

表面活性剂产生菌 SQ6: 筛选及其发酵液表面活性*

李娜娜^{1,2} 史荣久¹ 郝金生³ 韩斯琴¹ 刘晓波³ 徐 慧¹ 张 颖^{1**}

(¹ 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016; ² 中国科学院研究生院, 北京 100049; ³ 大庆油田有限责任公司第二采油厂, 黑龙江大庆 163414)

摘 要 从大庆油田油藏采出水中成功筛选获得一株表面活性剂产生菌, 编号为 SQ6, 该菌为短杆状革兰氏阴性菌。16S rRNA 基因序列比对结果显示, SQ6 与铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 序列相似性达到 99.9%; 生理生化鉴定结果进一步表明, SQ6 符合假单胞菌属特征。以葡萄糖为碳源, 24 h 内 SQ6 发酵液表面张力 (ST) 从 57.0 mN · m⁻¹ 降至 25.6 mN · m⁻¹。SQ6 发酵液在高温 (121 °C, 30 min)、高盐 (NaCl 浓度为 12%) 和广泛 pH 条件下保持较稳定的表面活性, 其临界胶束浓度 (CMC) 为 50 mg · L⁻¹。薄层层析结果显示, SQ6 发酵液表面活性成分主要为糖脂类。

关键词 油藏采出水; 表面张力; 生物表面活性剂; 16S rRNA 基因序列

中图分类号 Q939.97 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2010)8-1618-06

Biosurfactant-producing bacterium SQ6: Its isolation and zymotic fluid surface activity.

LI Na-na^{1,2}, SHI Rong-jiu¹, HAO Jin-sheng³, HAN Si-qin¹, LIU Xiao-bo³, XU Hui¹, ZHANG Ying¹ (¹ Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; ² Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³ No. 2 Oil Production Company of Daqing Oilfield Company Ltd, Daqing 163414, Heilongjiang, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(8): 1618–1623.

Abstract: A short rod shaped Gram negative surfactant-producing bacterium designated as SQ6 was isolated from the produced water from Daqing oilfield. The physiological and biochemical test showed that the SQ6 had the characteristics of *Pseudomonas*, and the 16S rRNA gene sequence analysis further indicated that the SQ6 had a similarity of 99.9% to *Pseudomonas aeruginosa*. Growing on the mineral salts medium containing 2% glucose, the SQ6 decreased the surface tension of SQ6 zymotic fluid from 57.0 to 25.6 mN · m⁻¹ within 24 hours. Under the conditions of high temperatures (121 °C for 30 min), high salinity (12% NaCl), and a wide range of pH, the SQ6 zymotic fluid could maintain a relatively stable surface activity, and its critical micelle concentration was 50 mg · L⁻¹. Thin layer chromatography (TLC) indicated that glycolipid was the main surface-active component presented in SQ6 zymotic fluid.

Key words: produced water from oil reservoir; surface tension; biosurfactant; 16S rRNA gene sequence.

表面活性剂是一类具有表/界面活性, 兼具亲水基团和疏水基团结构的两亲化合物。表面活性剂在石油工业和环境工程中应用广泛, 如提高原油采收率、重油污染土壤的生物修复等 (Harvey *et al.*, 1990; 陈坚等, 1996; 马歌丽等, 2003; Calvo *et al.*, 2009)。生物表面活性剂是由微生物合成的一些具

有表面活性的代谢产物, 如糖脂、脂肽、脂蛋白、磷脂以及中性类脂衍生物等。与化学合成的表面活性剂相比, 生物表面活性剂具有毒性低、可生物降解、生态安全、高表面活性和生理活性等优点 (王修垣等, 1982; 王芳, 1994; 赵裕蓉和王宁玲, 1996)。因此, 近年来, 环境友好的生物表面活性剂的研究、生产和使用日益受到人们的广泛关注。然而, 生物表面活性剂大多处于实验研究阶段, 还未进行大规模的生产, 只有少数产品走向市场, 这主要是由于其生产成本

* 中国科学院知识创新工程项目 (06LYQY3001) 和大庆油田有限责任公司作研究资助项目。

** 通讯作者 E-mail: yzhang@iae.ac.cn

收稿日期: 2010-01-29 接受日期: 2010-04-08

较高,大约是化学表面活性剂成本的 3~10 倍(Mulligan & Gibbs, 1993)。因此,选育生物表面活性剂高产菌株、改进发酵工艺,对于进一步研究、开发生物表面活性剂具有重要理论与实践意义。本文介绍了油田采出液中一株表面活性剂高效产生菌的筛选与初步鉴定,并对其发酵液中生物表面活性剂的主要理化特性进行了研究,以期为进一步拓展应用生物表面活性剂进行微生物驱油或生物修复奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 油田采出水与原油

用于表面活性剂产生菌筛选的油田采出水取自大庆油田水驱生产区块。油藏深度 850 m,采出液 pH 为 7.83、温度为 45 ℃、矿化度为 $4.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

原油由大庆油田有限责任公司采油二厂提供。

1.2 培养基

血平板培养基:血琼脂基础 41.0 g(天和微生物试剂有限公司,杭州),加蒸馏水 1.0 L,经 121 ℃, 15 min 灭菌待冷至 50 ℃,加入无菌脱纤维羊血 50 ml(羊血的终浓度约为 5%),pH 7.2~7.5。

完全培养基:牛肉膏 5.0 g,氯化钠 5.0 g,蛋白胨 10.0 g,pH 7.2,用蒸馏水定容至 1.0 L,固体培养基加琼脂 18.0 g。

LB 培养基:酵母膏 5.0 g,氯化钠 5.0 g,蛋白胨 10.0 g,pH 7.2~7.5,用蒸馏水定容至 1.0 L。

发酵培养基: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.410 g, KH_2PO_4 1.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.051 g, NaCl 20.0 g,微量元素液 5.0 ml,葡萄糖 20.0 g,酵母膏 0.5 g,pH 8.0,用蒸馏水定容至 1.0 L。

微量元素液: ZnSO_4 0.29 g, CuSO_4 0.25 g, CaCl_2 0.24 g,用蒸馏水定容至 1.0 L。培养基配制好后立即灭菌,备用。

1.3 实验方法

1.3.1 表面活性剂产生菌筛选模型 将油田采出液稀释后涂布于血平板培养基上,37 ℃培养 48 h,观察平板上是否出现具溶血圈的菌落。将具溶血圈的菌落挑取在新的血平板培养基上进行划线分纯,37 ℃培养 48 h,挑取具溶血圈的单菌落接种于液体 LB 培养基,150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,37 ℃振荡培养 16 h。取 3 ml 发酵液接种至装有 50 ml 发酵培养基的三角瓶(装量 250 ml)中,150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,45 ℃振荡培养 24

h,发酵液经离心后取上清备用。不同菌株的发酵液依据排油活性、表面张力测定结果进行筛选,选取排油活性好、表面张力降低幅度大的菌株进行初步菌种鉴定(生理生化特性测定结合 16S rRNA 基因序列比对分析)及发酵液表面活性评价。

1.3.2 温度、pH 及盐度对发酵液表面活性的影响评价 筛选到表面活性剂高产菌株以后,将其发酵液分别在不同温度(21 ℃、30 ℃、45 ℃、60 ℃、80 ℃、100 ℃、121 ℃)、不同 pH(2、4、6、8、10、12)、不同盐度(NaCl 浓度 0%、6%、9%、12%、15%、18%)条件下处理 30 min,然后监测发酵液表面张力的变化以初步考察菌株产生的生物表面活性剂在可能的实际环境条件下应用的活性情况。

1.3.3 排油圈直径的测定 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 4000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取一小滴上清液滴加在油膜中央,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。排油圈直径测定重复 3 次,取平均值。选取排油圈直径 >3 cm 的菌株做表面张力测定(潘冰峰等,1999;宁长发等,2004)。

1.3.4 表面张力测定 采用 BZY-1 型全自动表面张力仪(上海衡平仪器仪表厂)测定发酵上清液表面张力。

1.3.5 发酵液乳化性能测定 取等体积的发酵液与原油剧烈震荡 1 min 后,于室温条件下静置,在不同时间测定两相体积变化。

1.3.6 表面活性剂的提取与纯化 将 SQ6 的发酵液于 4000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,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 13000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,收集有机相在 45 ℃下旋转蒸发,得到的固体物质为生物表面活性剂粗品。将粗品用少量蒸馏水超声溶解后于 5000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液加入等体积的甲醇 5000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,将沉淀真空干燥,即得表面活性剂纯品。

1.3.7 表面活性剂定性分析 采用 TLC 对表面活性剂粗品进行定性分析。以氯仿/甲醇/水(70:10:0.5,V/V/V)为展开剂展开,分别采用茚三酮显色剂和萘酚显色剂对发酵液表面活性成分进行初步判别。前者显示红色指示脂肽类表面活性剂,后者显示黄色,则为糖脂类。

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

1.3.9 生物表面活性剂产生菌的 16S rRNA 基因序列分析 接种表面活性剂产生菌于液体 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养 16 ~ 18 h。取 1.5 ml 培养物, 6000 r · min⁻¹ 离心 8 min, 沉淀加入 567 μl TE 缓冲液, 吸管反复吹打使之重悬, 加 1 μl 溶菌酶, 37 °C 温育 30 min, 30 μl 10% SDS 和 3 μl 20 mg · mL⁻¹ 的蛋白酶 K, 混匀, 37 °C 温育 1 h。加入 100 μl 5 mol · L⁻¹ NaCl, 充分混匀, 再加入 80 μl CTAB/NaCl 溶液, 混匀, 65 °C 温育 10 min。加入等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1, V : V : V) 混匀, 8000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 转移上清至新管中, 加入等体积的氯仿/异戊醇, 混匀, 8000 r · min⁻¹ 离心 5 min。加入 0.6 倍体积异丙醇, 轻轻混匀。室温静置 2 h。10000 r · min⁻¹ 离心 20 min, 弃上清, 用 70% 乙醇洗涤沉淀, 室温干燥, 然后将 DNA 沉淀溶于 50 μl TE 缓冲液中, -20 °C 保存备用。

采用细菌通用引物 27f-1492r 引物对 (27f: 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492r: 5' - GGT-TACCTTGTACGACTT-3') 扩增 16S rDNA。PCR 扩增反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 总计 35 个循环。PCR 反应体系组成如下: 1 μl DNA 模板, 10×PCR 反应缓冲液 2.5 μl, dNTP 混合溶液 (每种 2.5 mmol · L⁻¹) 2 μl, 20 μmol · L⁻¹ 引物各 0.5 μl, Taq 酶 (5 U · μl⁻¹) 0.25 μl, 加灭菌去离子水至总体积为 25 μl。PCR 产物经 DNA 凝胶回收试剂盒 (TaKaRa, 大连) 纯化后, 送至 TaKaRa 公司测序。获得的 16S rRNA 基因序列信息输入 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 数据库利用 BLASTn 软件进行同源性比对分析。

2 结果和分析

2.1 菌株筛选

通过溶血圈实验从油田采出液中分离到 90 株溶血圈阳性菌。经排油活性测定, 共有 9 株细菌的排油圈直径 > 3.0 cm, 分别编号为 SQ1 ~ SQ9。表面张力测定结果显示, 菌株 SQ6 发酵液的表面张力由初始的 57.0 mN · m⁻¹ 降低到 25.6 mN · m⁻¹, 为上述 9 株细菌中降幅最大者。因此, 选择 SQ6 开展后续研究。

2.2 菌落形态观察、生理生化与 16S rRNA 基因序列

SQ6 在完全培养基上的菌落表面皱褶, 边缘呈锯齿状, 产色素。扫描电镜照片显示 SQ6 为杆状, 大小约 1.1 × 0.3 μm (图 1)。SQ6 为革兰氏阴性菌, 不产芽孢, 氧化酶与接触酶反应阳性; 能使精氨酸水解, 明胶液化试验阳性; 不能利用柠檬酸盐, 硝酸盐还原反应阳性, MR 反应阳性, VP 反应阴性。将菌株 SQ6 的 16S rRNA 基因测序结果与 Genbank 中现有菌种的 16S rRNA 基因序列进行比对, 表明 SQ6 与铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 的同源性最高 (99.9%)。在本研究开展的生理生化指标测定中, SQ6 与铜绿假单胞菌两者之间无差异。因此, 初步判定 SQ6 是铜绿假单胞菌。当然, 为了更准确了解 SQ6 的分类地位, 需要实施进一步的实验进行确证, 如 DNA 杂交等。

2.3 发酵液的表面张力与生长

由图 2 可见, 0 ~ 24 h, OD₆₀₀ 值随培养时间的延长而迅速上升, 此时 SQ6 处于对数生长期, 表面张力随 OD 值的升高而降低。24 ~ 30 h 为稳定期, OD₆₀₀ 值变化不大, 表面张力保持稳定且活性最佳。30 h 之后, OD₆₀₀ 值开始下降, 表明该菌开始进入衰亡期, 表面张力也相应的升高, 可能因为营养物质不足, 一部分表面活性剂被利用。从图 2 可以看出, 24 h 菌体处于稳定前期, OD₆₀₀ 值较大, 而且表面张力最小, 因此发酵培养采用 24 h。

2.4 温度、pH 及 NaCl 浓度对发酵液表面活性的影响

2.4.1 温度对发酵液表面活性的影响 如表 1 所示, 温度对 SQ6 发酵液表面张力影响不大; 在 21 °C ~ 121 °C 范围内的 7 个温度梯度下处理 30 min 后, SQ6 发酵液的表面张力变化不大。SQ6 发酵液中的表面活性物质对温度变化表现出极强的稳定性。

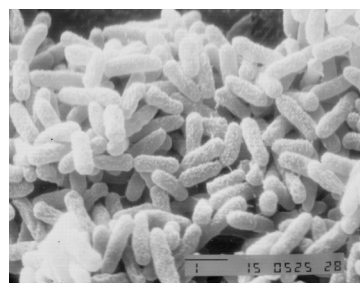


图 1 菌株 SQ6 的扫描电镜照片 (×15000)

Fig. 1 Morphology of bacterium SQ6 taken by scanning electron microscope (×15000)

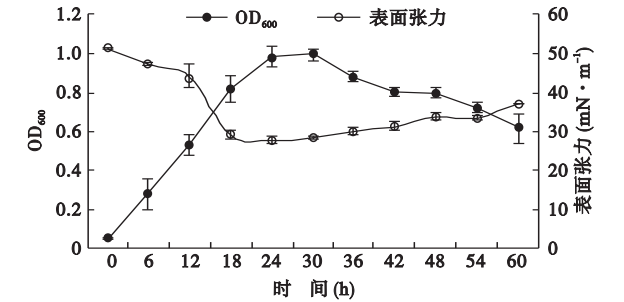


图2 SQ6 发酵液表面张力变化与菌体生长变化
Fig.2 Variations of surface tension against the growth of SQ6

表1 菌株 SQ6 发酵液表面张力在不同温度条件下的稳定性
Tab.1 Effect of temperature on stability of surface tension of SQ6 broth

温度 (℃)	表面张力 (mN · m ⁻¹)
21	28.1±0.2
30	27.9±0.3
45	28.0±0.2
60	28.2±0.1
80	27.3±0.2
100	27.1±0.3
121	27.2±0.0

数值为平均值±标准差,下同。

2.4.2 pH 对 SQ6 发酵液表面活性的影响 由表 2 可见,SQ6 产生的表面活性剂 pH 适应范围较广,在 pH 2~12 范围内,发酵液的表面张力变化不大。但随着 pH 升高,表面张力有稍微增加的趋势。

2.4.3 NaCl 浓度对发酵液表面活性的影响 用 NaCl 将发酵液的矿化度分别调至 0、6%、9%、12%、15%、18%,测定具不同矿化度发酵液的表面张力(表 3)。结果表明,该菌产生的表面活性剂对盐有一定耐受性,盐浓度低于 15% 时,表面张力几乎无变化,盐浓度高于 15%,表面张力开始上升。

表2 菌株 SQ6 发酵液表面张力在不同 pH 条件下的稳定性
Tab.2 Stability of surface tension of SQ6 broth at different pH levels

pH	表面张力 (mN · m ⁻¹)
2	27.2±0.1
4	28.0±0.4
6	28.6±0.5
8	29.5±0.4
10	30.5±0.2
12	31.2±0.6

表3 菌株 SQ6 发酵液表面张力在不同矿化度 (NaCl 浓度) 条件下的稳定性
Tab.3 Stability of surface tension of SQ6 broth subjected to different concentrations of NaCl

NaCl 浓度 (%)	表面张力 (mN · m ⁻¹)
0	27.1±0.2
6	26.8±0.1
9	27.0±0.2
12	27.1±0.5
15	32.7±1.5
18	34.2±0.6

2.5 表面活性物质定性分析

从 SQ6 菌株发酵液提取到的表面活性剂粗品为黄褐色,经 TLC 分析,在茚三酮下不显红色,而在蒽酮下显黄色。这表明该表面活性剂活性成分为糖脂类物质,而不是脂肽类化合物。

2.6 临界胶束浓度

SQ6 发酵液中表面活性剂提纯后,将纯品稀释成 15、30、40、50、60、80、100 mg · L⁻¹后,分别测定表面张力(图 3)。溶液的表面张力随浓度增大而逐渐降低到 27.1 mN · m⁻¹后基本保持不变。此时所对应的表面活性剂浓度 50 mg · L⁻¹为临界胶束浓度。该表面活性剂的 CMC 比一般化学表面活性剂的 CMC 值低 1~2 个数量级。从这点来看,菌株 SQ6 产生的表面活性剂比一般的化学表面活性剂在性能方面更为优越。

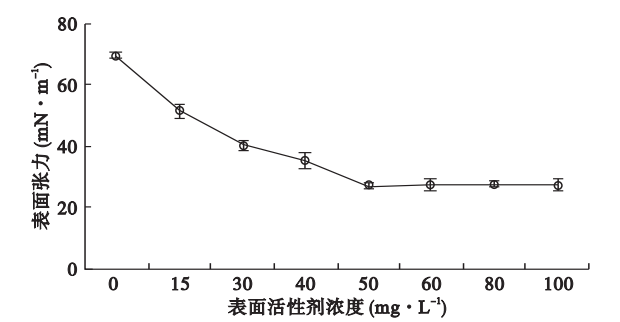


图3 表面张力随表面活性剂浓度的变化
Fig.3 Variation of surface tension against concentration of biosurfactant produced by SQ6

3 讨论

通过血平板法结合排油圈直径和表面张力测定等方法,成功从大庆油田采出液中筛选并分离得到一株表面活性剂产生菌。血平板法的筛选原理是微生物产生的表面活性剂可以使红细胞溶解,产生溶血圈,其大小与微生物产表面活性剂的能力有关。

此法方便快捷,但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。本研究,通过血平板初筛共获得溶血圈阳性菌株90株,后续排油活性测定结果显示,9株的排油直径>3 cm,其中菌株SQ6可将发酵液的表面张力降低至 $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 以下。上述结果意味着,尽管血平板法的假阳性率可能较高,但是通过后续测定排油活性等进行复筛,还是可以便捷地筛选到表面活性剂产生菌。另外,有研究表明,微生物产生表面活性剂易受碳源种类、碳氮源比例、二价阳离子浓度等条件的影响(Robert *et al.*, 1989; Adamczak & Bednarski, 2000; Das *et al.*, 2009)。血平板培养基的成分相对固定,在该培养基上不产生表面活性剂的菌株有可能在含其他组分的培养基中能够产生表面活性剂。因此,从这个角度来看,产生溶血圈的菌株可能也有产表面活性剂的潜力。但是,不管怎样,血平板法与排油活性、表面张力测定相结合的方法较单独采用血平板法更为准确、快速。

SQ6菌株在24 h内可使发酵液的表面张力从 57.0 降到 $25.6 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$,表面张力降低百分比为 55.1% ,表明SQ6菌株是一个较优良的生物表面活性剂产生菌。在已有的研究中,铜绿假单胞菌产表面活性剂的报道较多。沈薇等(2005)从炼油厂废水和油泥中分别筛选到2株假单胞菌属的菌株BS-03与BS-01,二者产生表面活性剂可将发酵液表面张力由 $56.8 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 分别降至 25.6 和 $27.4 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 。其产生的表面活性剂临界胶束浓度分别为 326 和 $58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。SQ6在pH8时发酵液表面张力降低情况和上述报道结果相似,但SQ6产生的表面活性剂临界胶束浓度低于上述2种菌株。此外,Thaniyavarn等(2006)以棕榈油为唯一碳源利用*P. aeruginosa* A41产生表面活性剂,*P. aeruginosa* A41可将发酵液表面张力由 $55 \sim 70 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 降到 $27.8 \sim 30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 。除了铜绿假单胞菌以外,能够产生表面活性剂的微生物种类还有很多,这些微生物的生长条件不尽相同。本文筛选到的菌株中,除了SQ6以外,还有8个菌株具有较大的排油活性,后续的16S rRNA基因序列比对显示,它们与不动杆菌属、芽孢杆菌属的菌株具有高度的同源性。发酵中生物表面活性剂产量与发酵条件密切相关,不同培养基组成和培养条件可产生不同的生物表面活性剂,甚至出现不产生物表面活性剂的情况。表面活

性剂的产生与碳氮源及其比例、二价阳离子等密切相关(Robert *et al.*, 1989; Adamczak & Bednarski, 2000),其产量较大程度上依赖于碳源的可得性以及各种营养成分之间的平衡(Pruthi & Cameotra, 2003; Abouseoud *et al.*, 2008)。另外,菌龄、接种量、培养温度、pH、转速等对生物表面活性剂的产生及产量也有重要作用。因此,本文筛选到的SQ1等8株细菌的培养基和发酵等条件仍需进一步优化。

本文通过薄层层析的方法将SQ6发酵液中表面活性物质的成分定性为糖脂类化合物,而对于表面活性物质的准确结构分析暂时未进一步开展。其主要原因:1)该生物表面活性剂在实际应用中的潜在有效性评价有必要优先于其结构鉴定;2)虽然SQ6的发酵液在以葡萄糖为唯一碳源的无机盐培养基上产生表面活性剂具有良好的表面活性,但是仍有必要对SQ6产表面活性剂的发酵培养基进行优化,以便于进一步提高活性并降低成本。目前,SQ6在微生物驱油、环境污染修复等方面应用的考察和评价性研究正在本实验室陆续展开。

SQ6发酵液的表面活性可耐受高温和高盐浓度,对pH适应范围较广,这些特性使其在微生物提高原油采收率(MEOR)方面可能具有重要意义。表面活性剂的驱油机理是通过降低油水界面张力,同时改变油藏岩石润湿性,使岩石表面从亲油性变成亲水性,致使吸附在岩石表面上的油膜脱落,油藏残余油饱和度降低,从而提高采收率。但是现在油田生产中所用的表面活性剂均是化学合成的。随着研究的不断深入,微生物产生的表面活性剂最有可能取代化学表面活性剂在原油开采方面得以应用。微生物采油对生物表面活性剂的提取和纯化要求不高,可直接将发酵液或菌株和营养物质注入油层,这将为有针对性进行微生物驱油与调控提供新思路。

参考文献

- 陈坚,华兆哲,伦世仪. 1996. 生物表面活性剂在环境生物工程中的应用. 环境科学, **17**(4): 84-87.
- 马歌丽,彭新榜,马翠卿,等. 2003. 生物表面活性剂及其应用. 中国生物工程杂志, **23**(5): 42-45.
- 宁长发,沈薇,孟广荣,等. 2004. 产生物表面活性剂菌种的一种快速筛选模型. 微生物学通报, **31**(3): 55-58.
- 潘冰峰,徐国梁,施邑屏,等. 1999. 生物表面活性剂产生菌的筛选. 微生物学报, **39**(3): 264-267.
- 沈薇,杨树林,宁长发,等. 2005. 蓝色凝胶平板法筛选生物表面活性剂产生菌. 南京理工大学学报, **29**(4):

- 486–490.
- 王 芳. 1994. 驱油用低界面张力生物表面活性剂鼠李糖脂体系的研究. 油田化学, **11**(1): 66–69.
- 王修垣, 田新玉, 宋沛然. 1982. 菌株 H255 原油发酵液乳化物质的分析. 微生物学报, **22**(3): 269–275.
- 赵裕蓉, 王宁玲. 1996. 生物法制蔗糖酯-生物表面活性剂. 北京化工大学学报, **23**(4): 6–10.
- Abouseoud M, Maachi R, Amrane A, *et al.* 2008. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, **223**: 143–151.
- Adamczak M, Bednarski W. 2000. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *Biotechnology Letters*, **22**: 313–316.
- Calvo C, Manzanera M, Silva-Castro GA, *et al.* 2009. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Science of the Total Environment*, **407**: 3634–3640.
- Das P, Mukherjee S, Sen R. 2009. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Bioresource Technology*, **100**: 1015–1019.
- Harvey S, Elashvili I, Valdes JJ, *et al.* 1990. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. *Biotechnology*, **8**: 228–230.
- Mulligan CN, Gibbs BF. 1993. Factors influencing the economics of biosurfactants// Kosaric N, ed. *Biosurfactants, Production, Properties and Applications*. New York: Marcel Dekker Inc., Chapter: **13**: 329–372.
- Pruthi V, Cameotra SS. 2003. Effect of nutrients on optimal production of biosurfactants by *Pseudomonas putida*—A Gujarat oil field isolate. *Journal of Surfactants and Detergents*, **6**: 65–68.
- Robert M, Mercade ME, Bosch MP, *et al.* 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnology Letters*, **11**: 871–874.
- Thaniyavarn J, Chongchin A, Wanitsuksombut N, *et al.* 2006. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* A41 using palm oil as carbon source. *Journal of General and Applied Microbiology*, **52**: 215–222.
-
- 作者简介 李娜娜,女,1985 年生,硕士研究生。主要从事生物表面活性剂研究。E-mail: linana_08@163.com
- 责任编辑 魏中青
-