

常慧萍,杨雪,王 丁,等. 高效石油降解菌 BS-8 产生物表面活性剂的性能[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):365-367.

# 高效石油降解菌 BS-8 产生物表面活性剂的性能

常慧萍<sup>1</sup>, 杨 雪<sup>1</sup>, 王 丁<sup>1</sup>, 邢文会<sup>1</sup>, 夏铁骑<sup>2</sup>, 张 红<sup>1</sup>

(1. 河南教育学院生命科学系,河南郑州 450046; 2. 濮阳职业技术学院,河南濮阳 457000)

**摘要:**培养 6~30 h,随着菌体数量的迅速增加,菌株 BS-8 表面张力从 63.2 mN/m 快速下降为 39.4 mN/m,其表面活性剂产生方式为生长相关型;以葡萄糖为碳源,对菌株 BS-8 的培养液经离心、沉淀、显色,显示其表面活性剂为脂肽类物质,从培养液中分离纯化得到表面活性剂的产量为 0.58 g/L,其临界胶束浓度(CMC)为 90 mg/L;在 pH 值 4~9、温度 20~70 ℃、NaCl 浓度 1%~6% 的条件下,菌株 BS-8 产生物表面活性剂的稳定性较强。

**关键词:**石油;降解菌 BS-8;生物表面活性剂;脂肽类物质;稳定性

**中图分类号:**Q939.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)10-0365-03

生物表面活性剂是利用酶或微生物等,通过生物催化和生物合成等技术,从微生物、植物或动物上得到的具有表面活性的物质,按化学结构不同分为糖脂类、脂肽和脂蛋白类、磷脂和脂肪酸类、聚合表面活性剂类和微粒表面活性剂等五大类<sup>[1]</sup>,其类型既与菌株有关,也与作为底物的碳源有关。有研究表明,碳源对微生物表面活性剂的产量和结构具有决定性作用,烃类物质的存在尤其是烃链长度对培养液中表面活性剂的浓度也会有显著的影响<sup>[2]</sup>。不同的生物表面活性剂具有不同的分离、提取和浓缩方法,有的生物表面活性剂用乙酸乙酯提取,有的用二氯甲烷或甲醇与三氯甲烷按 1:2 的比例提取。生物表面活性剂有较强的理化稳定性,可被应用于极端环境下,如地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)产生的脂肽可以在 75 ℃ 条件下耐热 140 h,铜绿假单胞菌(*Pseudo-*

*monas aeruginosa*)产生的类蛋白表面活性剂在 pH 值为 1.7~11.4 范围内均非常稳定<sup>[3]</sup>。生物修复被烃类和原油污染的土壤是生物表面活性剂的一个重要应用,同时还可用于受铀、铬和铅等毒性重金属污染地区的生物修复<sup>[4]</sup>。笔者所在课题组从长期受石油污染的土壤中筛选到 1 组产生物表面活性剂的菌株,对具有较高表面活性剂产量及活性的菌株 BS-8 (*Bacillus* sp.)产生物表面活性剂进行提取、纯化,并对影响表面活性剂稳定性的因素进行探讨,为生物表面活性剂及其产生菌在石油污染土壤的生物修复中提供一些理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

降解菌 BS-8 从长期受石油污染的土壤中筛选到<sup>[5]</sup>。

### 1.2 培养基

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 10 g/L、琼脂 20 g/L, pH 值 7.0; 发酵培养基:葡萄糖 20.0 g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g/L、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g/L、CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0.005 g/L, pH 值 7.0~7.2。

### 1.3 表面张力的测定<sup>[6]</sup>

采用圆环法测定表面张力。室温下,用 JYW-200A 自动表面张力测定仪测定上清液的表面张力,3 次重复。

收稿日期:2014-01-18

基金项目:河南省科技攻关重点项目(编号:142102110123、122102310350);河南省教育厅自然科学研究计划(编号:12A180008);河南教育学院青年课题(编号:20090105)。

作者简介:常慧萍(1970—),女,河南新乡人,博士,副教授,主要从事微生物资源开发与应用研究。Tel:(0371)69303781;E-mail:shengwuchp@126.com。

通信作者:张 红,博士,教授,硕士生导师,主要从事分子生物学与免疫学研究。Tel:(0371)69303663;E-mail:angela9922@sina.com。

pH 值为 3.0 的环境中有较高的存活数(>2.07 亿 CFU/mL)和存活率(>41.6%),具有较强的耐酸性。对这 14 株芽孢杆菌进行 3 mg/mL 猪胆盐的培养液处理 2 h,结果发现,8 株菌株(J1、J2、J3、J14、J21、N7、N10、N26)在 3 mg/mL 胆盐环境中具有较高的存活数(>1.00 亿 CFU/mL)和存活率(>33.7%),其中 5 株菌株来源于鸡盲肠内容物,3 株菌株来源于牛新鲜的瘤胃内容物。

根据菌体产酶特性和对病原菌的抑菌效果,J2、J3、J14 具有较强的产淀粉酶和蛋白酶的特性,N7 和 N10 产纤维素酶能力较强,5 株芽孢杆菌均有抑菌作用。经其形态特征、菌落特征、生理生化特征分析,初步鉴定 J3 为地衣芽孢杆菌,J14、J2 为蜡样芽孢杆菌,N7、N10 枯草芽孢杆菌。

## 参考文献:

- [1] 秦玉昌,潘宝海,于 荣,等. 芽孢杆菌对畜禽生产性能的影响[J]. 中国饲料,2004(16):8-10.
- [2] 高汉桥,陈昌福. 水库爆发性色病及其防治技术研究[J]. 水利渔业,1997(2):11-13.
- [3] 王振华. 高产酶活枯草芽孢杆菌制剂在奶牛生产上的应用研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(27):11771-11773,11776.
- [4] 赵瑞香,李元端,孙俊良,等. 嗜酸乳杆菌在模拟胃肠环境中抗性的研究[J]. 微生物学通报,2002,29(2):35-38.
- [5] Chou L S, Weimer B. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus* [J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82(1):23-31.

#### 1.4 菌株 BS-8 产表面活性剂与菌体生长的动态关系

将菌株 BS-8 以 10% 的接种量接种到发酵培养基中,在 30 ℃、160 r/min 下振荡培养,每隔 6 h 取样,用紫外分光光度计测定发酵液的  $D_{600\text{nm}}$ ,并测定离心后发酵上清液的表面张力。

#### 1.5 菌株 BS-8 产生物表面活性剂的性能分析

**1.5.1 生物表面活性剂的定性分析** 将菌株 BS-8 活化后接种到发酵培养基中,于 30 ℃、160 r/min 下振荡培养 48 h,将培养液于 4 ℃、10 000 r/min 条件下离心 20 min,收集上清液,用 6 mol/L HCl 将其 pH 值调至 2~3,置于 4 ℃ 冰箱中过夜,观察其是否会产生白色沉淀,若出现白色沉淀,则上清液中含脂肽类或脂蛋白类表面活性剂;若没有白色沉淀,则表明菌株产生了糖脂类表面活性剂<sup>[7]</sup>。

为进一步确定表面活性剂的性质,通过显色反应分析表面活性剂的类型。通过双缩脲、茚三酮显色反应确定上清液中含肽键的脂肽、脂蛋白类表面活性剂;通过莫氏试验验证上清液中是否含糖或糖的衍生物。用乙酸乙酯萃取上清液中的表面活性剂,萃取液浓缩作硅胶薄层层析,展开剂为三氯甲烷-甲醇(体积比为 9:1),显色剂为苯酚-硫酸-无水乙醇(比例为 3 g:10 mL:25 mL),糖脂类表面活性剂显棕色斑点;显色剂为含 0.5% 茚三酮的无水丙酮溶液,脂肽、脂蛋白类表面活性剂显红色斑点<sup>[8]</sup>。

**1.5.2 生物表面活性剂的提取与纯化** 菌株 BS-8 活化后接种到发酵培养基中,30 ℃、160 r/min 振荡培养 72 h,发酵液于 10 000 r/min、4 ℃ 下离心 20 min,以去除菌体;上清液用 6 mol/L HCl 调 pH 值至 2.0,4 ℃ 下静置 12 h,再次离心收集沉淀;用少量稀 HCl 洗涤沉淀,1 mol/L NaOH 将沉淀 pH 值调至 7.0,冷冻干燥得到表面活性剂粗品<sup>[9]</sup>。

将表面活性剂粗品用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  萃取,减压蒸馏后溶于 0.01 mol/L NaOH,滤纸过滤,再次用 6 mol/L HCl 将滤液 pH 值调至 2.0,出现沉淀时于 10 000 r/min 下离心 20 min,真空干燥得到纯化的生物表面活性剂<sup>[10]</sup>。

**1.5.3 表面活性剂的临界胶束浓度(CMC)的测定** 临界胶束浓度指表面活性剂分子在溶剂中形成胶束时的最低浓度,是表面活性剂性能的一个重要指标。当溶液达到临界胶束浓度时,溶液的表面张力降到了最低,此时表面活性剂浓度再增大,溶液的表面张力也不会再下降,而且形成大量的胶团。CMC 对应的溶液表面张力就是表面活性剂能达到的最小表面张力。

用纯化得到的表面活性剂样品制成 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120 mg/L 系列浓度的表面活性剂水溶液,在室温(25±1) ℃ 下测量各浓度表面活性剂水溶液的表面张力,以表面活性剂浓度为横坐标、溶液表面张力为纵坐标绘制曲线,以确定表面活性剂的临界胶束浓度。

#### 1.6 影响生物表面活性剂稳定性的因素

取纯化的表面活性剂样品溶于蒸馏水中,配制成浓度为 100 mg/L 的溶液,研究 pH 值、温度、盐浓度等理化因子对其稳定性的影响。

**1.6.1 温度对生物表面活性剂稳定性的影响** 分别将 100 mg/L 表面活性剂溶液加热到 20、30、40、50、60、70、80、90、100 ℃,保持 2 h,冷却至室温后测定溶液的表面张力,观

察其热稳定性。

**1.6.2 pH 值对生物表面活性剂稳定性的影响** 分别将 100 mg/L 表面活性剂溶液的 pH 值调至 3、4、5、6、7、8、9、10、11,然后测定其表面张力,考察其对酸碱的耐受度。

**1.6.3 NaCl 浓度对生物表面活性剂的影响** 分别在 100 mg/L 表面活性剂溶液中加入一定量的 NaCl,混匀,使 NaCl 浓度为 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%,静置 24 h 后测其表面张力,考察其对盐的耐受度。

## 2 结果与分析

### 2.1 表面活性剂的产生与菌体生长的动态关系

菌株 BS-8 在发酵培养基中振荡培养,定时取样,测定发酵液的  $D_{600\text{nm}}$  及离心上清液的表面张力,以培养时间为横坐标、发酵液表面张力为纵坐标绘制 BS-8 的菌体生长与产表面活性剂的动态关系(图 1)。由图 1 可知,菌株 BS-8 在培养 6 h 后进入对数期,并开始产生表面活性剂,6~30 h 间菌体数量迅速增加,发酵液表面张力随菌体密度的增大而降低,表面张力快速下降(从 63.2 mN/m 下降为 39.4 mN/m);30~54 h 间细菌密度较高,并维持在一稳定范围内,随着菌体密度缓慢增长,表面张力持续下降但降速减慢。发酵液表面张力也降至最低(34.1 mN/m);54~72 h 间,菌体数量有所下降,表面张力有所增加。说明生物表面活性剂的产生与菌体生长过程密切相关,菌株 BS-8 的表面活性剂产生方式为生长相关型。

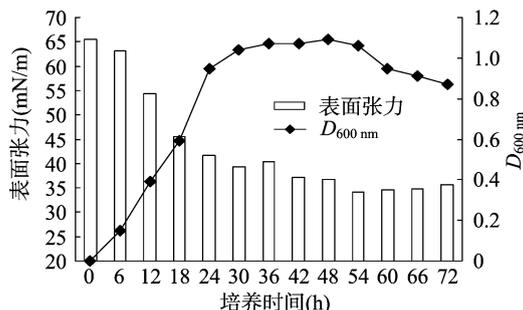


图1 菌株 BS-8 产表面活性剂与菌体生长的动态关系

### 2.2 菌株 BS-8 产生物表面活性剂的性能分析

以葡萄糖为碳源,将菌株 BS-8 培养后的离心上清液 pH 值调至 2~3,4 ℃ 冰箱中过夜,观察到有白色沉淀产生,经硅胶薄层层析后,含 0.5% 茚三酮的无水丙酮溶液显红色斑点,判断上清液中含脂肽、脂蛋白类表面活性剂。菌株 BS-8 振荡培养 72 h,从发酵离心上清液中提取表面活性剂,测得表面活性剂的含量为 0.58 g/L。

将纯化后的表面活性剂配制成不同浓度的水溶液,测定菌株 BS-8 产生的表面活性剂的 CMC,结果见图 2。郑新伟筛选到的菌株所产表面活性剂的 CMC 为 130 mg/L,菌株 BS-8 的表面活性剂 CMC 为 90 mg/L,两者均比一般的化学表面活性剂的 CMC 值低 1~2 个数量级,所以在性能上更具优越性<sup>[10]</sup>。图 2 表明,表面活性剂的浓度从 0 增大到 30 mg/L 时,表面张力快速下降,从 68.7 mN/m 降到 41.8 mN/m;随着表面活性剂浓度的增大,表面张力下降幅度变小,当表面活性剂浓度增大到 90 mg/L 时,表面张力降到最低(35.6 mg/L),表面活性剂浓度再升高,溶液的表面张力也不再降低。

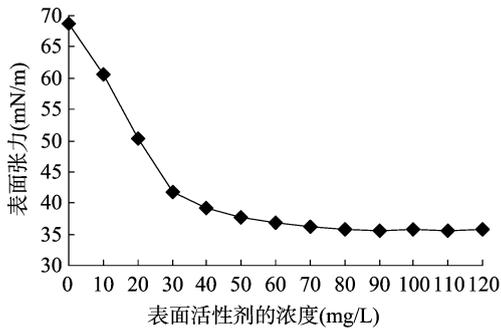


图2 表面活性剂的浓度与表面张力的关系

### 2.3 影响生物表面活性剂稳定性的因素

2.3.1 表面活性剂在不同温度下的稳定性 将 100 mg/L 表面活性剂溶液分别加热到不同温度并保持 2 h, 室温时各溶液表面张力的测定结果如表 1 所示。由表 1 可知, 20 ~ 70 °C 之间, 表面活性剂溶液的表面张力随温度的变化不大, 基本保持在 36.2 ~ 37.2 mN/m 之间; 当温度超过 70 °C 以后, 表面张力有较大提高。说明菌株 BS-8 在 20 ~ 70 °C 具有良好的热稳定性。

表 1 不同温度下菌株 BS-8 产生的表面活性剂的稳定性

温度(°C)	表面张力(mN/m)
20	36.8
30	36.2
40	36.6
50	36.9
60	36.8
70	37.2
80	38.6
90	39.8
100	40.7

2.3.2 表面活性剂在不同 pH 值下的稳定性 100 mg/L 表面活性剂溶液在不同 pH 值下保持 2 h, 各溶液表面张力的测定结果如表 2 所示。由表 2 可知, pH 值在 4 ~ 9 之间时, 菌株产生的表面活性剂表面张力随 pH 值的变化不太明显, 基本稳定在 36.5 ~ 37.5 mN/m; 而当 pH 值 < 4 或 pH 值 > 9 时, 表面张力增加, 强酸强碱影响表面活性剂的活性。但总的来说, 菌株 BS-8 产生的表面活性剂有较宽的酸碱范围。

表 2 pH 值对菌株 BS-8 产生的表面活性剂的稳定性的影响

pH 值	表面张力(mN/m)
3	38.3
4	36.9
5	36.6
6	36.8
7	36.9
8	36.8
9	37.2
10	38.3
11	39.8

2.3.3 表面活性剂在不同 NaCl 浓度下的稳定性 将 NaCl 添加到含 100 mg/L 表面活性剂溶液中, 使其成为一系列 NaCl 浓度梯度的溶液, 保持 2 h, 测定各溶液的表面张力, 结

果如表 3 所示。表 3 表明, 表面活性剂溶液的 NaCl 浓度在 1% ~ 6% 之间, 溶液表面张力的变化随盐度的变化很小, 表面张力基本稳定在 36.5 ~ 37.2 mN/m 范围内, 说明菌株 BS-8 产生的生物表面活性剂在 NaCl 浓度为 1% ~ 6% 之间有较强的耐盐性; 当 NaCl 浓度 > 6% 时, 表面张力增幅较大。

表 3 不同盐度下菌株 BS-8 产生的表面活性剂的稳定性

NaCl 浓度(%)	表面张力(mN/m)
1	36.6
2	36.8
3	36.7
4	36.9
5	36.8
6	37.2
7	38.2
8	38.8
9	40.2

### 3 结论

菌株 BS-8 的表面活性剂产生方式为生长相关型, 在培养 6 ~ 30 h 时, 随菌体数量的迅速增加, 表面张力从 63.2 mN/m 快速下降为 39.4 mN/m; 之后, 菌体密度缓慢增长, 表面张力持续下降但降速减慢。以葡萄糖为碳源培养菌株 BS-8, 培养液中含脂肽、脂蛋白类表面活性剂, 从培养液中分离、纯化得到表面活性剂的产量为 0.58 g/L, 表面活性剂的 CMC 为 90 mg/L。表面活性剂在 pH 值 4 ~ 9、温度 20 ~ 70 °C、NaCl 浓度 1% ~ 6% 的范围内具有较强的稳定性。

### 参考文献:

- [1] Benincasa M, Contiero J, Manresa M A, et al. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source[J]. Journal of Food Engineering, 2002, 54(4): 283-288.
- [2] Kim H S, Jeon J W, Kim B H, et al. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(4): 391-396.
- [3] Lu J R, Zhao X B, Yaseen M. Biomimetic amphiphiles: biosurfactants[J]. Current Opinion in Colloid and Interface Science, 2007, 12: 60-67.
- [4] Meagher R B. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2000, 3(2): 153-162.
- [5] 夏铁骑, 常慧萍, 张建清. 产生物表面活性剂石油降解菌的筛选及高效降解菌群的构建[J]. 农业灾害研究, 2013, 3(6): 49-51.
- [6] 曹娟, 徐志辉, 李凌之, 等. 产生物表面活性剂的石油降解菌 *Acinetobacter* BHSN 的研究[J]. 生态与农村环境学报, 2009, 25(1): 73-78.
- [7] 冷凯良, 楚晓珉, 张辉珍, 等. 微生物对石油烃降解代谢产物的分析方法研究[J]. 海洋水产研究, 2001, 22(2): 57-61.
- [8] 董晓燕. 生物化学实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 46-47.
- [9] Bordoloi N K, Konwar B K. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions[J]. Colloids and Surfaces B - Biointerfaces, 2008, 63(1): 73-82.
- [10] 郑新伟. 一株生物表面活性剂产生菌的分离及其产物性质的研究[D]. 西安: 西北大学, 2011: 31.