 33.9 mN/m、110mm。

2.3.2 pH 值对发酵液性能的影响:将 pH 分别调至 6、7、8、9、10 后培养 S_6 ,室温下测定原液及 1 倍稀释

液的表面张力和排油直径,实验结果如表 3。

表3 pH 值对发酵液性能的影响

pH	发酵液原液		1 倍稀释液	
	表面张力 (mN/m)	排油直径 /mm	表面张力 (mN/m)	排油直径 /mm
6	34.1	110	38.0	80
7	34.0	115	36.3	85
8	33.9	113	38.3	78
9	33.9	110	45.3	65
10	34.1	90	50.2	42

表 3 数据表明,在实验设定的范围内,培养基 pH 值的变化对原液的表面张力基本没有影响,排油直径由 115mm (pH = 7) 下降至 90mm (pH = 10)。将发酵液稀释 1 倍后发现 pH 在 7 左右时表面活性剂最好,此时表面张力和排油直径分别为 36.3mN/m、85mm。由此可知,菌株 S_6 在 pH6.0 ~ pH8.0 范围时,培养基中生物表面活性剂的产量比较高。

2.3.3 通氧量对发酵液性能的影响

测量不同溶解氧量条件下培养的原液和 1 倍稀释液的表面张力和排油直径,实验结果见表 4。

表4 溶解氧量对发酵液性能的影响

溶解氧量/(mg/L)	发酵液原液		1 倍稀释液	
	表面张力 (mN/m)	排油直径 /mm	表面张力 (mN/m)	排油直径 /mm
3.6	34.1	122	36.7	85
3.9	33.9	128	34.2	90
4.0	33.9	145	33.9	97
4.3	34.0	126	36.1	87
5.6	34.1	122	36.8	86

由表 4 可知,表面张力开始随通氧量的增加而下降,但随后又随通氧量的增加而恢复到原水平,排

油直径的变化趋势是先上升后下降恢复至原来水平。发酵液性能的提高可能由以下原因造成 (1)微生物在生长繁殖过程中需消耗氧气,足量氧气为微生物分泌表面活性剂的过程提供了充足的电子受体,既保持了培养液 pH 值的稳定,又促进了微生物酶活性的提高,从而强化了微生物产生表面活性剂的能力 (2)氧气量充足的条件下菌体能均匀悬浮在水样中,对营养物质的吸收和代谢物的分散都非常有利,氧在生物相间的传质阻力有效减少,从而使水样中能够提供给微生物的溶解氧量增多,这就在一定程度上提高了发酵液性能。而通氧量的继续增加却没有进一步改善发酵液性能,这很可能是因为大量的氧气大大促进了菌体自身的生长,而水样中有限的营养物质抑制了表面活性剂生成酶的合成。

2.3.4 培养时间对发酵液性能的影响

测量不同培养时间条件下发酵液的生物量、表面张力和排油直径,结果见图 1。由图 1 可知 0h ~ 36h 段,发酵液性能随时间的延长而增强;48h 时,发酵液性能最好,表面张力和排油直径分别为 33.9mN/m、115mm,这是因为 S_0 生长的稳定期(24h ~ 48h)是表面活性物质产生的关键时期,使得此时发酵液中活性物质的浓度最大;48h ~ 84h 段,发酵液性能有逐渐下降的趋势;96h 时,因为菌株开始新的生长周期,使得排油直径值逐渐回升。

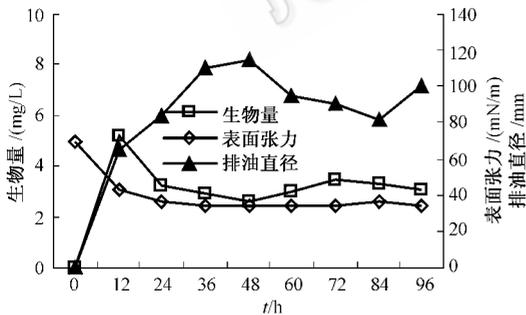


图 1 发酵液生物量、性能随时间的变化

2.4 表面活性物质的定性分析结果

提取到的表面活性剂粗品呈黄褐色,经 TLC 分析,茚三酮不显红色,说明该表面活性剂粗品中没有脂肽类物质存在;萘酚显黄色,说明该表面活性剂粗品中有糖脂类物质存在。

2.5 CMC 的测定结果

将表面活性剂纯品分别稀释至 12.5mg/L、25mg/L、33mg/L、40mg/L、50mg/L、67mg/L、100mg/L、200mg/L 后,测它们的表面张力,结果见图 2。

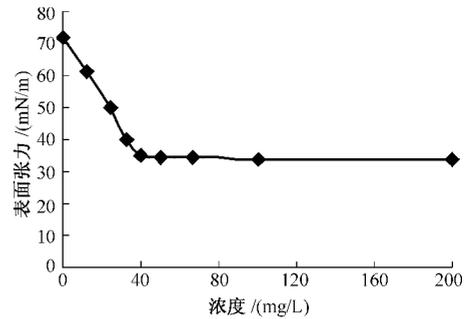


图 2 表面张力随浓度的变化

由图 2 可知,溶液的表面张力随浓度增大逐渐降低到 33.9mN/m 后基本保持不变,此时对应的浓度 50mg/L 即为临界胶束浓度,比一般化学表面活性剂的 CMC 值低 1 ~ 2 个数量级^[1],因此生物表面活性剂比一般的化学表面活性剂在性能方面更优越。

2.6 红外光谱扫描结果

将提取到的表面活性剂纯品进行红外光谱扫描,扫描结果见图 3。

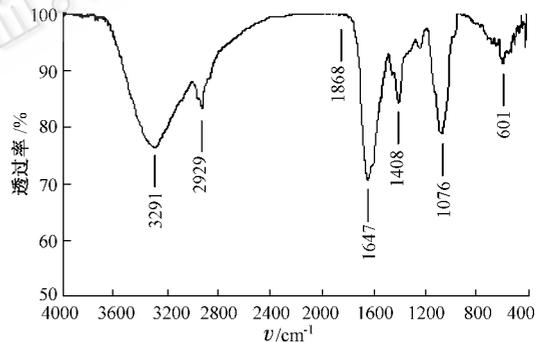


图 3 糖脂类物质的红外扫描图谱

由图 3 可知 (1)在 3291 cm^{-1} 处有强的吸收峰,表明分子中有大量 OH 和 NH 存在 (2)在 2929 cm^{-1} 和 1408 cm^{-1} 处的吸收峰为碳链上 C—H 键的伸缩振动吸收;(3)在 1868 cm^{-1} 处为 C=O 吸收峰,1076 cm^{-1} 处为 C—O—C 键伸缩振动吸收峰,说明分子中有一个五元环状内酯结构和糖苷键存在 (4)在 1647 cm^{-1} 处为 C=C 键的伸缩振动吸收峰,表明分子中有不饱和双键。综上所述,被测物质为糖与环酯结合形成的不饱和糖脂类物质,其中糖基端为亲水基端,环酯类的碳链为亲油基端。

2.7 碳、氮源对产表面活性剂的影响

利用不同的碳源和氮源培养 S_0 ,分别测量表面活性剂的产量,由实验结果见表 5。

表5 碳源、氮源对产表面活性剂的影响

碳源	葡萄糖	蔗糖	乳糖	石蜡	淀粉
表面活性剂产量(g/L)	0.096	0.089	0.080	0.100	0.079
氮源	尿素	硫酸铵	硝酸铵	氯化铵	蛋白胨
表面活性剂产量(g/L)	0.135	0.039	0.082	0.083	0.096

由表5可知,难溶于水的有机碳源和尿素更有利于微生物产表面活性剂,碳源、氮源对菌体产表面活性剂能力的大小依次为:石蜡>葡萄糖>蔗糖>乳糖>淀粉,尿素>蛋白胨>氯化铵>硝酸铵>硫酸铵。

2.8 产表面活性剂培养基的正交优化

以碳源、氮源、磷酸盐、微量元素液和pH这5个因素对产表面活性剂培养基进行正交实验,以获得最佳的培养基成分,其中以葡萄糖为碳源、尿素为氮源、磷酸二氢钾为磷酸盐,由实验结果得表6。

表6 正交实验结果

编号	碳源/ (g/L)	氮源/ (g/L)	磷酸盐/ (g/L)	微量元素 液/mL	pH	表面活性 剂(g/L)
1	20	10	6	8	6.5	0.017
2	20	8	4	6	7.0	0.030
3	20	5	2	4	7.5	0.021
4	20	2	1	2	8.0	0.090
5	15	10	4	4	8.0	0.038
6	15	8	6	2	7.5	0.088
7	15	5	1	8	7.0	0.068
8	15	2	2	6	6.5	0.026
9	10	10	2	2	7.0	0.081
10	10	8	1	4	6.5	0.085
11	10	5	6	6	8.0	0.147
12	10	2	4	8	7.5	0.077
13	5	10	1	6	7.5	0.065
14	5	8	2	8	8.0	0.078
15	5	5	4	2	6.5	0.050
16	5	2	6	4	7.0	0.053
K1	0.158	0.201	0.305	0.240	0.180	
K2	0.220	0.281	0.195	0.268	0.232	
K3	0.390	0.286	0.206	0.197	0.237	
K4	0.232	0.246	0.308	0.309	0.353	
R	0.232	0.085	0.113	0.112	0.173	

由正交实验分析表可以得出(1)由表中R值

大小可知,在各影响要素中,碳源含量的影响最大,其次为微量元素液、磷酸盐的含量和pH,氮源的含量的影响最小(2)产表面活性剂的最佳优化培养基为:葡萄糖10g、尿素5g、磷酸二氢钾1g、微量元素液2mL、水1000mL、pH8.0。根据正交实验结果配制培养基,其48h产表面活性剂的量为0.173g/L。

3 结论

筛选出1株表面活性剂产生菌S₆,经鉴定为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。盐度、pH、氧气量对发酵液性能的影响不大,发酵液的性能在盐度小于6g/L、pH6.0~pH8.0和溶解氧3.9mg/L~5.6mg/L范围内时比较稳定。发酵液表面活性在48h附近达到最大,表面张力和排油直径分别为33.9mN/m、115mm。该生物表面活性剂的临界胶束浓度为50mg/L。利用红外光谱分析得知该表面活性剂的主要成分为糖脂类物质。S₆产表面活性剂的最佳优化培养基为葡萄糖10g、尿素5g、磷酸二氢钾1g、微量元素液2mL、水1000mL、pH8.0,此条件下培养48h的生物表面活性剂产量为0.173g/L。

参考文献

- [1] Benjamas Thanomsab, Wanna Pumeechockchai, Anirut Limtrakul, et al. *Bioresource Technology*, 2006, **97**(18): 2457~2461.
- [2] Eliora Z Ron, Eugene Rosenberg. *Current Opinion in Biotechnology*. 2003, **13**(3): 249~252.
- [3] Makkar R S, Rockne K J. *Environ Toxicol Chem*, 2003, **22**(10): 2280~2292.
- [4] Prabhu Y, Phale P S. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **61**(4): 342~351.
- [5] Catherine N. Mulligan. *Environmental Pollution*, 2005, **133**(2): 183~198.
- [6] Grishchenkov V G, Townsend R T, McDonald T J, et al. *Process Biochemistry*. 2000, **35**(9): 889~896.
- [7] Adria A Bodour, Raina M Miller-Maier. *Journal of Microbiological Methods*. 1998, **33**(3): 273~280.
- [8] Masaaki Morikawa, Yoshihiko Hirata, Tadayaki Imanaka. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1488**(3): 211~218.
- [9] 郝瑞霞,潘永强,王关玉. *北京大学学报*, 2003, **29**(6): 844~849.
- [10] J C 霍尔特. *简明第八版伯杰细菌鉴定手册*. 济南:山东大学出版社, 1988. pp. 79~83.
- [11] 梅建凤, 闵航. *工业微生物*, 2001, **31**(1): 54~57.