

具有产表面活性剂功能石油降解菌的筛选及其发酵条件优化

章 慧¹, 郭楚玲^{1*}, 卢桂宁¹, 杨 琛¹, 党 志¹, 吴仁人²

(1. 华南理工大学环境与能源学院 工业聚集区污染控制与生态修复教育部重点实验室, 广州 510006; 2. 环境保护部华南环境科学研究所 广东省水与大气污染防治重点实验室, 广州 510655)

摘 要:从广州某炼油厂附近石油污染的土壤中筛选出一株可高效产表面活性剂的原油降解菌株 MZ01, 结合菌株形态观察、革兰氏染色和 16S rDNA 序列同源性进行分析鉴定其属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp. MZ01), 该菌 9 d 对原油的降解率达 54.7%。通过正交实验优化其产表面活性剂的环境因子并进行发酵培养, 结果表明, MZ01 最佳发酵条件为: 酵母膏($3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)作为氮源, 玉米油($2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)作为碳源, 温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 值为 9.0 和含盐量为 5%。该条件下 3 d 的发酵产物经提纯后得到表面活性剂产量为 $2.27\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 测得该产物 CMC 值为 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 可将水的表面张力从初始的 $72\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 降至 $30\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 。

关键词:生物表面活性剂; 原油降解菌; 发酵条件优化; 铜绿假单胞菌

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2013)11-2185-07 doi:10.11654/jaes.2013.11.012

Screening and Fermentation Optimization of a Biosurfactant-producing Oil-degrading Bacterium

ZHANG Hui¹, GUO Chu-ling^{1*}, LU Gui-ning¹, YANG Chen¹, DANG Zhi¹, WU Ren-ren²

(1. The Key Laboratory of Pollution Control and Ecosystem Restoration in Industry Clusters, Ministry of Education/School of Environment and Energy, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. The Key Laboratory of Water and Air Pollution Control of Guangdong Province/South China Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Guangzhou, 510655, China)

Abstract: The aim of the present study was to isolate oil-degrading bacterial strains with high ability to produce biosurfactants. Bacterial strains from oil contaminated soil near a refinery were enriched and incubated with oil as the sole carbon source. Bacterial strains to produce biosurfactants were then screened by testing oil collapse-dropping, emulsification index and surface tension, and those strains with the ability to degrade oil were further screened by DCPIP tests. An oil-degrading bacterial strain MZ01 with high ability to produce biosurfactants was obtained. It was identified as *Pseudomonas* sp. MZ01 by gram-staining, morphology, and 16S rDNA sequencing. MZ01 could degrade crude oil by 54.7% within 9 days. The optimal conditions for MZ01 to produce biosurfactants were explored by orthogonal experiments. These conditions were yeast extract($3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) as nitrogen source, corn oil($2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) as carbon source, initial pH 9.0, 5% salinity and temperature $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. The production of biosurfactants by MZ01 was $2.27\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ after 3-day fermentation. The critical micelle concentration(CMC) of the biosurfactants was $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, reducing the surface tension of pure water from $72\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ to $30\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

Keywords: biosurfactant; oil-degrading bacteria; fermentation optimization; *Pseudomonas* sp.1

随着社会经济的飞速发展,石油及其产品被广泛地开发应用,石油使用量的激增给土壤和水环境带来

了极大的危害^[1],石油污染的防治已成为环境保护的重要任务。微生物降解由于处理费用低、彻底、无二次污染等特点,已成为去除石油污染环境的最主要途径之一。然而,石油的疏水性使得其微生物治理相当困难,石油降解菌降解效率低^[2]。研究表明^[3-5],在生物修复过程中投加表面活性剂能有效地提高石油烃类化合物和其他有机化合物的溶解度,从而提高有机污染物质的生物有效性以增强生物修复的效果。而化学表面活性剂的使用可能会对微生物产生毒害作用,并带

收稿日期:2013-03-13

基金项目:国家“863”计划项目(2012AA101403);广东省自然科学基金(S2012010008589);广州市科技计划项目(12C62081569);广州市珠江科技新星项目(2011J2200064);广东省水与大气污染防治重点实验室开放基金项目(2011A060901002)

作者简介:章 慧(1988—),女,湖南衡阳人,硕士研究生,主要从事生态环境修复技术的研究。E-mail:zhanghui244244@163.com

* 通信作者:郭楚玲 E-mail:clguo@scut.edu.cn

来二次污染问题^[6-7];生物表面活性剂,一类在微生物代谢过程中分泌出的,同时具有疏水及亲水基团对疏水性有机物起增溶作用的有机物质,具有耐受极端环境、环境友好、乳化效果好等优点,因而得到人们越来越多的青睐^[8-10]。

目前国内外对生物表面活性剂的研究更多地集中在产生物表面活性剂菌株的筛选^[11-12]。已筛选到可产生物表面活性剂的微生物有假单胞菌、酵母菌、红球菌、青霉菌、不动杆菌、大肠杆菌等^[13]。然而,筛选得到的产生物表面活性剂的菌株通常产量低、发酵周期长、降解石油效率较低,使得生物表面活性剂的实际应用受到较大的限制^[14]。因此,筛选能同时高效产生物表面活性剂和降解石油的菌株具有极其重要的意义。本研究的目的是从油污染环境中筛选具有高效产表面活性剂性能的原油降解菌株,优化该菌株产表面活性剂的发酵条件,以期探索产表面活性剂的降解菌在治理石油污染中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌种和培养基

供试样品来源于广州某炼油厂附近被污染的土壤,添加原油对其土著微生物进行驯化,原油(密度 $>0.900\ 0\ \text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)由广州石化公司提供。

实验所需其他试剂均为国产分析纯,有机溶剂重蒸后使用。

无机盐培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02, NH_4NO_3 1, NaCl 1, KH_2PO_4 1.5, K_2HPO_4 2, 微量元素 1 mL, H_2O 1 L, 调节 pH 值为 7.0。微量元素的配制($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01, H_3BO_3 0.01, $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_2\text{O}_7$ 0.013 7, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.010 7, 调节 pH 值至 7.0。

分离纯化培养基:18 g 营养肉汤,18 g 琼脂,1 L 蒸馏水,调节 pH 值为 7.0。

富集培养基:在无机盐培养基中添加 $2\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 原油。

初始发酵培养基:用葡萄糖 5 g 和酵母膏 3 g 取代原油加入上述无机盐培养基中。

原油降解培养基:于上述无机盐培养基中添加原油 $0.2\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.2 菌株的富集与分离纯化

称取 2 g 上述采集的土壤加入灭菌后的富集培养基中,室温下 $150\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 7 d,取出静置 5 min,取 5 mL 上清液于相同条件下富集培养 3 次。利

用平板涂布法分离得到单菌落,然后再挑取不同的单菌落分离纯化。

1.3 产表面活性剂菌株的筛选

1.3.1 油滴坍塌实验

纯化后的菌株用初始发酵培养基($150\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $30\ ^\circ\text{C}$)发酵培养 48 h, $4000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液 $2\ \mu\text{L}$ 滴入 96 孔板板盖中心,但事先应滴入 $2\ \mu\text{L}$ 原油于 96 孔板板盖中心并静置 24 h 使之均匀覆盖一层油膜。观察各菌株的发酵液 1 min 内产生排油圈的情况。每种菌株做 3 组平行样^[15]。

1.3.2 乳化指数的测定

纯化后的菌株用初始发酵培养基($150\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $30\ ^\circ\text{C}$)发酵培养 48 h, $4000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取 2 mL 上清液以及 2 mL 正十六烷于 10 mL 离心管中,超声破碎 15 min,然后静置 2 h,观察乳化层高度及其乳化分层效果。每株菌株做 3 组平行样^[16]。

1.3.3 表面张力的测定

纯化后的菌株用初始发酵培养基($150\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $30\ ^\circ\text{C}$)发酵培养 48 h, $4000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液测量其表面张力的大小。所需仪器是上海方瑞仪器公司生产的 QBZY-1 型表面张力仪。每株菌株做 3 组平行样^[17]。

1.4 具有产生物表面活性剂功能的原油降解细菌的筛选

纯化后的菌株用初始发酵培养基($150\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $30\ ^\circ\text{C}$)发酵培养 48 h, $6000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,然后用 0.85% NaCl 溶液洗涤两次再用其悬置,调整其 OD_{600} 为 0.4~0.6。

取一 96 孔板并在其中加入 $200\ \mu\text{L}$ 上述无机盐培养基、 $30\ \mu\text{L}$ 石油、 $20\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DCPIP 作为氧化还原指示剂。加 $25\ \mu\text{L}$ 经上述处理的菌体上清液后放置室温培养 48 h,原油降解菌能将培养物从蓝色变为无色,将颜色变化显著情况作为衡量菌株降解石油的能力标准。每株菌株做 3 组平行样^[18]。

1.5 菌株 MZ01 的鉴定

菌株 MZ01 的鉴定采用革兰氏染色、SEM 形态观察及 16S rDNA 序列分析等方法。PCR 采用通用引物 F27:5'-AGAGT TTGAT CCTGG CTCAG-3'和 R1522:5'-AAGGA GGTGA TCCAG CCGCA-3'。PCR 反应体系($25\ \mu\text{L}$):dNTPs $0.5\ \mu\text{L}$,Taq 酶 $0.5\ \mu\text{L}$,10×PCR 缓冲液 $2.5\ 0.5\ \mu\text{L}$,模板 $1.0\ 0.5\ \mu\text{L}$,引物 $1.0\ 0.5\ \mu\text{L}$, ddH_2O $19.5\ \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^\circ\text{C}$ 变性 1 min,56 $^\circ\text{C}$ 退火 1 min,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 2 min。

此步骤共进行 30 个循环。72 ℃延伸 7 min,最后 4 ℃保存。PCR 产物的纯化和测序由广东省微生物分析检测中心完成。测得的结果用 Blast 软件进行同源性比较并利用 Mega 软件建立系统发育树。

1.6 菌株 MZ01 降解原油的测定

吸取 OD₆₀₀ 为 0.5 的 MZ01 菌悬液 1 mL 接种至 50 mL 原油降解培养基中,于 25 ℃、150 r·min⁻¹ 振荡培养 9 d,分别以不添加降解菌 MZ01 和灭菌 MZ01 作为空白对照。然后用与培养基等体积的分析纯正己烷萃取培养基中剩余的原油组分,并用紫外分光光度计于 224 nm 处测量原油的吸光度^[19]。

1.7 菌株 MZ01 的发酵条件优化

为使菌株 MZ01 更好地产表面活性剂,实验选取温度、初始 pH 值、碳源、氮源、含盐量 5 个环境因素对 MZ01 发酵条件进行优化。本次实验采用五因素五水平的正交实验,如表 1 所示。每组实验发酵培养 3 d 后,于 8000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液测定表面张力的以选取最佳的发酵条件。每组实验 3 个平行样。

表 1 试验因素水平表

Table 1 Factors and levels used in orthogonal experiment

水平	因素				
	温度(℃)	pH 值	碳源	氮源	含盐量/g·L ⁻¹
1	20	6	葡萄糖	酵母膏	0
2	25	7	蔗糖	牛肉膏	5
3	30	8	正十六烷	硝酸铵	10
4	35	9	玉米油	硫酸铵	15
5	40	10	柠檬酸钠	尿素	25

2 结果与讨论

2.1 产表面活性剂菌株的筛选

筛选产表面活性剂菌株常用的方法有血平板法、油滴坍塌实验法、乳化分析、蓝平板法等。Satpute 利用多种方法从海水中筛选产表面活性剂的菌株,实验结果表明油滴坍塌实验以及乳化分析这两种方法筛选出来的产表面活性剂的菌株种类多,而蓝平板、血平板等仅能筛选特定的几种类型^[16]。另外,在相同的条件下,各菌株的发酵产物越多,发酵液的表面张力值越小,因此可以通过测量发酵液的表面张力筛选目的菌株。通过对各类方法的比较,本次实验采用油滴坍塌、乳化分析以及测量发酵液表面张力的方法筛选产表面活性剂的细菌。

本研究经富集培养、平板纯化从石油污染的土壤中初步分离得到若干形态特征差异明显的菌株,进一

步通过油滴坍塌实验得到 23 株具有产表面活性剂功能的菌株,结合乳化分析以及表面张力的分析测定,最后,共筛选出 3 株有明显效果的产表面活性剂菌株(表 2),菌株形态特征如图 1(a,b,c)所示。

表 2 生物表面活性剂产生菌筛选结果

Table 2 Screening of biosurfactant-producing bacteria

菌株	油滴坍塌实验	乳化分析	表面张力/mN·m ⁻¹
MZ01	++	+++	55.2±0.2
MZ02	+++	+	61.1±0.1
MZ03	+	+++	61.6±0.1

2.2 石油降解菌株的筛选

本文利用 DCPIP 氧化还原显色剂筛选具有石油降解功能的菌株,实验结果显示空白即未添加微生物条件下,96 孔板中对应孔里的颜色呈现明显的深蓝色,颜色几乎未发生变化;而分别添加有菌株 MZ01、NZ02 和 NZ03 的孔中,颜色几乎退化为无色;在添加分离得到的其他菌株的孔中,颜色都较深,有些并未发生明显的变化。这是因为石油、多环芳烃以及烷烃等碳氢化合物的降解氧化情况可用氧化还原指示剂 DCPIP 进行评估,其主要功能在于可灵敏地反应碳氢化合物初步氧化过程。通常 DCPIP 在氧化态时呈深蓝色,将其添加至微生物降解石油的培养基中,其作为电子受体接受碳氢化合物氧化时所产生的电子从而变为无色^[20]。陈来琳利用该方法从油污染土壤中筛选得到十株分别对 C10、C16、C34、汽油、柴油具有较好降解效果的菌株,其中有 7 株无论在室温还是 4 ℃条件下具有较好的降解效果,而其他 3 株仅在室温下有效果^[18]。本文通过该方法从油污染的土壤中共筛选出 3 株具有明显效果的石油降解菌。在添加有 MZ01、NZ02 以及 NZ03 3 种菌对应的孔中原油氧化效果明显,而空白中的原油几乎未被氧化,说明 MZ01、NZ02 以及 NZ03 这 3 种菌对原油有很好的利用能力。菌株 MZ01、NZ02 和 NZ03 形态特征如图 1(a,d 和 e)所示。

2.3 产表面活性剂菌株 MZ01 对原油的降解能力

将菌株 MZ01 以 2%接种量接种至原油降解培养基中,于 25 ℃培养 9 d 后,经紫外分光光度计测得培养基中剩余的原油量为 45 mg·L⁻¹ 左右,培养基中原油的去除率达 77.4%以上。扣除空白中原油挥发组分,得到 MZ01 在 9 d 内对原油的降解率达 54.7%。李宝明等利用油平板以及含有液体培养基筛选得到几株对石油具有较好降解效果的细菌,5 d 对石油的降

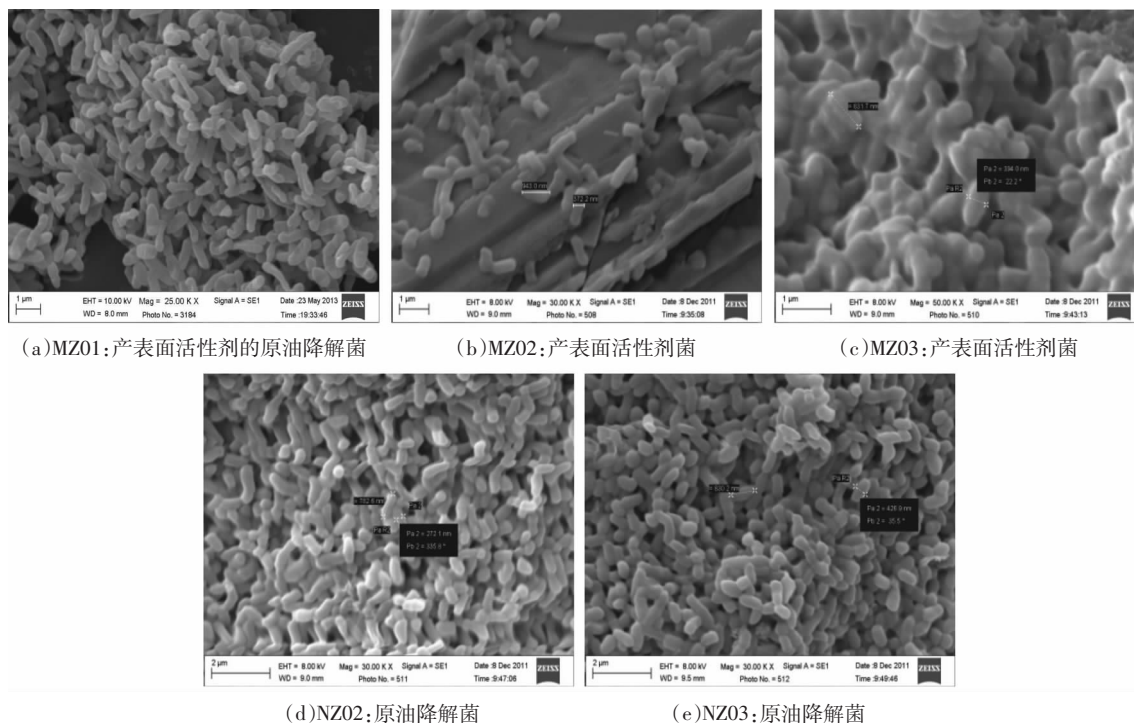


图 1 筛选得到的菌株 SEM 形态观察

Figure 1 Morphology of bacterial strains under scanning electron microscope (SEM)

解效果在 20%~40%之间,将其构成降解菌群,得到 5 d 的降解率达 55.5%^[21]。Sugiura 等在温度 20 °C 下,得到菌株 *Acinetobacter* sp.T4 对 Dubai 原油、Shengai 原油、Maya 原油的降解率最高分别达到 27%、25%、19%^[22];张娜利用油平板筛选得到的菌株 X-1 于含原油无机盐培养基降解培养 6 d (28 °C, 200 r·min⁻¹),测得其对原油的降解量为 30.4%^[23]。与国内同期的其他研究相比,该菌具有较好的原油降解效果和良好的应用基础。

综合上述实验结果,获得一株具有良好产表面活性剂功能的石油降解菌,并将其命名为 MZ01。结合菌株形态观察,生理生化特性和 16S rDNA 序列同源性进行分析鉴定其属于假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)。在扫描电镜下观察得到该菌株呈短杆状,长约 1200 nm,宽约 300 nm (图 1),其在平板上的菌落呈圆形,浅绿色,边缘光滑平整,经革兰氏染色呈阴性。该菌株 16S rDNA 的 GenBank 序列号为 JX414171。对该菌株进行基于 16S rDNA 序列的进化树分析,结果如图 2 所示。

2.4 菌株 MZ01 发酵条件优化

由于生物表面活性剂的产量低,极大地限制了生物表面活性剂的商业化应用,如 Borjana 筛选得到的产表面活性剂菌株,在利用葡萄糖进行发酵时糖脂最

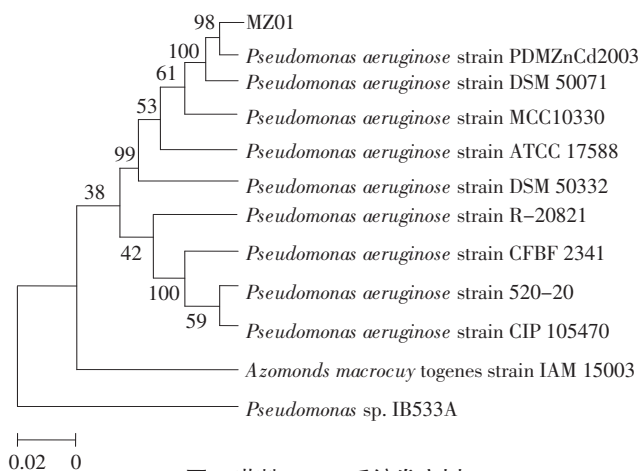


图 2 菌株 MZ01 系统发育树

Figure 2 Phylogenetic relationship of gene sequences of strain MZ01

大的产量仅为 1.2 g·L⁻¹^[24]。因此,在发酵过程中通过优化培养基配方和控制发酵条件来提高微生物产表面活性剂的能力具有重要意义。不同的碳源对微生物产生物表面活性剂的结构产生较大的影响。以石蜡节杆菌为例,分别添加果糖、正构烷烃时则分别产生果糖脂、海藻糖脂,而加入烷烃类物质时则会生成海藻糖脂和槐糖脂^[25];在利用铜绿假单胞菌生产鼠李糖脂时发现,氮源与碳源的比例对鼠李糖脂的产量起着调节作用,在限氮条件下鼠李糖脂的产量明显增加^[26];加

入铁或锰盐也能增加枯草芽孢杆菌产表面活性剂的量^[27];其他可能影响生物表面活性剂生产的营养成分包括氮源、磷源、金属离子和其他添加剂^[28]。此外,诸如温度、含盐量等许多环境因素也是影响微生物产表面活性剂效果的重要因素之一^[29]。

在达到临界胶束浓度之前,表面活性剂的表面张力大小与其浓度呈反比关系,由此可知发酵液中表面活性剂的浓度越高,其表面张力会随之降低,直至到达其临界胶束浓度。因此,可通过测量发酵液表面张力的大小来间接反应微生物产生表面活性剂的效果。

按照所设计的正交实验表,每组实验做 3 个平行样以及 3 组不加菌液的空白。经发酵培养后,除去菌

体,测量表面张力,结果如图 3 所示。

MZ01 最佳发酵条件为:酵母膏($3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)作为氮源,玉米油($2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)作为碳源,温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,初始 pH 值为 9.0,含盐量为 5%。并且,经极差分析,可知所选取的影响发酵的因素主次顺序为氮源>温度>初始 pH 值>碳源>含盐量。同时,利用优化后的发酵环境对 MZ01 进行发酵,3 d 后提纯发酵液并干燥,得到发酵物 $2.27\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.5 菌株 MZ01 发酵 3 d 产生的表面活性剂 CMC 值

表面活性剂的临界胶束浓度(CMC)是评价生物表面活性剂界面性能的一个重要参数^[30]。通常能将水的表面张力降至 $35\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 以下的表面活性剂被认

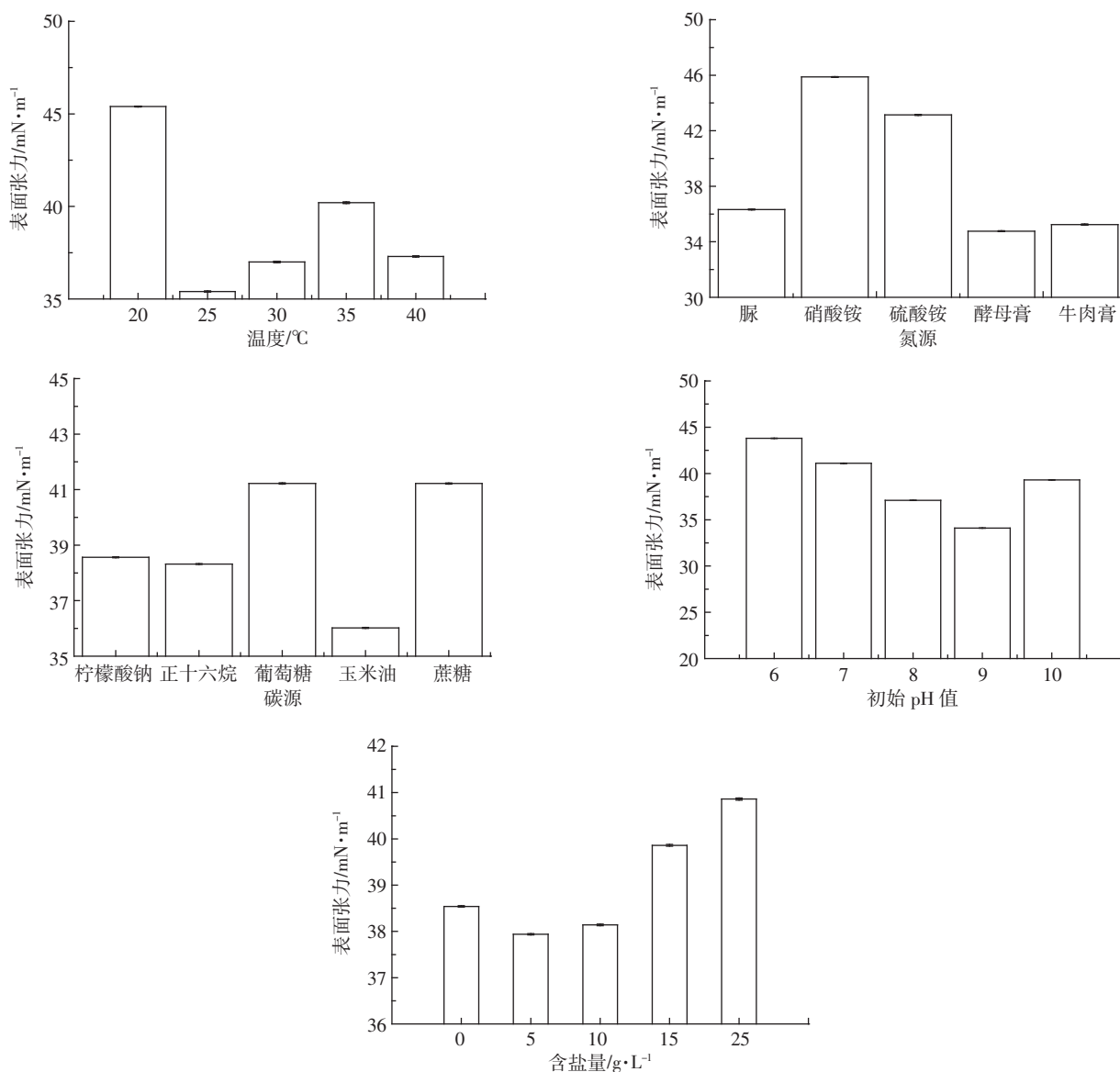


图 3 MZ01 产表面活性剂条件优化实验结果

Figure 3 Biosurfactant-producing conditions of strain MZ01

为具有较好的表面活性。目前可知,化学表面活性剂的 CMC 一般都在 $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上,可将水的表面张力降至 $35 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$,例如十二烷基磺酸钠的 CMC 值为 $2.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,常温下可将水的表面张力降至 $37 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 。有些生物表面活性剂的表面性能比应用多年的化学合成的表面活性剂效果要好很多,如鼠李糖脂的乳化性能非常好,其性能超过了化学合成的乳化剂 Tween,CMC 在 $0.005 \sim 0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间,常温下可将水的表面张力降至 $25 \sim 32 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 之间^[13]。图 4 通过测定不同表面活性剂浓度下的表面张力得到方程(1)和(2),根据方程计算得到该表面活性剂的 CMC 值为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,常温下 MZ01 产生的该生物表面活性剂可将水的表面张力由 $72 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 降至 $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 以下。由此可知,菌株 MZ01 发酵 3 d 产生的表面活性剂具有很好的表面活性,且具有一定的应用价值。

$$Y=63.52-335.31X \quad (1)$$

$$Y=29.96-1.67X \quad (2)$$

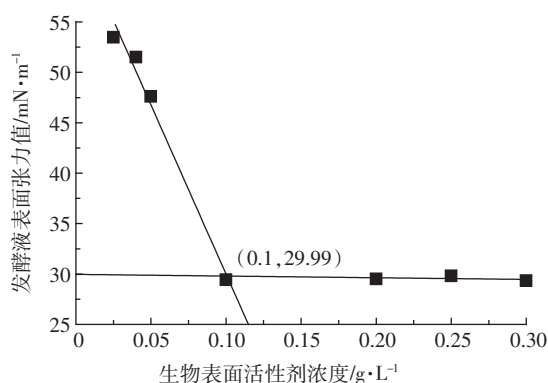


图 4 菌株 MZ01 3d 发酵产物的 CMC 值

Figure 4 The critical micelle concentration(CMC) of biosurfactants produced by strain MZ01 in 3 d fermentation

3 结论

(1)从石油污染的土壤中筛选得到一株可高效产生物表面活性剂并降解原油的菌株 MZ01,经分离纯化鉴定为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。

(2)利用菌株 MZ01 降解原油,其 9 d 可将初始含油量为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的原油降解约 54.7%。

(3)对菌株 MZ01 产表面活性剂的发酵条件进行优化,其最佳发酵条件为:酵母膏作为氮源、玉米油为碳源,温度为 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$,初始 pH 值为 9.0,含盐量为 5%。发酵 3 d 表面活性剂的产量为 $2.27 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,其 CMC 值为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,可将水的表面张力由 $72 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 降至 $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] Thevanayagam S, Member A S C E, Rishindran T, et al. Injection of nutrients and teas in clayey soil using electrokinetics[J]. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 1998, 4:330-338.
- [2] 贾群超,郭楚玲,卢桂宁,等.两株稠油高效降解菌的筛选鉴定及其降解性能的研究[J]. *环境工程学报*, 2011, 5(5):1181-1186.
Jia Q C, Guo C L, Lu G N, et al. Isolation and identification of two strains efficiently degrading heavy oil and their degradation characteristics[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2011, 5(5):1181-1186.
- [3] Lukas Y, Lei S, Hauke H. Electro-bioremediation of hydrophobic organic soil-contaminants: A review of fundamental interactions[J]. *Electrochimica Acta*, 2007, 52:3341-3448.
- [4] 李艳艳.产表面活性剂耐盐微生物对石油降解作用效果及影响因素研究[D].青岛:中国海洋大学,2012.
Li Y Y. Studies on the oil-degradation effect and influencing factors of surfactant producing salt microorganism[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.
- [5] Yu Y L, Xi L Z, Bing L. Influence of biosurfactant on the diesel oil remediation in soil-water system[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2006, 3(18):587-590.
- [6] Harry J T, Joseph B H, Michelle T J. Effect of surfactant addition on phenanthrene biodegradation in sediments[J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 1995, 8(3):228-230.
- [7] Jadhav M, Anuradha K, Sheetal J, et al. Isolation, characterization, and antifungal application of a biosurfactant produced by *Enterobacter* sp. MS16[J]. *European Journal of Lipid Science & Technology*, 2011, 113(11):1347-1356.
- [8] García-Junco M, Olmedo E D, Ortega-Calvo J J. Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid (NAPL)-dissolved phenanthrene to the biosurfactant producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19S[J]. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(4):561-569.
- [9] Avramova T, Sotirova A, Galabova D, et al. Effect of Triton X-100 and rhamnolipid PS-17 on the mineralization of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. cells[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, 62:415-420.
- [10] Zhang H Z, Long X W, Sha R Y, et al. Biotreatment of oily wastewater by rhamnolipids in aerated active sludge system[J]. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 2009, 10(11):852-859.
- [11] Mnif S. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(3):525-536.
- [12] Al-Bahry S N, Al-Wahaibi Y M, Elshafiea A E, et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012, 81:1-6.
- [13] 张天胜.生物表面活性剂及其应用[M].北京:化学工业出版社,2005.
Zhang T S. Biosurfactants and its applications[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.

- [14] Chinmay H, Debasree K, Payal G, et al. Screening and identification of *Pseudomonas aeruginosa* AB4 for improved production, characterization and application of a glycolipid biosurfactant using low-cost agro-based raw materials[J]. *Journal of Chemtechnol & Biotechnol*, 2011, 86: 185–198.
- [15] Amin G A. A potent biosurfactant producing bacteria strain for application in enhanced oil recovery applications[J]. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 2010, 1: 104.
- [16] Satpute S K, Bhavsar B D, Dhakephalkar P K, et al. Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria[J]. *Indian Journal of Marine Sciences*, 2008, 37: 243–250.
- [17] 梁艳玲, 骆永明, 刘五星, 等. 生物表面活性剂产生菌的筛选及其发酵条件的初步优化[J]. 土壤, 2009(2): 243–247.
- Liang Y L, Luo Y M, Liu W X, et al. Screening and primary optimizing of cultural medium of biosurfactant production strain[J]. *Soils*, 2009(2): 243–247.
- [18] 陈来琳. 高效石油降解菌的筛选及表面活性剂对其亲脂性和降解能力的影响[D]. 广州: 华南理工大学, 2011.
- Chen L L. Isolation and screening of efficient petroleum hydrocarbon-degrading bacteria and effect of biosurfactants on cell hydrophobicity and biodegradability[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011.
- [19] 徐恒刚, 姚秀清, 李 倩, 等. 两种高效原油降解菌降解率测定方法的对比研究[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(9): 43–44.
- Xu H G, Yao X Q, Li Q, et al. The contrast study on two methods for degradation rate of crude oil by high efficient degradation bacteria[J]. *Chemical and Bioengineering*, 2006, 23(9): 43–44.
- [20] Thenmozhi R, et al. Evaluation of aromatic and polycyclic hydrocarbon degrading abilities of selected bacterial isolates[J]. *Journal Microbiology Research*, 2012, 3(2): 445–449.
- [21] 李宝明, 阮志勇, 姜瑞波. 石油降解菌的筛选、鉴定及菌群构建[J]. 中国土壤与肥力, 2007, 3: 68–72.
- Li B M, Ruan Z Y, Jiang R B. Screening and identification of oil degrading bacteria and community construction[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2007, 3: 68–72.
- [22] Sugiura K, Ishihara M, Schimauchi T, et al. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil[J]. *Environmental Science and Technology*, 1997, 31(1): 45–51.
- [23] 张 娜. 产生物表面活性剂的石油降解菌的筛选及其特性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- Zhang N. Studies on the isolation of oil-degrading bacteria with biosurfactant production and their characteristics[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [24] Borjana K T, George R I, Nelly E C. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain[J]. *Z Naturforsch*, 2002, 57(c): 356–360.
- [25] Itoh S, Suzuki T. Fructose-lipids of arthrobacter, corynebacteria, nocardia and mycobacteria grown on fructose[J]. *Biological Chemistry*, 1974, 38: 1443–1449.
- [26] Mulligan C N, Gibbs B F. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55: 3016–3019.
- [27] Copper D G, Macdonald C R, Duff S J B, et al. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal additions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 42: 408–412.
- [28] Desai J D, Banat L M. Microbial production of surfactant and their commercial potential[J]. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 1997, 3: 47–64.
- [29] Ghosvandi H F, Mehranian M V, Radmehr M, et al. Isolation of thermotolerant, halotolerant, facultative biosurfactant-producing bacteria[J]. *Applied Microbial & Biotechnology*, 2008, 80(6): 1073–1085.
- [30] Yin H, Qiang Y, Jia Y, et al. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil containing wastewater[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44: 302–308.