

## 一株糖脂表面活性剂产生菌的筛选及干酪根降解

李德雨 商奥 张迪 江海龙 王文星\*

(东北大学生命科学与健康学院 辽宁 沈阳 110819)

**摘要:**【目的】从油页岩环境中筛选可降解油页岩干酪根的产生生物表面活性剂菌株。【方法】从抚顺油页岩矿废水样品中用血平板法初筛,排油圈法、乳化法和表面张力法复筛,获得产生生物表面活性剂菌株。对目标菌株进行生理生化鉴定、16S rRNA 基因序列和系统发育分析,用薄层色谱鉴定其发酵液表面活性成分,优化产表面活性剂的培养条件,初步考察其对油页岩干酪根的降解能力。【结果】筛选到一株产糖脂表面活性剂菌株 B-1,初步鉴定为 *Pseudomonas* sp., 该菌株有良好的排油和乳化能力以及较低的表面张力,可利用烷烃、不饱和脂肪酸和糖类作为碳源。在 30–34 °C 范围内添加 0.3% NaCl 的葡萄糖培养基(pH 7.0)中该菌生长旺盛,发酵液表面张力最低为 27 mN/m。菌株 B-1 在添加一定量葡萄糖的无机盐培养基中作用 30 d 后对干酪根的降解率为 2.85%,高于不添加葡萄糖无机盐培养基对照组的降解率(1.04%)。【结论】菌株 B-1 是一株性能良好的产糖脂表面活性剂细菌,有降解干酪根的潜力。

**关键词:** 产糖脂表面活性剂菌, 筛选, 油页岩, 干酪根, 生物降解

## Screening of a glycolipid biosurfactant-producing strain for kerogen biodegradation

LI De-Yu SHANG Ao ZHANG Di JIANG Hai-Long WANG Wen-Xing\*

(College of Life & Health Sciences, Northeastern University, Shenyang, Liaoning 110819, China)

**Abstract:** [Objective] Biosurfactant-producing strains were screened from an oil-shale environment for the biodegradation of kerogen in oil shale. [Methods] Wastewater samples of the Fushun oil-shale mine were collected and used for the primary screening of biosurfactant-producing strains using the blood-agar plate method. Oil spreading, emulsification activity, and surface tension methods were further used to re-screen the biosurfactant-producing strains. The target strain was identified by 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis, as well as by determining its physiological and biochemical characteristics. Surface-active components in the zymotic fluid of the target strain were analyzed by thin-layer chromatography. The culture conditions were optimized for biosurfactant production by the target strain, and its biodegradation of oil-shale kerogen was

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 51204055); National College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (No. 160096)

\*Corresponding author: Tel: 86-24-83656098; E-mail: wangwenxing@mail.neu.edu.cn

Received: January 21, 2017; Accepted: May 26, 2017; Published online (www.cnki.net): June 26, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 51204055); 国家级大学生创新创业训练计划项目(No. 160096)

\*通讯作者: Tel: 86-24-83656098; E-mail: wangwenxing@mail.neu.edu.cn

收稿日期: 2017-01-21; 接受日期: 2017-05-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-06-26

examined preliminarily. **[Results]** A glycolipid biosurfactant-producing strain, B-1, was screened and identified preliminarily as a *Pseudomonas* sp., and it showed the advantages of good oil displacement and emulsifying ability, and low surface tension. Strain B-1 used alkanes, unsaturated fatty acids, and carbohydrates as carbon sources. In a glucose-containing culture medium (pH 7.0) with 0.3% NaCl, strain B-1 grew well at 30–34 °C, and the surface tension of the zymotic fluid exhibited its lowest value (27 mN/m). After 30 d, the kerogen degradation rate of strain B-1 in the glucose-containing medium was 2.85%, compared with 1.04% in a control medium without glucose. **[Conclusion]** Strain B-1 is a good glycolipid biosurfactant-producing bacterium with the potential to degrade kerogen.

**Keywords:** Biosurfactant-producing strain, Screening, Oil shale, Kerogen, Biodegradation

油页岩是一种高灰分的含可燃有机质的沉积岩, 经低温干馏可获得页岩油, 其资源丰富和开发利用的可行性被列为 21 世纪的重要接替能源<sup>[1]</sup>。它是由有机质和无机质组成的极其复杂的化合物, 其中有机质主要以三维网状结构的干酪根形式存在, 主要由 C、H、O、N 和 S 等元素组成<sup>[2]</sup>。与其它高分子有机物如树脂、沥青和多环芳烃等相比较, 干酪根的成分和结构更复杂、更难被降解, 常通过高温热解使其降解成沥青、油、气和残渣, 但存在能耗高、环境污染等局限性。近些年一些学者开始用微生物来降解油页岩有机质, 然而相关报道不多, 涉及的菌种也有限。1997 年, Krumholz 等首次报道了油页岩内有机质可以成为细菌的主要能量来源<sup>[3]</sup>。此后的研究表明不动杆菌、假单胞菌、脱氯单胞菌、丛毛单胞菌和芽孢杆菌等微生物能利用油页岩中有机质作为唯一的碳源和能源<sup>[4-5]</sup>。Permanyer 等研究表明在合适的条件下微生物可将油页岩中大分子有机物分解为小分子有机物<sup>[6]</sup>。Haddadin 等研究表明产生物表面活性剂菌 (*Rhodococcus erythropolis* 和 *Rhodococcus ruber*) 能够降解油页岩中有机物, 最高页岩油提取率可达 26%, 其原因可能是由于这两株菌所产生的生物表面活性剂改变了有机质表面的憎水性质, 促进有机质乳化, 从而有利于有机质的降解<sup>[7]</sup>。这反映出产生物表面活性剂菌具有降解干酪根的潜力。此类菌能够产生集亲水基和憎水基于一体的生物表面活性剂产物, 其产物主要分为糖脂类、脂多肽和脂蛋白类、磷脂和脂肪酸类、聚合表面活性剂类、微粒表面活性剂类等

5 大类, 通常具有低毒性、高生物降解性、高发泡能力、高选择性等优越性<sup>[8]</sup>。

基于此, 本研究从抚顺油页岩矿废水中筛选到一株高效产生物表面活性剂的菌株, 对其分子生物学和生理生化特性进行鉴定, 考察碳源、温度、初始 pH 和盐浓度对其生长及发酵液表面张力的影响, 并初步用于油页岩干酪根的降解, 这为筛选菌株的功能基因改造以及油页岩有机质的生物利用奠定理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品来源与采集

样品采自辽宁抚顺西露天矿的油页岩样品及其废水样品。

### 1.2 培养基

无机盐培养基(g/L): 硝酸铵 0.50, 磷酸二氢钾 1.00, 磷酸氢二钠 1.00, 硫酸镁 0.02, 添加微量元素溶液 0.50 mL。微量元素溶液(g/100 mL): 硫酸锌 0.029, 氯化钙 0.024, 硫酸铜 0.025, 硫酸镁 0.017。

富集培养基: 在无机盐培养基上添加 1% 无菌石蜡, pH 7.0–7.2。

牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, pH 7.0–7.2。

葡萄糖培养基: 在无机盐培养基中添加 0.5 g/L 葡萄糖, pH 7.0–7.2。

橄榄油培养基: 在无机盐培养基上添加 1% 无菌橄榄油, pH 7.0–7.2。

正十六烷培养基: 在无机盐培养基上添加 1% 无菌正十六烷, pH 7.0–7.2。

复筛培养基和石蜡培养基: 同富集培养基。

### 1.3 主要试剂和仪器

血平板培养基, 广东环凯微生物科技有限公司; 细菌微量生化反应管, 杭州滨和微生物试剂有限公司; BZY-2 全自动表面/界面张力仪, 上海平轩科学仪器有限公司。

### 1.4 产生物表面活性剂菌的富集与初筛

将 5 mL 废水样品置于 100 mL 的液体富集培养基中, 30 °C、170 r/min 恒温振荡培养 10 d。以此瓶中的培养菌液为菌种, 在相同条件下进行二次转接。取不同稀释度于血平板培养基上进行涂布分离, 选择溶血圈大且透明的菌株进一步划线纯化, 共得到 13 株菌。

### 1.5 产生物表面活性剂菌的复筛

将 13 株菌的种子液以 2% 的接种量接种到复筛培养基中, 30 °C、170 r/min 振荡培养 10 d。排油圈直径测定: 将发酵液 3 500 r/min 离心 20 min, 取上清液用 0.22 μm 微孔过滤器过滤后备用。取直径 9 cm 的培养皿, 加入含品红的蒸馏水, 向水面滴加 0.4 mL 柴油形成油膜。在油膜中心滴加 20 μL 发酵上清液, 稳定后测定发酵液能够排开油圈的直径即排油圈直径, 每个样品重复 3 次, 保留直径 >3 cm 的菌株。乳化性能测定: 将直径 >3 cm 菌株的发酵上清液的乳化活性按下述方法进行测定。3 mL 柴油与 3 mL 发酵上清液在涡旋振荡仪上强力振荡 2 min, 然后静置 24 h。乳化活性是按照乳化层的高度占整个液体高度的百分比来计算的。表面张力测定: 将直径 >3 cm 菌株的发酵上清液用 BZY-2 全自动表面/界面张力仪进行表面张力测定。以纯水检测表面张力读数的有效性。以复筛培养基作为阴性对照, 每个样品重复 3 次。

### 1.6 菌株的鉴定

菌落观察: 将待测菌株划线接种于牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 30 °C 培养 3 d 后观察菌落形态。

菌株的生理生化鉴定: 采用细菌微量生化反应管进行相关生理生化指标鉴定。

菌株的分子生物学鉴定: 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株的基因组 DNA, 以细菌通用引物扩增目的菌株的 16S rRNA 基因片段, 正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'。PCR 反应体系: dNTPs Mixture (2.5 mmol/L) 4 μL, 正反向引物(10 μmol/L)各 1 μL, *Taq* 缓冲液(含 25 mmol/L Mg<sup>2+</sup>) 5 μL, TaKaRa *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL, DNA 模板 1.0 μL, 用无菌水补足体系至 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。经测序后, 提交到 NCBI 的 GenBank 数据库, 进行 BLAST 序列比对, 将与之同源性较高的 16S rRNA 基因序列进行 ClustalX 多重序列比对, 使用 MEGA 4.0 软件进行 Bootstrap 分析, 重复 1 000 次, 用 *p*-distance 核酸模型构建系统发育树。

### 1.7 生物表面活性剂的提取及薄层色谱(TLC)鉴定

将发酵液于 10 000 r/min 离心 30 min 去除菌体。将上清液用 6 mol/L 浓 HCl 调 pH 至 2.0, 4 °C 静置过夜, 用等体积的乙酸乙酯进行萃取, 萃取 3 次, 合并有机相, 于 44 °C 旋转蒸发得到棕褐色粘稠状固体。将所得表面活性剂进行薄层色谱, 用氯仿:甲醇:水=65:15:2 (体积比)作为展层剂, 待展层剂上升到距离顶端 1 cm 左右的时候取出层析板, 干燥后喷上显色剂(苯酚-硫酸试剂: 3 g 苯酚+5 mL 浓硫酸溶于 95 mL 乙醇中) 95 °C 烘烤 10 min, 观察显色结果, 根据显色斑点计算 R<sub>f</sub> 值。同时以不产表面活性剂菌(金黄色葡萄球菌和大肠杆菌)的发酵液作为负对照处理。

### 1.8 不同碳源培养基对菌株生长和表面张力的影响

将待测菌株种子液以 2% 接种量分别接种于牛肉膏蛋白胨培养基、葡萄糖培养基、橄榄油培养基中, 30 °C、170 r/min 振荡培养 3 d, 而在正十六烷培养基和石蜡培养基中相同条件下培养 10 d。取

各发酵液,用紫外可见分光光度计在 600 nm 处测定吸光值,以  $OD_{600}$  表示菌体浓度。再用 1.5 中方法测定各发酵液的表面张力值。实验重复 3 次。

### 1.9 初始 pH 对菌株生长和表面张力的影响

将葡萄糖培养基的初始 pH 分别设置为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,待测菌株种子液的接种量为 2%,30 °C、170 r/min 振荡培养 3 d。以不加菌的发酵液作为对照,测定各发酵液的  $OD_{600}$  和表面张力值。实验重复 3 次。

### 1.10 培养温度对菌株生长和表面张力的影响

将培养温度分别设置为 25、30、34、37 °C,将 2%待测菌株种子液接种于葡萄糖培养基中,170 r/min 振荡培养 3 d。以不加菌的发酵液作为对照,测定各发酵液的  $OD_{600}$  和表面张力值。实验重复 3 次。

### 1.11 NaCl 浓度对菌株生长和表面张力的影响

向葡萄糖培养基中分别添加 0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、0.9% (质量体积比)的 NaCl,将 2%待测菌株种子液接种于葡萄糖培养基中,30 °C、170 r/min 振荡培养 3 d。以不加菌的发酵液作为对照,按照上面方法测定各发酵液的  $OD_{600}$  和表面张力值。实验重复 3 次。

### 1.12 油页岩干酪根的初步降解

采用 GB/T 19144-2010 (沉积岩中干酪根分离方法)从油页岩样品中制备有机质干酪根。

称取 5.0 g 无菌干酪根分别加入到 100 mL 的无机盐培养基或葡萄糖培养基中,再分别接种菌株

B-1 种子液,在 30 °C、170 r/min 振荡培养 30 d 后,取出过滤,降解残渣在 50 °C 下烘干,称重。以加干酪根、不加菌的培养液作为对照,处理方式同干酪根样品。以上实验均设 3 次重复。

$$\eta = [(M_0 - M_1) - (M_0 - M_2)] / M_0 \times 100\% \quad (1)$$

$M_0$  为干酪根的初始质量, g;  $M_1$  为 30 d 后样品干酪根质量, g;  $M_2$  为 30 d 后对照干酪根质量, g;  $\eta$  为干酪根降解率, %。

用稀释平板法测定细菌生长量,以菌落形成单位(CFU)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 产生物表面活性剂菌株的筛选

从抚顺油页岩矿废水样品中,经富集培养、血平板初筛分离,获得 13 株菌。将 13 株菌的发酵上清液用排油圈法、表面张力测定法和乳化法进行复筛,得到 3 株排油圈直径 > 3 cm 的菌株(表 1)。在这 3 株菌中, B-1 的排油圈直径最大,其直径可达 5 cm (图 1A),表面张力最低,乳化效果最好(图 1B),因此选择菌株 B-1 用于后续研究。

表 1 待测菌株的溶血圈、排油能力、乳化活性和表面张力

Table 1 Hemolytic zones, oil spreading zones, emulsifying activity and surface tension of the tested strains				
菌株 Strains	溶血圈 Hemolytic zones (cm)	排油圈 Oil spreading zones (cm)	乳化活性 Emulsifying activity (%)	表面张力 Surface tension (mN/m)
B-1	3.5±0.3	5.2±0.2	56.0±1.1	31.58±0.16
B-3	2.6±0.4	3.3±0.3	14.0±1.2	38.61±0.07
B-10	2.5±0.7	3.2±0.5	0	45.20±0.11

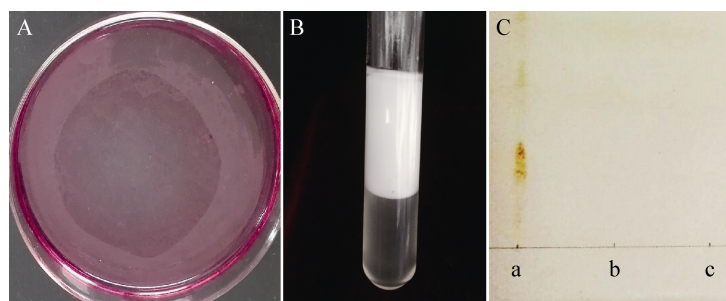


图 1 菌株 B-1 发酵液的排油能力(A)、乳化能力(B)和 TLC 显色(C)

Figure 1 Oil spreading ability (A) and emulsifying activity (B) and TLC result (C) of strain B-1 fermentation liquid

Note: a: Strain B-1; b: *Staphylococcus aureus*; c: *Escherichia coli*.

## 2.2 生物表面活性剂的 TLC 鉴定

从菌株 B-1 发酵液提取并纯化后的生物表面活性剂为棕褐色粘稠状固体,有良好的水溶性。此表面活性剂提取物经 TLC 展层后,用苯酚-浓  $H_2SO_4$  试剂显色,有 2 个棕色斑点(图 1C),  $R_{f1}=0.27$ ,  $R_{f2}=0.40$ , 负对照菌株(金黄色葡萄球菌和大肠杆菌)发酵液均未见有显色斑点(图 1C), 初步表明菌株 B-1 产生的是糖脂类表面活性剂。

## 2.3 菌株鉴定

**2.3.1 生理生化特征:** 在 LB 平板上 30 °C 培养 3 d 后,观察菌株 B-1 菌落形态,菌体隆起呈圆形,表面光滑湿润有光泽,边缘整齐,乳白色不透明,颜色均一易挑取。发酵液颜色为绿色,有姜花气味。经革兰氏染色,菌株 B-1 为革兰氏阴性细菌,呈球杆状。该菌氧化酶、精氨酸双水解酶和甲基红呈阳性,能利用葡萄糖、果糖、乳糖和柠檬酸盐,能液化明胶,分解尿素和还原硝酸盐,吲哚和 V-P 实验阴性,不产生  $H_2S$ 。

**2.3.2 菌株的分子生物学鉴定:** 测序得到菌株 B-1

的 16S rRNA 基因序列,含有 1 430 bp,与 GenBank 中的序列进行比对,表明 B-1 与假单胞菌属(*Pseudomonas*)成员具有较高的序列相似性。以此为根据选择 9 株 *Pseudomonas* 属菌株, *Lactobacillus pentosus* KF923751.1 菌株作为外群构建系统发育树(图 2),表明 B-1 与 *Pseudomonas aeruginosa* KF20849.1 种亲缘关系密切,序列相似性达到 99%。再结合形态学特征、生理生化特性,将菌株 B-1 初步鉴定为 *Pseudomonas* sp.。

## 2.4 不同碳源培养基的影响

由图 3 可知,菌株 B-1 既可在水性培养基(牛肉膏蛋白胨培养基和葡萄糖培养基)中良好生长,也能在油性培养基(十六烷、石蜡和橄榄油培养基)中良好生长,同时表面张力均低,但是在饱和烷烃培养基中生长需要 10 d 才能达到与水性培养基中 3 d 的生长水平。该菌在富含不饱和脂肪酸的橄榄油培养基中生长最旺盛,表面张力值达到 29.58 mN/m,在葡萄糖培养基中表面张力值最低为 28.24 mN/m。因此,综合经济成本考虑后选用葡萄糖培养基进行后续研究。

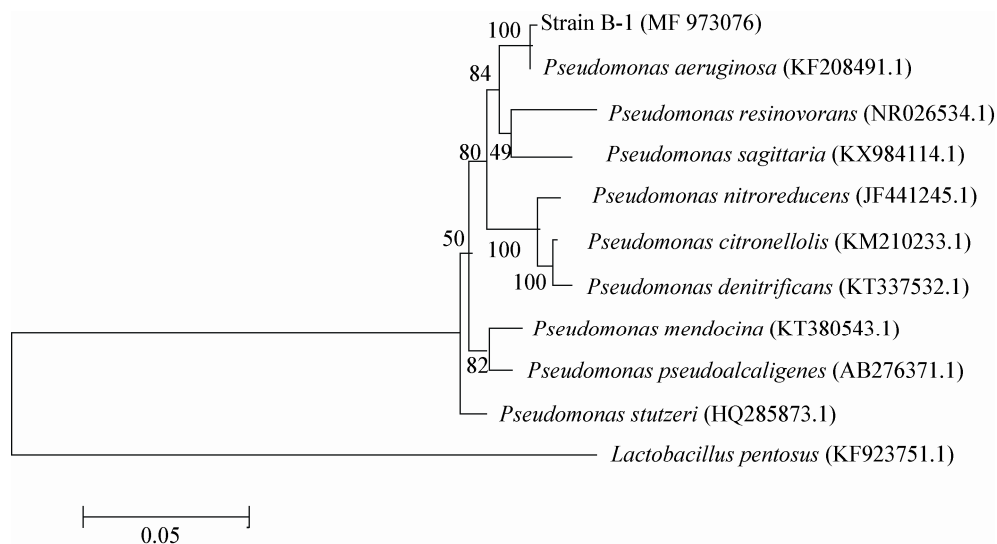


图 2 菌株 B-1 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

Figure 2 Phylogenetic analysis of strain B-1 based on 16S rRNA gene sequences

注: 括号中序号为参照菌株在 GenBank 中的登录号; 分支点上的数字表示置信度; 比例尺表示碱基替换率, 0.05 表示 5% 的替换率。  
Note: The sequence numbers in parentheses correspond to the GenBank accession numbers of the reference strains; The numbers at branch points represent confidence level; The bar scale indicates the rate of substitution per base, 0.05 represents a replacement rate of 5%.



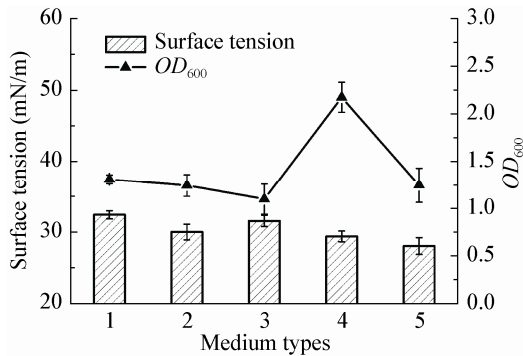


图3 不同碳源培养基对菌株 B-1 的生长和表面张力的影响

Figure 3 Effect of media with different carbon sources on the growth of strain B-1 and the surface tension of the fermentation liquid

注: 1: 牛肉膏蛋白胨培养基; 2: 十六烷培养基; 3: 石蜡培养基; 4: 橄榄油培养基; 5: 葡萄糖培养基。

Note: 1: Beef extract peptone medium; 2: Mineral medium with hexadecane; 3: Mineral medium with paraffin; 4: Mineral medium with olive oil; 5: Mineral medium with glucose.

## 2.5 初始 pH 的影响

由图 4 可知, 菌株 B-1 在 pH 5.0–9.0 范围内随着初始 pH 的升高, 菌浓度  $OD_{600}$  也随之明显增大, 但是其表面张力却先下降后略升高, 在 pH 7.0 时表面张力达到最低 27.95 mN/m。从图 4 还看出, 相较表面张力而言, 培养基初始 pH 对菌株生长影响更大, 中性或偏碱的条件有利于该菌株的生长。综合考虑, pH 7.0 是较为适宜的培养基初始 pH。

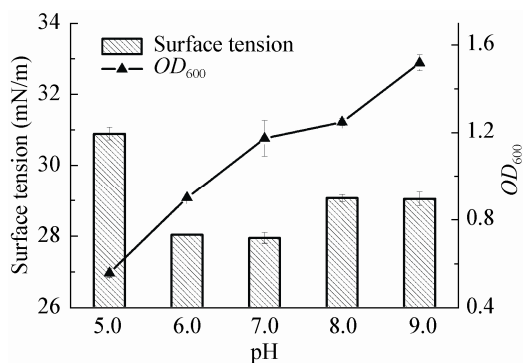


图4 初始 pH 对菌株 B-1 的生长和表面张力的影响  
Figure 4 Effect of the initial pH on the growth of strain B-1 and the surface tension of the fermentation liquid

## 2.6 培养温度的影响

由图 5 可知, 培养温度对菌株 B-1 的生长和表面张力都有较大的影响。随着培养温度从 25 °C 上升到 37 °C, 菌株 B-1 的菌浓度先急剧增加, 经过 30–34 °C 的平台期后又急剧下降; 而其表面张力正好相反。因此, 培养温度在 30–34 °C 之间菌体生长良好, 表面张力较低。

## 2.7 NaCl 浓度的影响

由图 6 可知, NaCl 浓度从 0.1% 增加到 0.3% 时, 菌株 B-1 的菌浓度增大, 表面张力降至最低; 0.3%–0.9% 范围内对菌株 B-1 的生长和表面张力的影响不明显, 菌浓度略有减小, 表面张力几乎不再变化。因此, 0.3% 是较为适宜的 NaCl 浓度。

## 2.8 油页岩干酪根的降解

由图 7 可知, 菌株 B-1 在葡萄糖(含干酪根的葡萄糖无机盐培养基)中的降解率为 2.85%, 在

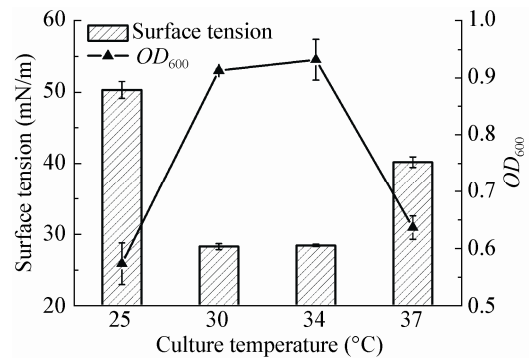


图5 培养温度对菌株 B-1 的生长和表面张力的影响  
Figure 5 Effect of culture temperature on the growth of strain B-1 and the surface tension of the fermentation liquid

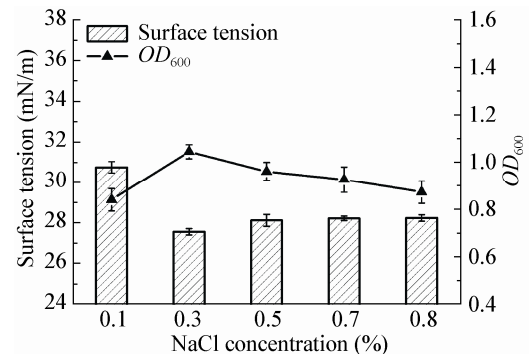


图6 NaCl 浓度对菌株 B-1 的生长和表面张力的影响  
Figure 6 Effect of NaCl concentration on the growth of strain B-1 and the surface tension of the fermentation liquid

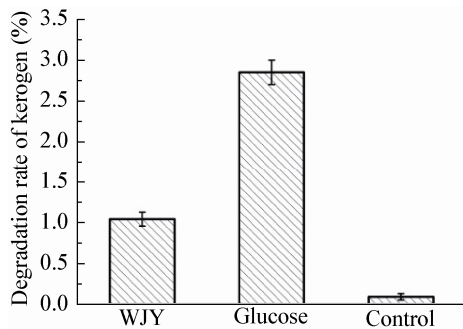


图 7 菌株 B-1 对油页岩干酪根的生物降解

Figure 7 Biodegradation of oil-shale kerogen by strain B-1

注: WJY: 含菌株 B-1 和干酪根的无机盐培养基; Glucose: 含菌株 B-1、干酪根和葡萄糖的无机盐培养基; Control: 不含菌株 B-1 但含干酪根的无机盐培养基。

Note: WJY: Mineral medium with kerogen and B-1; Glucose: Mineral medium with kerogen and glucose and B-1; Control: Mineral medium with kerogen and without B-1 strain.

WJY (含干酪根的无机盐培养基)中的降解率为 1.04%，说明葡萄糖的添加有助于干酪根的降解。由对照可知，干酪根自身降解率极低，因而对实验结果的影响很小。尽管菌株 B-1 对干酪根有一定的降解作用，但是两种情况下经过 30 d 的降解率都不高，这一初步尝试为进一步研究奠定了基础。

### 3 讨论

在菌种筛选过程中，选择合适的培养基是有效而快速获得目标菌种的首要考虑因素之一。血平板培养基常用来筛选产生物表面活性剂菌，其原理是微生物能使血平板培养基中的红细胞发生溶血现象，产生肉眼可见的溶血圈，依据溶血圈与菌落的直径比来判断菌株产生物表面活性剂的潜在能力。尽管此法方便快捷，但是某些溶血酶产生菌可能造成假阳性，因此，需要进一步测定发酵液的排油活性及表面张力来弥补单纯用血平板法筛选的局限性<sup>[9]</sup>。本研究通过血平板法初筛获得有较大溶血圈的菌株 13 株，再结合排油圈法、乳化活性和表面张力筛选到一株溶血圈和排油圈直径均>3 cm，而且其发酵液的乳化活性好和表面张力低于 30 mN/m 的菌株 B-1。此结果显示用血平

板法筛选产生物表面活性剂菌存在较大比例的假阳性，在此筛选过程中，排油圈法与表面张力法的结果有较好的一致性，能更准确地反映微生物产生物表面活性剂的能力。因此，血平板法适合快速大量地筛选产生物表面活性剂的可能菌株，初筛后需要进一步结合排油圈法和表面张力法才能获得更为准确的筛选结果。

本研究筛选到的菌株 B-1 是一株产糖脂表面活性剂的假单胞菌，可使发酵液的表面张力降低至 27 mN/m，表明有较好的产生物表面活性剂的能力。菌株 B-1 既可利用水溶性碳源，也能利用非水溶性碳源。相比来说，在葡萄糖作为碳源的无机盐培养基中该菌株发酵液的表面张力值最低，间接反映出生物表面活性剂产量最高。有文献报道铜绿假单胞菌利用液体石蜡产生鼠李糖脂，利用十六烷培养基可分离出类蛋白活化剂，利用固液混合石蜡产生的表面活性剂是含有多种氨基酸和不同碳链长度脂肪酸组成的混合物<sup>[10]</sup>。可见，碳源对于假单胞菌所产表面活性剂的类型和产量有着重要影响。过低和过高的发酵温度都不利于 B-1 菌的生长和产生物表面活性剂，在 30–34 °C 之间较为适宜。尽管该菌在 pH 5.0–9.0 之间会随着 pH 增大而菌浓度增大，但是发酵液的表面张力却在中性条件下最低。添加少量的 NaCl 有利于该菌发酵液的表面张力下降。此外，其他因素如菌龄、接种量、转速、金属离子等对该菌生物表面活性剂的产生及产量的影响还有待进一步优化。

一些假单胞菌对营养要求简单，对环境适应能力强，对多种有机物有较强的降解能力。不少文献已报道了铜绿假单胞菌能对正构烷烃<sup>[10-11]</sup>、单苯环类<sup>[12-13]</sup>、多苯环类<sup>[14-15]</sup>以及原油<sup>[10,16]</sup>等复杂大分子有机物有较好的降解能力。如铜绿假单胞菌 DQ8 能够以正构烷烃为唯一碳源和能源进行生长和代谢，4 d 内将 100 mg/L 的正四十烷烃完全降解，并且碳链越长降解速率越低<sup>[11]</sup>。铜绿假单

胞菌还可将原油中 47.0 g/kg 的正构烷烃经 120 d 作用后剩余 9.0 g/kg<sup>[10]</sup>。油页岩干酪根是油气生成的主要母质, 具有复杂的三维网状结构, 富含脂肪烃, 含较少芳烃以及少量的杂原子官能团等<sup>[2]</sup>。尽管油页岩、煤和石油三者在大结构组成上的同源性以及某些微生物在碳素循环中的特殊性决定了油页岩生物转化的可行性, 但是油页岩干酪根要比原油的成分与结构复杂得多, 因而油页岩有机质的微生物转化报道不多。本课题组在对抚顺油页岩矿细菌多样性研究时, 发现在该矿细菌群落中 *Pseudomonas* 为优势菌属<sup>[17]</sup>。在本研究中, 我们尝试用菌株 B-1 降解油页岩干酪根, 结果表明该菌株对干酪根有一定的降解作用, 经过 30 d 作用后以干酪根为唯一碳源的无机盐培养基不如添加一定量葡萄糖的无机盐培养基的降解效果好。其可能原因是葡萄糖的添加能够使该菌在较短的时间内快速生长且产生较多的生物表面活性剂, 用于乳化干酪根; 随着葡萄糖的耗尽, 足够数量菌继续利用干酪根为碳源, 这样就有助于提高干酪根的降解效率, 但是其机理还有待进一步研究。随着碳链越长, 结构越复杂, 降解速率就越低, 所以成分与结构非常复杂的干酪根则需要更长的降解时间。本实验选择 30 d 降解时间仍然太短, 还需要再延长时间。此外, 该菌株在这两种培养基中的干酪根降解效率都不高, 还需要改进其他方面如添加氮源、诱导剂或与其他菌株共培养, 以及基因工程改造等, 以便进一步提高其降解效率。

#### 4 结论

从油页岩矿废水中筛选到一株产糖脂表面活性剂的 *Pseudomonas* sp. B-1, 既能利用水溶性碳源, 也能利用非水溶性碳源, 并且表现出良好的乳化性能和相当低的表面张力, 同时具有较强的环境适应能力。菌株 B-1 对油页岩干酪根有一定的降解作用, 添加适量的葡萄糖有利于其降解干酪根, 但是现有条件下其降解率均不高。

#### 参考文献

- [1] Bungler JW, Crawford PM, Johnson HR. Is oil shale America answer to peak-oil challenge?[J]. Oil and Gas Journal, 2004, 102(30): 16-24
- [2] Han F, Li HZ, Li NY. Analysis of fushun oil shale development and utilization[J]. Journal of Jilin University (Earth Science Edition), 2006, 36(6): 915-922 (in Chinese)  
韩放, 李焕忠, 李念源. 抚顺油页岩开发利用条件分析[J]. 吉林大学学报: 地球科学版, 2006, 36(6): 915-922
- [3] Krumholz LR, Mckinley JP, Ulrich GA, et al. Confined subsurface microbial communities in Cretaceous rock[J]. Nature, 1997, 386(6620): 64-66
- [4] Petsch ST, Smernik RJ, Eglinton TI, et al. A solid state <sup>13</sup>C-NMR study of kerogen degradation during black shale weathering[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2001, 65(12): 1867-1882
- [5] Petsch ST, Edwards KJ, Eglinton TI. Microbial transformations of organic matter in black shales and implications for global biogeochemical cycles[J]. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 2005, 219(1/2): 157-170
- [6] Permyner A, Gallego JLR, Caja MA, et al. Crude oil biodegradation and environmental factors at the riutort oil shale mine, sepyrenees[J]. Journal of Petroleum Geology, 2010, 33(2): 123-139
- [7] Haddadin MSY, Arqoub AAA, Reesh IA, et al. Kinetics of hydrocarbon extraction from oil shale using biosurfactant producing bacteria[J]. Energy Conversion and Management, 2009, 50(4): 983-990
- [8] Cortés-Sánchez AJ, Hernández-Sánchez H, Jaramillo-Flores ME. Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: new trends and possible therapeutic alternatives[J]. Microbiological Research, 2013, 168(1): 22-32
- [9] Li NN, Shi RJ, Hao JS, et al. Biosurfactant-producing bacterium SQ6: Its isolation and zymotic fluid surface activity[J]. Chinese Journal of Ecology, 2010, 29(8): 1618-1623 (in Chinese)  
李娜娜, 史荣久, 郝金生, 等. 表面活性剂产生菌 SQ6: 筛选及其发酵液表面活性[J]. 生态学杂志, 2010, 29(8): 1618-1623
- [10] Das K, Mukherjee AK. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(7): 1339-1345
- [11] Zhang ZZ, Hou ZW, Yang CY, et al. Degradation of *n*-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(5): 4111-4116
- [12] Li XJ, Yao RS, Wang H, et al. The study on biodegradation of 4-chlorophenol by *Pseudomonas aeruginosa* TBPY[J]. Environmental Chemistry, 2010, 29(5): 914-918 (in Chinese)  
李晓菊, 姚日生, 王淮, 等. 铜绿假单胞菌(TBPY)降解对氯苯酚的特性[J]. 环境化学, 2010, 29(5): 914-918
- [13] Dinu LD, Matei PS, Jurcoane S, et al. Biodegradation of karathane using adapted *Pseudomonas aeruginosa* in scale up process[J]. Romanian Biotechnological Letters, 2011, 16(2): 6048-6054
- [14] Gao XL, Li ZG, Zhang D, et al. The characteristics and product



- analysis of phenanthrene and naphthalene degradation by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Northwest University (Natural Science Edition), 2012, 42(5): 777-782 (in Chinese)  
 邵香黎, 李兆格, 张丹, 等. 铜绿假单胞菌 PAO1 降解菲、萘的特性及产物分析[J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2012, 42(5): 777-782
- [15] Hatamian-Zarmi A, Shojaosadati SA, Vasheghani-Farahani E, et al. Extensive biodegradation of highly chlorinated biphenyl and aroclor 1242 by *Pseudomonas aeruginosa* TMU56 isolated from contaminated soils[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009, 63(6): 788-794
- [16] Chang H, Nie MQ, Ge BZ, et al. Effects of rhamnolipid on oil degradation by *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2013, 7(2): 771-776 (in Chinese)  
 常虹, 聂麦茜, 葛碧洲, 等. 铜绿假单胞菌 NY3 所产表面活性剂对原油降解的影响[J]. 环境工程学报, 2013, 7(2): 771-776
- [17] Jiang SY, Wang WX, Xue XX, et al. Bacterial diversity in major oil shale mines in China[J]. Fresenius Environmental Bulletin, 2015, 24(10): 3176-3188

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、微生物蛋白质组学、微生物功能基因组、微生物工程与药物等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

### 2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

### 3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

#### 3.1 参考文献

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377

Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)

王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17

Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)

沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87

Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)

刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

#### 3.2 脚注(正文首页下方)

Foundation item:

\*Corresponding author: Tel: ; Fax: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(No. )

\*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 20xx-03-31

(下转 p.2697)