

耐盐菌 BF40 产表面活性剂特性及其对石油污染盐渍化土壤的修复能力

吴 涛^{1,2}, 依艳丽^{1*}, 谢文军³, 许 杰⁴, 姚志刚², 李小彬²

(1.沈阳农业大学土地与环境学院, 沈阳 110866; 2.滨州学院生命科学系, 山东省黄河三角洲野生植物资源开发利用工程技术研究中心, 滨州 256600; 3.滨州学院, 山东省黄河三角洲生态环境重点实验室, 滨州 256600; 4.滨州职业学院生物工程学院, 滨州 256603)

摘 要:为强化微生物修复石油污染盐渍化土壤并提供高效产表面活性剂菌种,研究了耐盐菌 *Serratia* BF40 产生物表面活性剂的条件、动力学特征以及对石油污染盐渍化土壤的修复能力。结果表明:BF40 产表面活性剂最适碳源为牛肉膏,最适氮源为氯化铵。在 30~37 °C, pH 7.0~9.0 范围内产表面活性剂的能力较强。BF40 在对数生长期产生表面活性剂,产生方式与细胞生长相关联。在含 2.0%NaCl 的培养基中,BF40 可将发酵液表面张力降低到 32.0 mN·m⁻¹,EI24 达到 66.9%。在含盐量为 0.22%和 0.61%土壤中添加 BF40,降解 40 d 后,土壤总石油烃降解率达到 50%以上,表明 BF40 在强化修复石油污染盐渍化土壤中具有很大的应用潜力。

关键词:石油污染;盐渍化土壤;生物表面活性剂;沙雷氏菌;生物修复

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)12-2389-08

Biosurfactant Producing Characteristics of a Salt-tolerant BF40 Strain and Its Remediation in Petroleum Contaminated Saline Soil

WU Tao^{1,2}, YI Yan-li^{1*}, XIE Wen-jun³, XU Jie⁴, YAO Zhi-gang², LI Xiao-bin²

(1.College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2.Shandong Provincial Engineering and Technology Research Center for Wild Plant Resources Development and Application of Yellow River Delta, Department of Life Science, Binzhou University, Binzhou 256600, China; 3.Shandong Provincial Key Laboratory of Eco-Environmental Science for Yellow River Delta, Binzhou University, Binzhou 256600, China; 4.Department of Bioengineering, Binzhou Vocational College, Binzhou 256603, China)

Abstract:To provide high-efficient biosurfactant-producing bacteria and enhance the bioremediation efficiency of petroleum contaminated saline soil, the biosurfactant-producing conditions and dynamics of a salt-tolerant *Serratia* BF40 strain and its remediation in petroleum contaminated saline soil were carried out. Results indicated that the optimum carbon and nitrogen sources for biosurfactant production were beef extract and NH₄Cl, respectively. BF40 strain could produce more biosurfactant at 30~37 °C and pH ranged from 7.0 to 9.0. Biosurfactant was produced during the log phase and producing type was correlated with cell growth. Surface activity of fermentation broth was significantly effective in the presence of 2.0% NaCl, and the value of surface tension and EI24 were 32.0 mN·m⁻¹ and 66.9%, respectively. Petroleum degradation experiments showed that BF40 strain could remove more than 50% of total petroleum hydrocarbons after 40 days in the soil with 0.22% and 0.60% salinity. These results indicated that BF40 strain had potential used in bioremediation of petroleum-contaminated saline soil.

Keywords: petroleum contamination; saline soil; biosurfactant; *Serratia* species; bioremediation

收稿日期:2012-07-01

基金项目:山东省科技攻关计划项目(2009GG10006012);滨州市科技发展计划项目([2010]26);山东省中青年科学家科研奖励基金(2008BS09024)

作者简介:吴 涛(1980—),男,山东平阴人,博士研究生,讲师,主要研究方向为污染土壤的生物修复。E-mail:wtsdbz@yahoo.cn

* 通信作者:依艳丽 E-mail: yiyanni@126.com

生物表面活性剂是微生物合成的低分子量、具有表面活性的物质^[1]。由于生物表面活性剂是集亲水基和疏水基于一体的两亲化合物,能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,进而促进细胞对烃类的吸收,在石油污染环境的生物修复、提高原油采收率等领域得到广泛应用^[2-3]。Zobell 于 1946 年最早提出微生物产生的表面活性剂是微生物提高石油采收率的重要机制之一^[4]。20 世纪 60 年代之后,微生物产表面活性剂的机制得到更深入的研究^[5]。然而,对于在高盐环境产表面活性剂的报道非常少见。Yakimov 等^[6]报道一株产表面活性剂的耐盐 *Bacillus*, 该菌可用于微生物采油。2010 年, Gesheva 等^[7]从南极土壤中分离出一株能够利用烷烃的耐盐菌株 *Rhodococcus fascians* A-3, 该菌对 NaCl 的耐受性高达 9%, 并且能够利用葡萄糖或柴油作为唯一碳源合成一种鼠李糖脂表面活性剂。本实验室从黄河三角洲石油污染盐渍化土壤中筛选得到一株中度耐盐石油降解菌 *Serratia* BF40, 研究了其产生物表面活性剂的条件、动力学特征以及强化修复石油污染盐渍化土壤的效果, 以期为高盐环境下石油污染土壤的生物修复提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

菌种:通过富集培养,从黄河三角洲石油污染盐渍化土壤中筛选得到一株耐盐石油降解菌 BF40, NCBI 登录号为 JQ916906, 经生理生化试验和 16S rDNA 序列分析初步鉴定为沙雷氏菌(*Serratia* sp.), 并由中国普通微生物菌种保藏管理中心保藏(CGMCC No.5236)。

无机盐液体培养基:KH₂PO₄ 0.68 g, Na₂HPO₄ 1.79 g, MgSO₄ 0.35 g, 微量元素混合液 1 mL, pH 值调至 7.5, 蒸馏水定容至 1000 mL。其中微量元素混合液: CuCl₂·2H₂O 1.0 g, CoCl₂·6H₂O 4.0 g, ZnCl₂ 2.0 g, CaCl₂ 40.0 g, H₃BO₃ 0.5 g, NaMoO₄·2H₂O 2.0 g, FeCl₃·7H₂O 40.0 g, AlCl₃·6H₂O 1.0 g, MnCl₂·4H₂O 8.0 g, 溶于 1000 mL 蒸馏水。

牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 5.0 g, 蛋白胨 10.0

g, NaCl 5.0 g, pH 7.5。
以上培养基于 121 ℃灭菌 30 min。

1.2 供试土壤

室内污染土壤修复实验用土取自胜利油田某油井周围表层土壤(0~20 cm), 其基本理化性质见表 1。根据黄河三角洲地区土壤盐分含量、组成特征^[8]设置实验土样盐分组成和浓度梯度。具体方法为: 所取土壤于 45 ℃下干燥 4 d, 过 2 mm 筛, 混匀分成 3 份, 将含不同量的 NaCl+Na₂SO₄(摩尔比为 6:1)混合液^[8]和溶于石油醚的原油溶液分别撒入土中, 混匀, 于 40 ℃下干燥 10 d 后, 充分混匀, 制成最终含油量为 1.96%(质量比), 含盐量分别为 0.22%、0.61%、1.20% 的土样。

1.3 碳氮源对菌体生长及表面活性剂产生的影响试验

将 BF40 菌株接种到牛肉膏蛋白胨液体培养基, 置于 30 ℃恒温摇床 180 r·min⁻¹ 培养 24 h, 离心, 用磷酸缓冲液洗涤菌体 3 次, 再用磷酸缓冲液稀释, 制成细胞数约为 1×10⁸ 个·mL⁻¹ 的菌悬液。按 1%接种量分别接入以葡萄糖、蔗糖、淀粉、牛肉膏、柴油、橄榄油、正十六烷为碳源的无机盐液体培养基中, 其中, 葡萄糖、蔗糖、淀粉按 20 g·L⁻¹ 加入, 牛肉膏、柴油、橄榄油、正十六烷按 3 g·L⁻¹ 加入。以 2 g·L⁻¹ NH₄Cl 作为氮源。每个处理设置 3 个重复。调 pH 值 7.5, 于 30 ℃恒温摇床 180 r·min⁻¹ 培养 36 h, 测定菌液的表面张力、乳化值和 600 nm 处 OD 值。

以无机盐液体培养基为基础, 以牛肉膏为碳源, 分别以氯化铵、硝酸钠、尿素、酵母膏和蛋白胨为氮源, 每种氮源按 2 g·L⁻¹ 加入, 每个处理设置 3 个重复。接种量 1%, 调 pH 值 7.5, 置于 30 ℃恒温摇床 180 r·min⁻¹ 培养 36 h, 测定菌液的表面张力、乳化值和 600 nm 处 OD 值。

表面张力测定方法: 将发酵液在 4000 r·min⁻¹ 条件下离心 20 min, 去除菌体, 室温下以 JK99B 全自动张力仪测定菌液表面张力。乳化值测定方法: 在刻度试管中, 加入 5 mL 二甲苯和 5 mL 去菌体菌液, 室温振荡 2 min 后, 静止 24 h。乳化值(EI24)用乳化层的高度与二甲苯总高度之比, 乘以 100%计算。

表 1 供试土壤基本理化性质
Table 1 Primary physic-chemical properties of the tested soils

pH(H ₂ O)	盐分/%	有机碳/g·kg ⁻¹	总氮/g·kg ⁻¹	总磷/g·kg ⁻¹	速效氮/mg·kg ⁻¹	速效磷/mg·kg ⁻¹	总石油烃/mg·kg ⁻¹
7.9	0.2	7.8	0.6	0.8	27.3	24.1	57.9

1.4 pH 值、温度和 NaCl 浓度对菌体生长及表面活性剂产生的影响试验

以无机盐液体培养基为基础,以牛肉膏为碳源,以氯化铵为氮源,发酵培养基的初始 pH 值分别调至 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0。接种量 1%,于 30 ℃、180 r·min⁻¹ 条件下摇床培养 36 h,测定菌液的表面张力、乳化值和 600 nm 处 OD 值,以考察 pH 值对 BF40 生长和表面活性剂产生的影响。

控制培养温度分别为 20、25、30、37 ℃,调 pH 值 7.5,其他培养条件和测定指标同上,以考察温度对 BF40 生长和表面活性剂产生的影响。

将发酵培养基中 NaCl 浓度分别设置为 0%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%、7.0%,其他培养条件和测定指标同上,以考察 NaCl 浓度对 BF40 生长和表面活性剂产生的影响。

1.5 BF40 产表面活性剂的动力学试验

以无机盐液体培养基为基础,以牛肉膏为碳源,以氯化铵为氮源,接种量 1%,调 pH 值 7.5,于 30 ℃、180 r·min⁻¹ 条件下摇床培养。在 0、12、24、36、48、60、72 h 取样,测定菌液的表面张力、乳化值和 600 nm 处 OD 值。

1.6 石油污染盐渍化土壤的强化修复实验

供试土壤石油烃质量分数 1.96%, 设含盐量 0.22%、0.61%、1.20% 3 个水平,以不同盐度下不加菌的土样为对照,共 6 个处理,重复 3 次。具体实验方法为:将菌株按 1.3 方法制备菌悬液。取 10 mL 菌悬液,均匀喷洒入装有 100 g 土的 250 mL 三角瓶中。加入 NH₄Cl 和 K₂HPO₄,以补充土壤中 N、P 营养,使土壤中 C:N:P≈50:10:1^[9]。每隔 3 d 喷洒无菌水,使土壤含水量保持在 18%~20%(质量比)。置于 30 ℃恒温培养箱,培养 40 d。

土壤石油烃含量采用二氯甲烷提取,重量法测

定。具体方法为:取 10.0 g 干土,与硅藻土混匀,以二氯甲烷为提取剂,利用 E-916 快速溶剂萃取仪循环提取两次。提取液转入分液漏斗,用 100 mL 蒸馏水冲洗两次,收集有机相,用无水硫酸钠过滤脱水后置于预先恒重的小烧杯中,室温氮气吹脱至恒重,称重残留量。

采用 JK99B 全自动张力仪测试土壤溶液的表面张力。土壤浸出液的收集参考土壤溶液 pH 值的测定方法,土壤和纯水的比例为 1:2.5^[10]。

1.7 数据分析

采用 SPSS 13.0 for Windows 统计软件对所得数据进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 碳氮源对菌体生长及表面活性剂产生的影响

碳氮源是决定微生物合成生物表面活性剂类型和产量的重要因素,选择合适的碳源和氮源对提高生物表面活性剂的产量具有重要意义^[11]。

各种碳源对 BF40 发酵液表面活性和菌体生长的影响如图 1。培养基中不同碳源对 BF40 菌株生长有明显影响,其中,以橄榄油为碳源生长最好,牛肉膏次之,以葡萄糖、蔗糖、淀粉、十六烷和柴油为碳源菌液浓度较低。表面张力和乳化值是评价微生物产生物表面活性物质的两个重要指标,其值可以反应生物表面活性剂产量的多少^[12]。由图 1 可以看出,不同碳源对 BF40 发酵液表面张力和乳化值影响较大,其中,以牛肉膏为碳源,发酵液表面张力从 56.7 mN·m⁻¹ 降至 28.4 mN·m⁻¹,EI24 值最高,达到 97.6%。以橄榄油为碳源,发酵液表面张力为 49.6 mN·m⁻¹,EI24 值为 60.0%。以葡萄糖、蔗糖、淀粉、十六烷和柴油为碳源,发酵液表面张力较高(56.3~71.3 mN·m⁻¹),EI24 值低(11.0%~26.3%)。

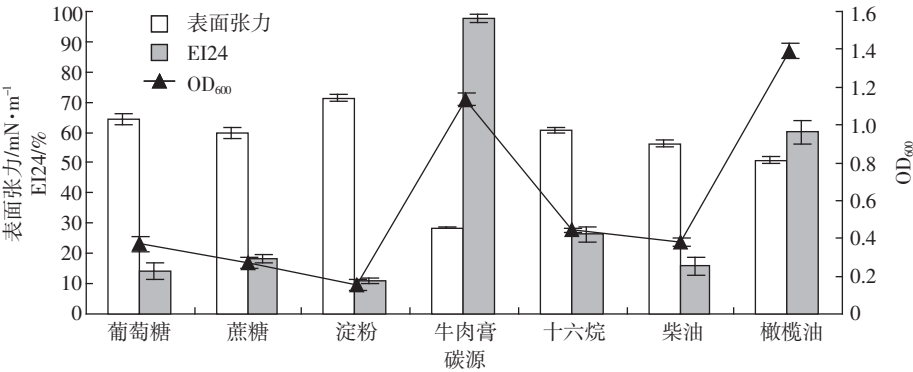


图 1 碳源对 BF40 发酵液表面活性和菌体生长的影响

Figure 1 Effect of carbon source on growth of BF40 and surface activity of culture supernatant

各种氮源对 BF40 发酵液表面活性和菌体生长的影响如图 2。以酵母膏和蛋白胨作为氮源, BF40 菌体的生长好于以硝酸钠、尿素和氯化铵作为氮源。以氯化铵为氮源, 发酵液表面张力最低, EI24 值最高。以酵母膏、蛋白胨、硝酸钠和尿素为氮源发酵液表面张力降幅较小 ($55.7 \sim 69.0 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$), EI24 值低 (12.6%~29.3%)。结果表明, BF40 合成生物表面活性剂与其利用的碳氮源类型有关, 与其生物量没有直接相关性, 这与 Nie 等^[13]、Kiran 等^[12]研究结果一致。

不同微生物产生物表面活性剂利用的碳源类型也不同。Kiran 等^[12]报道了真菌 MSF3 以葡萄糖为碳源, 以酵母膏为氮源, 产生的生物表面活性剂量最高。MSF3 以橄榄油为碳源, 以蛋白胨或尿素为氮源不能产生生物表面活性剂。Nie 等^[13]从石油污染土壤中分离得到一株铜绿假单胞菌 NY3, 以葡萄糖为碳源发酵液表面活性最高, 发酵液表面张力可降低至 $32.8 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 。Abouseoud 等^[14]报道了一株荧光假单胞菌 1895-DSMZ 以橄榄油为碳源, 以硝酸铵为氮源产生的生物表面活性剂量最高, 发酵液表面张力可降低至 $31 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, EI24 值达到 56%。1895-DSMZ 以葡萄糖

为碳源不能产生生物表面活性剂, 因为葡萄糖促使 1895-DSMZ 分泌糖醛酸等酸性次生代谢物, 降低了发酵液 pH, 抑制菌体生长。BF40 以葡萄糖、蔗糖、淀粉、十六烷、柴油和橄榄油为碳源, 以酵母膏、蛋白胨、硝酸钠和尿素为氮源, 发酵液表面张力都大于 $50 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 。以牛肉膏和氯化铵分别为碳源、氮源, 发酵液表面张力可降低至 $28.4 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, EI24 值达到 97.6%, 表面活性高于所报道的菌 MSF3^[12]、NY3^[13]和 1895-DSMZ^[14]。

2.2 pH、温度对菌体生长及表面活性剂产生的影响

生物表面活性剂是微生物产生的次生代谢物, 其产生受环境因子影响很大, pH、温度和盐分等是影响其产量的关键因子^[15]。

pH 对 BF40 发酵液表面活性和菌体生长的影响如图 3。可以看出, BF40 具有较宽的 pH 适应范围, 最适宜的 pH 生长范围为 7.0~9.5, 偏酸的环境对生长有抑制。随着 pH 的升高, 发酵液表面张力先降低后又稍微增加, 乳化值先增加后降低。pH 在 7.0~9.0 之间发酵液表面张力低于 $33 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, EI24 高于 85%, 表明 BF40 在中性及偏碱性环境生长较好, 生物表面活

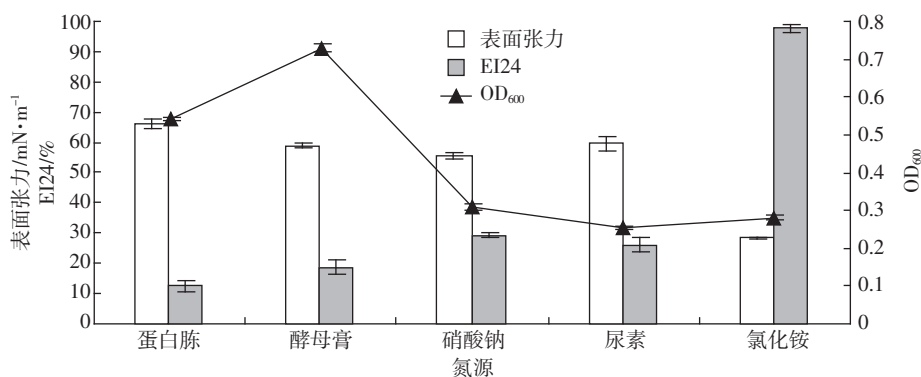


图2 氮源对 BF40 发酵液表面活性和菌体生长的影响

Figure 2 Effect of nitrogen source on growth of BF40 and surface activity of culture supernatant

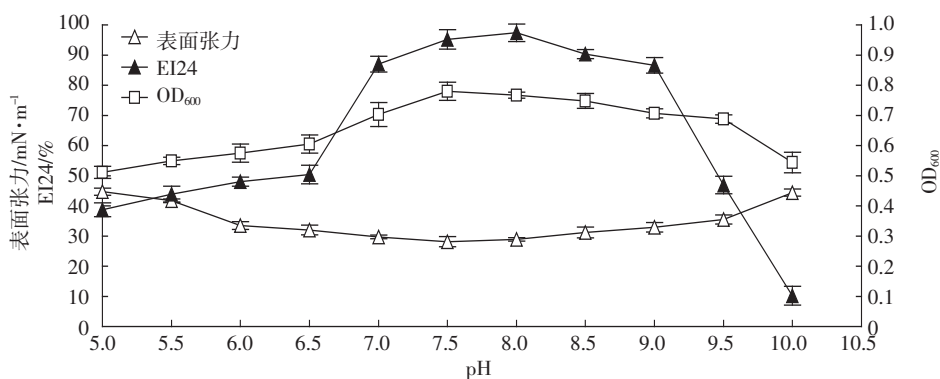


图3 pH 对 BF40 发酵液表面活性和菌体生长的影响

Figure 3 Effect of pH on growth of BF40 and surface activity of culture supernatant

性剂产量高,这与 Kiran 等^[16]从印度西南部海岸带分离出的一株枯草芽孢杆菌 (*Brevibacterium aureum*) MSA13 和 Yin 等^[17]从含油废水中分离出一株铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) S6 的特性一致。一般多数细菌产生生物表面活性剂较适宜 pH 范围为中性,酸性环境抑制细菌的生长和表面活性剂的产生。BF40 能在中性及偏碱的环境生长且生物表面活性剂产量较高,可能与其长期生存环境有关。温度是控制生化过程的一个关键参数,在一定范围内,随着温度的升高,生物体内生化反应速率加快,促进了次生代谢物质的分泌^[15]。

温度对 BF40 发酵液表面活性和菌体生长的影响如图 4。可以看出,BF40 在低于 30 ℃条件下,菌体浓度和乳化值较低。在 30~37 ℃菌体生长较好,发酵液表面张力低于 32 mN·m⁻¹,EI24 高于 90%,表明 BF40 在 30~37 ℃范围内生物表面活性剂产量较高。

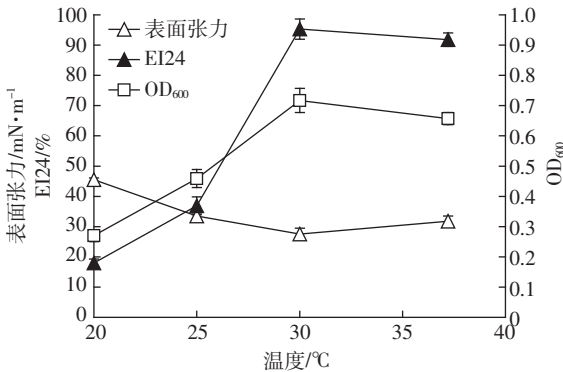


图 4 温度对 BF40 发酵液表面活性和菌体生长的影响

Figure 4 Effect of temperature on growth of BF40 and surface activity of culture supernatant

2.3 盐分对菌体生长及表面活性剂产生的影响

土壤的石油污染常伴随着高盐环境,高浓度盐离子严重制约石油烃降解菌的生长及其对于石油烃的代谢能力,传统的非耐盐微生物并不适合对污染的高盐环境进行生物修复^[18]。前期研究发现 BF40 能在含 0.5%~6.0%NaCl 液体培养基中生长良好(不同盐度下生长曲线数据未给出),属中度耐盐菌。在含 1.0% NaCl 液体培养基中,降解 7 d 后,原油降解率达到 56.7%。BF40 在不同 NaCl 浓度下培养 36 h 后,菌体浓度和发酵液表面活性变化如图 5 所示。可以看出,BF40 在 NaCl 浓度低于 6.0%的培养基中生长良好,当 NaCl 浓度增加到 7.0%时,培养液 OD₆₀₀ 明显降低,这与实验室前期研究结果一致。NaCl 浓度对 BF40 发酵液的表面张力和乳化值影响不同。NaCl 浓度从 0%

~7.0%,发酵液表面张力变化范围在 28.4~67.2 mN·m⁻¹ 之间,NaCl 浓度低于 3.0%时,发酵液表面张力增幅较小,仅从 28.4 mN·m⁻¹ 上升到 34.6 mN·m⁻¹,当 NaCl 浓度高于 3.0%后,表面张力迅速升高。EI24 变化范围在 3.7%~98.6%之间,当 NaCl 浓度大于 1.0%时,EI24 开始迅速降低,浓度达到 4.0%时,EI24 降低到 8.3%。但 BF40 在 NaCl 浓度为 2.0%时,仍具有较高的乳化性能,EI24 为 66.9%,这与已报道的最大 EI24 值 65%^[19] 相当。

在高盐条件下,微生物既要忍受长期的高渗透压胁迫,又要承受短期的渗透冲击。盐度从 0.5%升高至 2%时,会严重扰乱一般微生物的代谢活动。当盐度>3%时,非嗜盐微生物的代谢会受到抑制,使其生物修复效率明显降低,甚至丧失修复能力^[18]。BF40 能在含 0.5%~6.0%NaCl 液体培养基中生长良好,在 NaCl 浓度为 2.0%时仍具有较高的乳化性能和较低的表面张力。Manoj 等^[20]从石油污染土壤中分离出一株耐盐耐热假单胞菌 DHT2,该菌能够在 0%~6%盐浓度、30~45 ℃的温度范围内产生表面活性剂。Ghojavand 等^[21]从油田中分离出几株兼性厌氧枯草芽孢杆菌,这些菌能够在高温(55 ℃)高盐(10%)环境中产生表面活性剂。Ghojavand 等^[22]报道了一株耐盐芽孢杆菌,该菌对 NaCl 的耐受性高达 10%,在含 5%NaCl 培养基中,发酵液表面张力可降低到 27 mN·m⁻¹。土壤复杂环境影响微生物活性和酶活性^[23],微生物一般在培养基中表现出的特性,在修复污染土壤中可能存在有较大差异。目前,对于产表面活性剂耐盐菌在石油污染土壤修复中应用报道较少。在含盐量为 0.22%和 0.61%土壤中添加菌 BF40,土壤溶液表面张力都显著低于自然体系,石油烃降解率达到 50%以上,表明 BF40 在

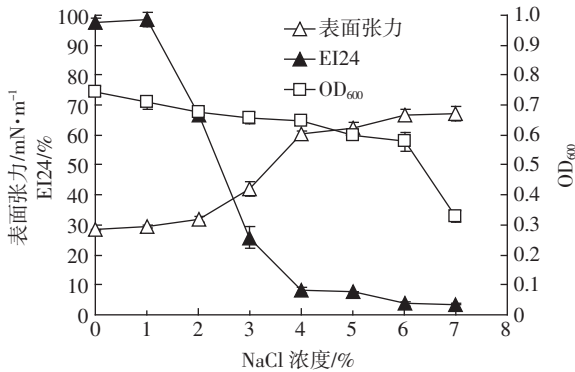


图 5 盐分对 BF40 发酵液表面活性和菌体生长的影响

Figure 5 Effect of salinity on growth of BF40 and surface activity of culture supernatant

修复高盐石油污染土壤环境中具有很大的应用潜力。

2.4 BF40 产表面活性剂动力学

菌株在代谢过程中的生长曲线及发酵液表面张力、EI24、pH 和排油圈大小的变化如图 6。可以看出, BF40 在对数生长期, 发酵液表面张力开始降低, 当培养到 18 h, 表面张力降至最低, 为 27.4 mN·m⁻¹, 随后表面张力略微升高。在培养 12 h 后, EI24 迅速升高到 88.3%, 培养 24 h 后, 达到最高值 97.6%。排油圈大小是一种快速准确测定培养液中表面活性物质含量的方法^[24], BF40 发酵液大小变化与 EI24 变化趋势基本相同, 在培养 12 h 后排油圈直径达到 7.3 cm。在菌株生长稳定期, 发酵液表面张力、EI24、排油圈直径变化比较平稳。结果表明, BF40 在对数生长期产生生物表面活性剂。关于微生物细胞生长与产生生物表面活性剂之间的关系, 目前还存在较大争议。Patel 等^[25]和 Zhang 等^[26]报道了铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 在生长受抑制, 达到稳定期才产生生物表面活性剂, 而更多研究者认为生物表面活性剂的产生与菌体细胞生长相关联^[27]。BF40 能在对数生长期发酵液表面张力降至最低, 排油圈直径和 EI24 达到最高值, 表明 BF40 产生物表面活性

剂与细胞生长关联。

2.5 BF40 对石油污染盐渍化土壤的强化修复效果

黄河三角洲盐渍化土壤中土著菌对石油烃污染土壤具有较强的生物修复潜力^[28]。为了进一步了解 BF40 对黄河三角洲石油污染盐渍化土壤的强化生物修复效果, 设土壤含盐量为 0.22%、0.61%、1.20% 3 个水平进行修复试验, 结果见表 2。可以看出, 投加 BF40 的土壤石油烃降解率显著高于自然体系 ($P<0.05$), 降解 40 d 后, 0.22%、0.61%、1.20% 3 个盐度下投加 BF40 土壤石油烃降解率分别比对照提高了 16.9%、25% 和 18.8%。大量研究表明, 随着盐浓度的增加微生物解烃效率降低^[29-30], 在含盐量为 0.22% 和 0.61% 土壤中添加菌 BF40, 石油烃降解率都达到 50% 以上, 二者差异不显著 ($P<0.05$), 表明 BF40 具有一定的耐盐性, 在高盐环境土壤中能强化生物分解石油烃能力。由表 2 还可知, 投加 BF40 的土壤溶液表面张力显著低于自然体系 ($P<0.05$), 生物表面活性剂可以促进石油乳化, 增加石油烃与微生物的接触面积, 进而提高微生物对石油烃的降解率。这可能是添加 BF40 显著提高土壤石油烃降解率的原因之一。

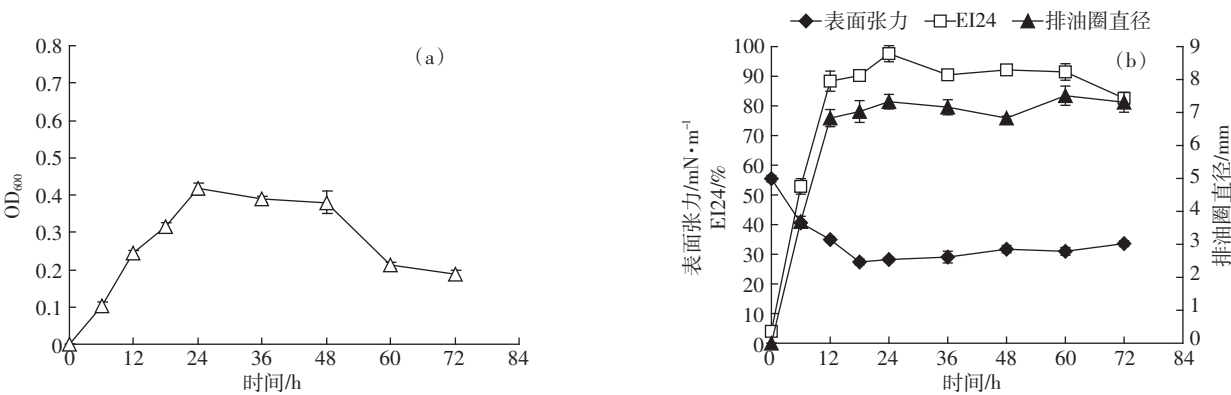


图 6 菌株发酵动力学曲线
Figure 6 Fermentation curve of the strain

表 2 添加 BF40 对不同含盐量土壤石油烃降解和土壤浸提液表面张力的影响

Table 2 Effect of BF40 on surface tension of soil extract and degradation rates of crude oil in different salinity soils

含盐量/%	降解率/%		土壤溶液表面张力/mN·m ⁻¹	
	对照	添加 BF40	对照	添加 BF40
0.22	38.4±1.69a	55.3±2.96aA	69.1±1.32a	62.7±0.99aB
0.61	33.7±1.13b	58.7±3.12aA	71.6±1.59a	63.2±0.76aB
1.20	20.6±0.89c	39.4±0.89bA	72.9±1.75a	66.2±0.63bB

注:A 表示添加 BF40 的土壤与对照土壤石油烃降解率的差异显著, $P<0.05$; B 表示添加 BF40 的土壤溶液与对照土壤溶液表面张力的差异显著, $P<0.05$; a、b、c 字母不同表示同列数据差异显著, $P<0.05$ 。

3 结论

(1)BF40 产生物表面活性剂最适碳源为牛肉膏,最适氮源为氯化铵,在 30~37℃中性及偏碱性环境中生长较好,生物表面活性剂产量较高。BF40 能在含 0.5%~6.0%NaCl 液体培养基中生长良好,在 NaCl 含量为 2.0%时,发酵液仍具有较高的乳化性能和较低的表面张力,表明 BF40 在修复高盐石油污染环境中具有很大的应用潜力。

(2)BF40 在对数生长期发酵液表面张力迅速降至最低,排油圈直径和 EI24 达到最高值,在菌株生长稳定期,发酵液表面张力、EI24、排油圈直径变化比较平稳。BF40 表面活性剂的产生与细胞生长相关联。

(3)投加 BF40 的土壤石油烃降解率显著高于不加 BF40 的自然体系。在含盐量为 0.22%和 0.61%土壤中,添加 BF40 的土壤石油烃降解率都达到 50%以上,表明 BF40 在高盐环境土壤中能强化生物分解石油烃能力。BF40 能显著降低土壤溶液表面张力,这可能是添加 BF40 显著提高土壤石油烃降解率的原因之一。

参考文献:

- [1] Banat I M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review[J]. *Biore-source Technology*, 1995, 51(1): 1-12.
- [2] Makkar R S, Rockne K J. Comparison of synthetic surfactants and bio-surfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, 22(10): 2280-2292.
- [3] Kuyukina M S, Ivshina I B, Makarov S O, et al. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system[J]. *Environ-ment International*, 2005, 31(2): 155-161.
- [4] Zobell C E. Bacteriological process for treatment of fluid-bearing earth formation[P]. US Patent, CN2413278, 1946-10-24.
- [5] 崔中利, 刘卫东, 曹 慧, 等. 生物表面活性剂生物合成的研究进展[J]. *土壤*, 2005, 37(6): 607-612.
CUI Zhong-li, LIU Wei-dong, CAO Hui, et al. Review on biosynthesis of biosurfactants[J]. *Soils*, 2005, 37(6): 607-612.
- [6] Yakimov M M, Timmis K N, Wray V, et al. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS 50[J]. *Applied and Environmen-tal Microbiology*, 1995, 61(5): 1706-1713.
- [7] Gesheva V, Stackebrandt E, Vasileva-Tonkova E. Biosurfactant produc-tion by halotolerant *Rhodococcus fascians* from Casey Station, Wilkes Land, Antarctica[J]. *Current Microbiology*, 2010, 60(2): 112-117.
- [8] 翁永玲, 宫 鹏. 黄河三角洲盐渍土盐分特征研究[J]. *南京大学学报 (自然科学)*, 2006, 42(6): 602-610.
- [9] WENG Yong-ling, GONG Peng. Soil salinity measurements on the Yel-low River Delta[J]. *Journal of Nanjing University (Natural Sciences)*, 2006, 42(6): 602-610.
- [10] Yerushalmi L, Rocheleau S, Cimpoia R, et al. Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbon in contaminated soil[J]. *Bioremediation Jour-nal*, 2003, 7(1): 37-51.
- [11] 郭 婷, 张承东, 张清敏. 生物修复石油污染盐碱土壤小试模拟系 统中土壤性质与微生物特性变化[J]. *中国环境科学*, 2010, 30(8): 1123-1129.
GUO Ting, ZHANG Cheng-dong, ZHANG Qing-min. Changes of soil properties and microorganism characteristic during bioremediation of petroleum-contaminated saline soil in microscale simulation study[J]. *China Environment Science*, 2010, 30(8): 1123-1129.
- [12] Finnerty W R, Singer M E. Microbial biosurfactant-physiology, bio-chemistry, and applications[J]. *Development in Industrial Microbiology*, 1984, 25(2): 31-40.
- [13] Kiran G S, Thomas T A, Selvin G. Production of a new glycolipid bio-surfactant from marine *Nocardiopsis lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 78(1): 8-16.
- [14] Nie M, Yin X, Ren C, et al. Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseu-domonas aeruginosa* strain NY3[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(5): 635-643.
- [15] Abouseoud M, Maachi R, Amrane A, et al. Evaluation of different car-bon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseu-domonas fluorescens*[J]. *Desalination*, 2008, 223(1-3): 143-151.
- [16] Najafi A R, Rahimpour M R, Jahanmiri A H, et al. Enhancing biosur-factant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2010, 163(3): 188-194.
- [17] Kiran G S, Thomas T A, Selvin G, et al. Optimization and characteriza-tion of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibac-terium aureum* MSA13 in solid state culture[J]. *Bioresource Technolo-gy*, 2010, 101(7): 2389-2396.
- [18] Yin H, Qiang J, Jia Y, et al. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater [J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(3): 302-308.
- [19] Margesin R, Schinner F. Biodegradation and bioremediation of hydro-carbons in extreme environments[J]. *Applied Microbiology and Biotech-nology*, 2001, 56(5-6): 650-663.
- [20] Bento F M, Camargo F A O, Okeke B C, et al. Comparative bioremedia-tion of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, bios-timulation and bioaugmentation[J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96(9): 1049-1055.
- [21] Manoj K, Lecdn V, De Sisto Angela M, et al. Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseu-domonas* sp.[J]. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 2008, 24(7): 1047-1057.
- [22] Ghajavand H, Vahabzadeh F, Mehranian M, et al. Isolation of thermo-tolerant, halotolerant, facultative biosurfactant-producing bacteria[J].

- Applied Microbiology Biotechnology*, 2008, 80(6): 1073–1085.
- [22] Ghojavand H, Vahabzadeh F, Azizmohseni F. A halotolerant, thermo-tolerant, and facultative biosurfactant producer: Identification and molecular characterization of a bacterium and evolution of emulsifier stability of a lipopeptide biosurfactant[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2011, 16(1): 72–80.
- [23] 戴冬娟, 李广贺, 张旭, 等. 酸性土壤环境石油烃生物降解效应[J]. 环境科学, 2005, 26(3): 146–151.
DAI Dong-juan, LI Guang-he, ZHANG Xu, et al. Effects of acid soils on the biodegradation of hydrocarbons[J]. *Environmental Science*, 2005, 26(3): 146–151.
- [24] Youssef N H, Duncan K E, Nagle D P, et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 56(3): 339–347.
- [25] Patel R M, Desai A J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1997, 25(2): 91–94.
- [26] Zhang Y, Miller R M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* biosurfactant[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(10): 3276–3282.
- [27] Cha M, Lee N, Kim M, et al. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(7): 2192–2199.
- [28] 王震宇, 赵建, 李锋民, 等. 盐渍化土壤中土著菌的石油烃降解潜力研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(7): 1416–1421.
WANG Zhen-yu, ZHAO Jian, LI Feng-min, et al. Petroleum hydrocarbons degradation potential of autochthonous bacteria from saline soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(7): 1416–1421.
- [29] Ward D M, Brock T D. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, 35(2): 353–359.
- [30] Mille G, Almallah M, Bianchi M, et al. Effect of salinity on petroleum biodegradation[J]. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1991, 339(10): 788–791.

欢迎订阅 2013 年 《农业环境科学学报》

《农业环境科学学报》(原《农业环境保护》)是由农业部主管,农业部环境保护科研监测所、中国农业生态环境保护协会主办的全国性学术期刊。是中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库核心期刊,列于被引频次最高的中国科技期刊 100 名之内并入选《中国学术期刊(光盘版)》。本刊还被国外多家著名检索机构收录,如美国《化学文摘》(CA)和俄罗斯《文摘杂志》(AJ),美国《剑桥科学文摘社网站:水系统、水科学与渔业文摘、环境工程、水资源文摘及环境科学与污染管理》等 7 种国际检索系统列为来源期刊。本刊主要刊登农业生态环境科学领域具有创新性的研究成果,包括新理论、新技术和新方法。读者对象为从事农业科学、环境科学、林业科学、生态学、医学和资源保护等领域的科技人员和院校师生。

《农业环境科学学报》为月刊,每月 20 日出版,大 16 开,224 页,每本定价 75.00 元,全年定价 900.00 元。国内外公开发行,全国各地邮局征订,邮发代号 6–64。如读者在当地邮局漏订,可通过邮局汇款至本刊编辑部补订。此外,编辑部存有 2010 年以前的各卷合订本,欢迎选购。

编辑部地址:天津市南开区复康路 31 号

邮编:300191

电话:(022)23674336

传真:(022)23674336

邮箱:caep@vip.163.com

网址:http://www.aes.org.cn