

Study on the Identification and Characteristics of a Strain of *N*-Alkane Degrading Bacteria TY12

Jia Tan, Yun Tang*, Lijun Ji

College of Biological Sciences, China West Normal University, Nanchong Shichuan

Email: tangyun_502@aliyun.com

Received: Jan. 21st, 2015; accepted: Feb. 5th, 2015; published: Feb. 12th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

A strain of hydrophobic hydrocarbon degrading bacteria TY12 was screened out of petroleum contaminated soils from Nanchong oil refinery. Through 16S rDNA basic sequence detection and phylogenetic analysis, TY12 was identified as *Serratia proteamaculans*, and then according to morphological, physiology and biochemistry characteristics, this paper has a deep study on TY12. This paper studied on the cell-surface hydrophobicity of TY12 by microorganism adhering to hydrocarbon (MATH), the results showed that the cell-surface hydrophobicity of TY12 was 52.2%, and the cell-surface hydrophobicity changed with the variation of incubation time. The n-dodecane degradation was 66.1% after TY12 was growing on in hydrocarbon degradation medium with 1% (W/V) of n-docosane at 28°C and 180 r/min for 4 d. It had potential in bioremediation of oil contaminated environment.

Keywords

Petroleum Pollution, Isolation and Identification, Alkane Biodegradation, Cell-Surface Hydrophobicity

一株解烃菌TY12的分离及其特性研究

谭佳, 唐贇*, 冀黎骏

西华师范大学生命科学学院, 四川 南充

Email: tangyun_502@aliyun.com

*通讯作者。

收稿日期：2015年1月21日；录用日期：2015年2月5日；发布日期：2015年2月12日

摘要

本文以南充市炼油厂附近被石油污染获取的土壤作为研究材料，筛选分离获得一株对石油烃有降解性的疏水性烷烃降解菌TY12。经过16S rDNA的克隆测序和系统发育分析，初步确定该菌株为变形斑沙雷氏菌(*Serratia proteamaculans*)，并从形态学、生理生化特性对发现的菌株TY12进行了进一步的研究和分析。同时用微生物粘着碳烃化合物法(MATH)研究得到TY12菌株的表面疏水性为52.2%，且表面疏水性会随着培养时间的增加，不断的减小。该菌能在以正十二烷为唯一碳源的无机盐培养基中生长，当在含有1%(W/V)正十二烷的无机盐培养基中接入1%种子液，28℃、摇床转速180 r/min的条件下震荡培养4 d，正十二烷降解率可达66.1%。其研究成果为石油污染土壤的生物修复提供了一定的依据。

关键词

石油污染，分离鉴定，烷烃生物降解，细胞表面疏水性

1. 引言

在石油开采、加工、运输、装卸和使用过程中，石油及其产品进入环境，造成破坏[1]。石油污染主要发生在海洋，但是对土壤的污染也与日俱增。这些污染已经对人类造成了极大的危害，因此对石油污染的治理成为近年来世界各国环境保护的焦点[2]。之前的物理法和化学法在净化土壤的同时也破坏了土壤的结构，且价格昂贵而很难实施，在上世纪80年代污染土壤的生物修复技术因成本费用低、效果好、对环境污染小、无二次污染、不破坏植物生长的土壤环境等优点越来越引起人们的关注，并受到越来越多国家的欢迎[3]。环境中有多多种降解菌可以降解烷烃及甲苯、萘、菲等芳香烃。微生物降解石油烃主要在油-水界面进行，石油烃的疏水性阻碍了油的分散程度，直接降低了微生物与油珠接触的表面积，从而大大降低了微生物降解石油烃的效果[4]-[6]。菌体的疏水性可以使疏水性的石油烃分子吸附到细菌表面，更有利于菌株对石油烃的分解利用[7][8]。因而，选育疏水性和降解能力较强的微生物成了石油污染的生物修复的热门课题。

本文从南充市炼油厂被石油污染的土壤中分离筛选获得了一株疏水性较强的解烃菌TY12，并对其形态学、生理生化特性和16S rDNA进化分析研究发现TY12为变形斑沙雷氏菌(*Serratia proteamaculans*)，是国内外首次报道的一种新解烃菌。同时，对菌株的细胞表面疏水性以及降解烷烃的能力进行了研究，其研究成果为石油污染土壤的生物修复提供了一定的依据。

2. 实验材料与方法

2.1. 样品来源

南充市炼油厂被石油污染的土壤，且随机取样作为实验材料。

2.2. 主要试剂与仪器

2.2.1. 主要试剂

正十二烷(纯度 > 98%)购自天津化学试剂研究所；生化鉴定管购自青岛海博生物技术有限公司；细菌基因组DNA提取试剂盒，DNA纯化回收试剂盒，酶连缓冲液 Solution I 及 PMD19-T 载体，均为天根生化科技

(北京)有限公司产品; 16S rDNA 序列 PCR 扩增引物: 上游引物(fD₁): 5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG -3', 下游引物(rD₁): 5'-AAGCAGGTGATCCAGCC-3' [9]。引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。

2.2.2. 主要仪器

JA 电子精密天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); 722 型可见分光光度计(上海光谱达仪器有限公司); THZ-Q 台式冷冻恒温振荡器(江苏省太仓市华美生化仪器厂); SW-CJ-1F 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); DHG-9240A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); HP4890 气相色谱仪(Agilent Technologies 安捷伦公司); LDZM-80KCS 智能型不锈钢立体灭菌器(上海申安医疗器械厂); Eppendorf 5804R Centrifuge (德国); PHS-3C 精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。

2.3. 培养基

2.3.1. E2 无机盐培养基[10]

NaNH₄HPO₄·4H₂O 3.5 g, K₂HPO₄ 7.5 g, KH₂PO₄ 3.6 g 加蒸馏水至 1000 mL, 调节 PH 值为 7.0, 灭菌后加入已高压灭菌的 1 mol/L MgSO₄ 1.0 mL 和过滤除菌的微量元素溶液 II 1.0 mL。固体培养基在此基础上加 15 g 琼脂粉。

1 mol/L 的 MgSO₄ 溶液: 称取 24.65 g MgSO₄·7H₂O 溶于 50 mL 蒸馏水中, 再用 100 mL 的容量瓶定容, 灭菌后分装保存在-20℃的冰箱备用。

微量元素溶液 II (250 mL): FeSO₄·7H₂O 0.695 g, MnCl₂·4H₂O 0.5 g, CoSO₄·7H₂O 0.7 g, CaCl₂·2H₂O 0.278 g, CuCl₂·2H₂O 0.043 g, ZnSO₄·7H₂O 0.073 g, 溶于 125 mL 1 mol/L 的蒸馏水中, 用 250 mL 的容量瓶定容, 过滤除菌后分装保存在-20℃的冰箱备用。

2.3.2. 正十二烷培养基

无机盐培养基, 加 1%(W/V)的正十二烷。固体培养基在此基础上加 1.5%的琼脂粉。

2.3.3. LB 固体培养基

蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, 琼脂粉 15 g, 加蒸馏水至 1000 mL, 调节 PH 值 7.0, 在 121℃ 条件下灭菌 20 min。液体培养基不加琼脂粉。

2.4. 烷烃降解菌的分离筛选

取少量被污染的土壤分别加入 E2 无机盐培养基(含有 1%(W/V)的正十二烷, 1 mol/L 的 MgSO₄ 溶液和微量元素溶液 II)中, 置于 37℃、180 r/min 恒温振荡培养箱中培养 4 d 后, 将培养的菌液经梯度稀释后涂布于正十二烷固体培养基, 将固体培养基放于 37℃生化培养箱中倒置培养 48 h, 挑取单菌落在 LB 固体培养基上划线分离, 经多次纯化分离得到单菌株, 将一些单菌株转入 LB 液体培养基中, 再于 37℃、180 r/min 恒温振荡培养箱中过夜培养后, 将菌液保存在已灭菌的甘油管中并放入-20℃的冰箱以备较长时间使用; 另将一些单菌株转移至斜面保存以备短时间使用。

2.5. 菌株的鉴定

2.5.1. 菌株形态及生理生化鉴定

在对分离到的菌株进行形态学和生理生化鉴定时, 参考《常见细菌鉴定手册》[11]和《一般细菌常用鉴定方法》[12]。采用生化反应管(杭州天和生物有限公司提供), 快速鉴定该菌的主要生理生化特性。

2.5.2. 16S rDNA 序列进化分析

参照 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒方法提取细菌基因组 DNA。以总 DNA 为模板, 采用通

用 fD₁ 和 rD₁ [9]引物(fD₁: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3', rD₁: 5'-AAGCAGGTGATCCAGCC-3') 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增[13] [14]。

PCR 扩增体系: 2 × Master Mix (TIANGEN) 25 μL, 10 umol/L 上游引物 fD1 2 uL, 10 μmol/L 下游引物 rD1 2 μL, 50 倍稀释 DNA 模板 2 μL, 加 ddH₂O 至总体积 50 μL。

PCR 扩增条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 2 min, 总计 30 个循环; 72℃ 最后延伸 10 min。

PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中和 150 V 电压下电泳检测后, 用 DNA 回收试剂盒纯化回收目的片段, 将回收产物与 PMD19-T 载体(TaKaRa)过夜连接, 经菌落 PCR 鉴定[15]正确后, 将菌液送往北京泰和生物技术有限公司测序。

将获得的序列通过序列比对后, 采用 Mega 4.0 软件进行邻位相连法(Neighbor-joining method) [16]分析获得系统发育树, 再通过自举分析(Bootstrap)进行置信度检测, 自举数集 1000 次。

2.6. 菌株 TY12 在 LB 液体培养基中生长曲线的测定

采用光电比浊计数法来测定菌液浓度。将保存在甘油管中的菌种取少量接入盛有 50 mL LB 液体培养基的锥形瓶中, 置于 28℃, 180 r/min 恒温震荡培养箱中培养 10 h, 将其活化。将活化的菌液按 1% 的量转入盛有 700 ml LB 液体培养基的锥形瓶中, 轻轻摇匀。然后向每支已灭菌的试管中加入 10 ml 的活化菌液, 共装到 66 个试管中, 同样放于 28℃, 180 r/min 恒温震荡培养箱中培养, 每小时测定 TY12 在 LB 液体培养基中 OD₆₀₀ 的大小(每次任意取其中 3 支试管, 且以空白 LB 液体培养基作为对照, 去除异常的数据后求其平均值)。以时间(h)为横坐标, OD₆₀₀ 值为纵坐标作图, 将各点连接成一条平滑曲线, 即为该菌在 LB 液体培养基中, 28℃、180 r/min 培养时的生长曲线。

2.7. 菌株 TY12 对正十二烷降解能力的测定

在含有浓度为 1% 的正十二烷的无机盐培养基中同样按 1% 的量接入已活化的 TY12 菌液, 置于 30℃、180 r/min 恒温震荡培养箱中培养, 每天取样, 培养时间分别为(1 d, 2 d, 3 d, 4 d)。每瓶中加入 30 mL 正己烷萃取后, 以只含有 1% 的正十二烷的无机盐培养基作为对照, 用 HP4890 气相色谱仪(GC-FID)分析残余烷烃量, 且在相同条件下进行多组重复性实验, 最后计算降解率[17]。

2.8. 菌株 TY12 生长状况与表面疏水性的关系

在盛有 30 mL LB 液体的培养基中, 按 1% 的量接入已活化的 TY12 菌液, 放于 28℃, 180 r/min 恒温震荡培养箱中培养, 分别在 3 h、6 h、9 h、14 h 时, 测定细胞表面疏水性即 MATH 值, 通过对比不同时间的 MATH 值, 探讨细菌表面疏水性与培养时间的关系。

细菌表面疏水性的测定方法采用 Rosenberg 等[18]介绍的微生物粘着碳烃化合物法(MATH)。选用 d = 10 mm 的圆底试管, 先向试管内加入已调整浓度的菌液 4 mL, 然后按 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2 mL 的梯度依次加入二甲苯(对照组只加等量的菌液, 不加二甲苯), 再用玻璃小塞将口封住, 最后在室温(20℃ ± 1℃) 下剧烈振荡 1 min, 静置 20 min 使两相完全分离。分离后用无菌注射针头吸取下相水溶液 3 mL, 以 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液为空白对照, 在 600 nm 波长下测定 A 值。每组实验重复 3 次。细菌细胞表面疏水率(CSH%): $CSH\% = (\text{对照组 } A_{600\text{ nm}} - \text{实验组 } A_{600\text{ nm}}) / \text{对照组 } A_{600\text{ nm}} \times 100\%$ 。

3. 结果与讨论

3.1. 烷烃降解菌株的分离

采自南充市炼油厂被石油污染的土壤, 经过分离、驯化和纯化, 得到 1 株对正十二烷具有高降解性、

本身表面疏水性能较强的菌株，将其命名为 TY12。

3.2. 菌株 TY12 的生理生化特性

通过在 LB 固体培养基上划线培养，TY12 生长良好，测得菌落直径大约 0.72 mm，每个菌落呈乳白色，为圆形，且不透明；边缘平整，中间稍隆起；表面略湿，无光泽，不粘稠，无臭味。在 LB 半固体培养基中，在琼脂表面生长旺盛，穿刺线也十分明显。该菌为革兰氏染色阴性菌，在电镜下观察到菌体呈中杆状，大小约为 0.5~0.8 μm \times 0.9~2.0 μm ，周身具鞭毛，因此有运动性，但它无荚膜和芽孢。接触性酶强阳性，氧化酶阴性；在 0%~4% NaCl 的 LB 液体培养基中均能生长，最适 NaCl 浓度为 1%；在 pH5~9 的范围内均能生长，最适生长 pH 为 7.0~8.0，生理生化特性见表 1。

研究表明，所分离的菌株与变形斑沙雷氏菌的生理特性较一致，初步鉴定为变形斑沙雷氏菌

Table 1. Comparison of selected physiological characteristics of strain TY12 and *S. proteamaculans*

表 1. 菌株 TY12 与变形斑沙雷氏菌的主要生理生化特征比较

鉴定指标	菌株 TY12	变形斑沙雷氏菌(<i>S. proteamaculans</i>)
V-P 反应(Voges-Proskauer)	+	+
赖氨酸脱羧酶(Lysine decarboxylase)	d	+/-
精氨酸双水解(Arginine dihydrolase)	-	-
鸟氨酸脱羧(Ornithine decarboxylase)	+	+
明胶液化(Gelatin hydrolysis)	+	+
丙二酸利用(Malonate utilization)	-	-
D-葡萄糖产气(D-Glucose, gas production)	+	+
产酸(Acid production):		
阿东醇(Adonitol)	-	-
阿拉伯糖(Arabinose)	+	d
纤维二糖(Cellobiose)	-	-
卫矛醇(Dulcitol)	-	-
乳糖(Lactose)	-	-
蜜二糖(Melibiose)	+	+
α -甲基-葡萄糖苷(α -methyl-glucoside)	-	-
棉籽糖(Raffinose)	+	+
鼠李糖(Rhamnose)	-	d
山梨醇(Sorbitol)	+	+
蔗糖(Sucrose)	+	+
木糖(Xylose)	+	+
DNA 酶(Deoxyribonuclease)	+	+
酯酶(Lipase)	+	+
色素(Pigment)	-	-

注: +, 90%以上阳性反应; -, 90%以上阴性反应; d, 11%~89%阳性反应。

Note: +, 90% or more of strains are positive; -, 90% or more of strains are negative; d, 11% - 89% of strains are positive.

(*Serratia proteamaculans*)。

3.3. 菌株 TY12 的 16S rDNA 进化分析

通过对菌株 TY12 的 16S rDNA 的 PCR 扩增、测序, 获得大小为 1541 bp 的基因片段, 此序列在 GenBank 上的登录号为: JN859195。将该序列与 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 数据库中的序列进行 BLAST (basic local alignment search tool) 比对, 与亲缘关系较近菌属构建系统发育树, 如图 1 所示。TY12 菌株与 *Serratia proteamaculans* wg-2 和 *Serratia proteamaculans* 568 的相似性为 99.6%。根据 16S rDNA 序列进化分析, 并结合其生理生化特征, 初步确定菌株 TY12 为变形斑沙雷氏菌(*Serratia proteamaculans*)。

3.4. 菌株 TY12 在 LB 培养基中生长曲线

为了确定菌株的生长时期, 实验测定了菌株的生长曲线(实验方法见 2.6)。以培养时间为横坐标, 测定的 $OD_{600\text{nm}}$ 值为纵坐标, 绘制出菌株的生长曲线, 如图 2。结果发现, 菌株在培养 3 h 后开始进入对数生长期, 6 h 左右进入生长稳定期, 12 h 开始进入死亡期。

3.5. 菌株 TY12 的生长时期与疏水性关系

目前测定细菌表面疏水性(CSH)的方法有许多种, 如烃类化合物吸附法(MATH)、疏水相互作用色谱法(HIC)、盐析凝聚法(SAT)、分子探针法、接触角测量法(CAM)、两相分配法(TPP)等[19] [20], 但以 MATH 法较为简便易行、稳定可靠。所以本实验采用微生物粘着碳烃化合物法(MATH), 实验方法参见 2.8, 结果如表 2。

结果表明, 菌株 TY12 的细胞表面的疏水性随着培养时间的增加, 逐渐下降, 在稳定期下降了 10.5%, 进入衰老期降低得更多。目测观察可知处于衰老期的菌体在两相分配时仅有少量菌体聚集在界面, 大部分菌体与有机相和水相混溶, 不易分离。这种现象表明该菌表面的疏水位点会随着菌体的衰老而减少, 因此它与有机相的疏水作用减弱, 这就造成它不能克服自身重力吸附到两相界面。

3.6. 菌株 TY12 解烃能力的测定

以实验方法 2.7 对菌株 TY12 的解烃能力进行了测定, 其结果见表 3。结果表明, 该菌对正十二烷残的降解率随着培养时间的增加越来越高, 第 1 d 时降解率已很明显, 第 3 天后趋于平缓, 培养 4 d 后对正十二烷的降解率可达 66.1%, 表明该菌株降解正十二烷能力较强。

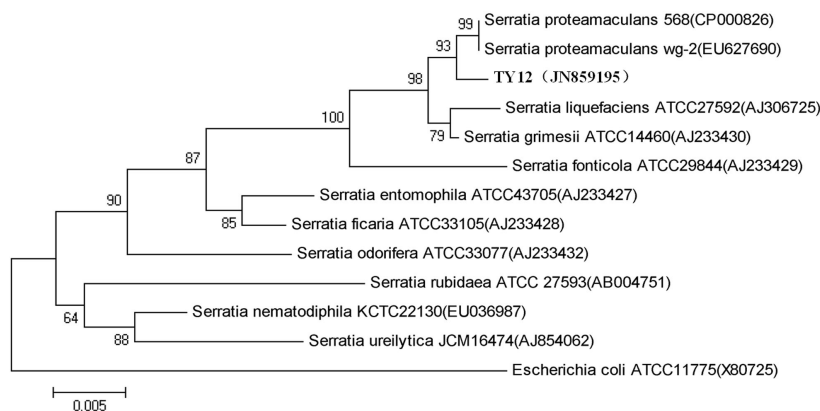


Figure 1. Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of TY12 and the sequences of relating species

图 1. 基于 16S rDNA 序列同源性的菌株间的系统发育树

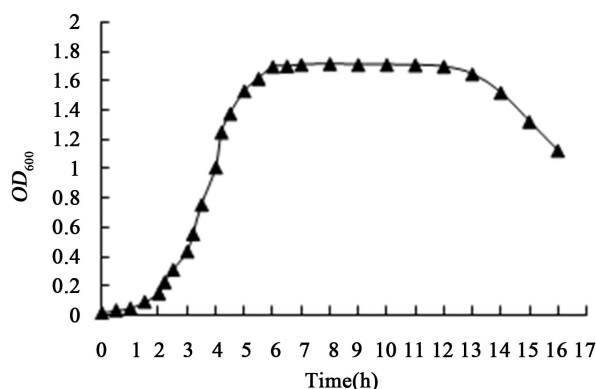


Figure 2. The growth curve of strain TY12 in LB medium

图 2. 菌株 TY12 在 LB 培养基中的生长曲线

Table 2. MATH values of strain TY12

表 2. 菌株 TY12 的 MATH 值

培养时间(h)	3	6	9	14
MATH 值(%)	52.2	41.7	34.4	18.1

Table 3. Degradation rate of strain TY12 with n-dodecane

表 3. 菌株 TY12 对正十二烷的降解率

培养时间(h)	1	2	3	4
降解率(%)	46.8	54.1	64.3	66.1

4. 结论

(1) 从石油污染土壤中分离得到的 1 株疏水性的烷烃降解菌 TY12, 通过 16S rDNA 序列进化分析, 形态学、生理生化特性实验, 确定菌株 TY12 为变形斑沙雷氏菌(*Serratia proteamaculans*)。

(2) 通过疏水性烷烃降解菌在不同生长期的 CHS 比较可知, 菌株 TY12 的细胞表面疏水性, 随着培养时间的延长, 逐渐减弱, 且在稳定期下降了 10.5%, 进入衰老期后细胞表面疏水性进一步下降。

(3) 对疏水性烷烃降解菌进行降解实验表明, 种子液按 1% 接入 50 mL 正十二烷浓度为 1%(W/V) 无机盐培养基中, 于 30℃、180 r/min 震荡恒温培养箱中培养 4 d, 烷烃降解率可达到 66.1%。

基金项目

四川省科技厅应用基础研究项目(2014JY0196)资助。

参考文献 (References)

- [1] 马强, 林爱军, 等 (2008) 土壤中总石油烃污染(TPH)的微生物降解与修复研究进展. *生态毒理学报*, **1**, 1-7.
- [2] 周中文, 崔喜艳, 邵宗泽 (2014) 南沙深海沉积物中石油降解菌的分离鉴定和多样性分析. *应用海洋学报*, **3**, 299-305.
- [3] 王建宁, 董纯明, 赖其良, 等 (2012) 北极表层海水中氯代十六烷降解菌的多样性. *微生物学报*, **8**, 1011-1020.
- [4] Englert, C. and Kenzie, E.J. (1992) Bioremediation of petroleum products in soil. In: Calabrese, E.J. and Kostecki, P.T., Eds., *Principles and Practices for Petroleum Contaminated Soils*, CRC Press, Ann Arbor, 126-128.
- [5] 司美茹, 赵云峰, 苏涛 (2011) 高效降解烷烃的无色杆菌 X_L 株的分离鉴定及其降解特性. *土壤通报*, **3**, 562-567.
- [6] Geffers, R., Waliczek, A., Conte, V.S., Kralova, M., et al. (2013) Analysis of the microbial gene landscape and tran-

- scriptome for aromatic pollutants and alkane degradation using a novel internally calibrated microarray system. *Environmental Microbiology*, **15**, 1016-1039.
- [7] 信艳娟, 刘亚男, 吴佩春, 等 (2013) 一株原油降解菌的分离鉴定及降解特性研究. *微生物学通报*, **4**, 558-566.
- [8] 常慧萍, 杨雪, 王丁, 邢文会, 等 (2014) 高效石油降解菌 BS-8 产生物表面活性剂的性能. *江苏农业科学*, **10**, 365-367.
- [9] William, G., Weisburg, S.M., et al. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, **173**, 697-703.
- [10] Lageveen, R.G., Huisman, G.W., Preusting, H., et al. (1988) Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of substrates on formation and composition of Poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 2924-2932.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英 (2001) 常见细菌系统鉴定手册. 科学出版社, 北京, 370-410.
- [12] 中国科学院微生物研究所细菌分类组 (1978) 一般细菌常用鉴定方法. 科学出版社, 北京, 114-115, 125-127.
- [13] Wang, W.P. and Shao, Z.Z. (2012) Genes involved in alkane degradation in the *Alcanivorax hongdengensis* strain A-11-3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **94**, 437-448.
- [14] Kato, T., Miyanaga, A., Kanaya, S. and Morikawa, M. (2010) Gene cloning and characterization of an aldehyde dehydrogenase from long-chain alkane-degrading *Geobacillus thermoleovorans* B23. *Extremophiles*, **14**, 33-39.
- [15] 陈书霞, 王晓武, 房玉林 (2006) 单菌落 PCR 法直接快速鉴定重组克隆. *微生物学通报*, **3**, 52-56.
- [16] Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- [17] 郭娜, 李志敏, 叶勤 (2011) 烷烃降解菌的筛选、鉴定及优势菌株的降解特性. *应用与环境生物学报*, **4**, 572-576.
- [18] Rosenberg, M. (1991) Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon: Water interface. *Critical Reviews in Microbiology*, **18**, 159-173.
- [19] Hamada, T., Sameshima, Y., Honda, K., Omasa, T., Kato, J. and Ohtake, H. (2008) A comparison of various methods to predict bacterial predilection for organic solvents used as reaction media. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **106**, 357-362.
- [20] Ahimou, F., Paquot, M., Jacques, P., Thonart, P. and Rouxhet, P.G. (2001) Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiological Methods*, **45**, 119-126.