



# 原油污染土壤中生物表面活性剂菌株的筛选和产物鉴定

黄燕<sup>1,2</sup>, 冯劲<sup>2</sup>, 周刚<sup>2</sup>, 王玲玲<sup>2</sup>, 谢小保<sup>2</sup>, 施庆珊<sup>2\*</sup>, 张琦<sup>1</sup>

1 昆明理工大学生命科学学院, 云南 昆明 650500

2 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070

黄燕, 冯劲, 周刚, 王玲玲, 谢小保, 施庆珊, 张琦. 原油污染土壤中生物表面活性剂菌株的筛选和产物鉴定[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1060-1071.

HUANG Yan, FENG Jin, ZHOU Gang, WANG Lingling, XIE Xiaobao, SHI Qingshan, ZHANG Qi. Screening and product identification of biosurfactant-producing strains in crude oil-contaminated soil[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1060-1071.

**摘要:** 【目的】从原油污染的土壤中分离出产表面活性剂的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) SX-20, 并对其产物进行提取及结构分析。【方法】采用氯化十六烷基吡啶和溴百里酚蓝混合溶液(cetylpyridinium chloride- bromothymol blue, CPC-BTB)显色反应结合血琼脂平板简单高效的筛选得到产脂肽的枯草芽孢杆菌。通过酸沉淀、甲醇萃取和旋转蒸发提取发酵所产生的粗产物, 该产物对痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)具有良好的抑制作用。运用傅里叶红光变换光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)、氨基酸分析和液相质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)对粗产物的成分进行分析。【结果】筛选所得的菌株所产物质是含 C15 脂肪酸链和 7 个氨基酸形成的环状的脂肽表面活性剂。【结论】本研究为筛选脂肽类生物表面活性剂提供了一定的理论基础和技术路线, 有利于后续获得高产的低成本的生物表面活性剂。

**关键词:** 原油污染土壤; 枯草芽孢杆菌; 表面活性剂; 脂肽; 筛选; 鉴定

资助项目: 国家自然科学基金(21976038)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (21976038).

\*Corresponding author. E-mail: shiqingshan@hotmail.com

Received: 2022-07-11; Accepted: 2022-11-14; Published online: 2022-11-22

# Screening and product identification of biosurfactant-producing strains in crude oil-contaminated soil

HUANG Yan<sup>1,2</sup>, FENG Jin<sup>2</sup>, ZHOU Gang<sup>2</sup>, WANG Lingling<sup>2</sup>, XIE Xiaobao<sup>2</sup>,  
SHI Qingshan<sup>2\*</sup>, ZHANG Qi<sup>1</sup>

1 Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, Yunnan, China

2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

**Abstract: [Objective]** To screen out a surfactant-producing microbial strain *Bacillus subtilis* SX-20 from the soil contaminated by crude oil for a long time and then extract and analyze the products of the strain. **[Methods]** We used cetylpyridinium chloride-brominated thymol blue combined with blood agar plate for the screening and obtained a strain capable of producing lipopeptide. The crude fermentation product of the strain was extracted by acid precipitation, methanol extraction, and rotary evaporation, and it showed good inhibitory effect on *Propionibacterium acnes*. Its composition was analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), amino acid analysis, and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). **[Results]** The surfactant-producing strain screened out was identified as *Bacillus subtilis* and named SX-20. The product of the screened strain was a cyclic lipopeptide containing a C15 fatty acid chain and 7 amino acid residues. **[Conclusion]** This study provided a theoretical basis and technical route for the screening of biosurfactant-producing strains, which is conducive to the subsequent acquisition of high-yield and low-cost biosurfactants.

**Keywords:** crude oil-contaminated soil; *Bacillus subtilis*; surfactant; lipopeptide; screening; identification

微生物代谢产生的脂肽是具有代表性的生物表面活性剂, 国内外报道的主要有表面活性素(surfactin)、伊枯草菌素(iturin)、丰原素(fengycin 和 plipastatin 同时期不同实验室发现, 结构相似)和 kurstakin 这 4 种结构类似物<sup>[1]</sup>。在 4 种表面活性剂中表面活性素的表面活性突出<sup>[2]</sup>。生物表面活性剂主要由细菌或酵母代谢产生<sup>[3]</sup>, 包括糖脂、脂肽、多糖-蛋白质复合物、磷脂、脂肪酸和中性脂质等<sup>[4]</sup>。生物表面活性剂可利于分解环境中的污染物, 如石油和农药残留物等, 生物表面活性剂分解代谢的产物对

自然环境是无害的, 并且生物表面活性剂对环境具有一定的修护作用<sup>[3]</sup>。脂肽类生物表面活性剂具有代表性的产出菌是枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)<sup>[5]</sup>, 该菌广泛存在于自然界中, 对自然界中的动植物的危害微乎其微<sup>[6]</sup>。有研究表明生物表面活性剂的乳化性可以降解石油<sup>[7]</sup>, 因此在原油开采工业上对提高石油采收率有很重要的作用<sup>[8]</sup>。随着工业技术的不断创新与发展, 生物表面活性剂在各大领域的应用也越来越广泛, 在工业、农业、医疗和化妆品等领域均有应用<sup>[9-14]</sup>。与化学合成活性剂相比, 生

物表面活性剂在结构上具有多样的特点,低毒性,利于自然环境的可持续发展<sup>[14]</sup>。

天然的 surfactin 是由 13–15 个碳原子构成的 $\beta$ -羟基脂肪酸链和七肽组成的环状脂肽的混合物<sup>[15–17]</sup>。生物表面蛋白类似物有 20 多种脂肽,基本是由 LLDLLDL 的手性氨基酸构成的七肽<sup>[1]</sup>。表面活性蛋白是具有亲水性和疏水性的两亲性分子,脂肪酸链与极性分子相连,不仅能增加化合物的溶解度,而且能增加生物利用率,也能降低不同状态物质的表面张力或者界面张力<sup>[18]</sup>。

本文利用产物溶血性对土壤样本进行初步筛选<sup>[15]</sup>。溶血性已经成为初筛生物表面活性剂的有效标准,但并非溶血性是表面活性剂的特有性质,一些蛋白酶类也有溶血性,溶血也并不是表面活性剂的唯一特性<sup>[17]</sup>。表面活性剂带有负电荷,不会直接与酸碱指示剂溴百里酚蓝(bromothymol blue, BTB)结合反应,带阳离子的氯化十六烷基吡啶(cetylpyridinium chloride, CPC)可以和表面活性素强烈结合反应,在氯化十六烷基吡啶和溴百里酚蓝(CPC-BTB)的混合溶液中加入表面活性素可与氯化十六烷基吡啶和溴百里酚蓝的复合物竞争氯化十六烷基吡啶,从而释放出溴百里酚蓝,这个过程中有明显的颜色变化,从黄绿色变成亮蓝色<sup>[19]</sup>。本文结合溶血筛选和氯化十六烷基吡啶加溴百里酚蓝混合溶液的显色反应这两种方法,高效快速的从土壤中筛选出较高产表面活性素的野生型菌株。本研究将为高效及高通量筛选野生型生产表面活性素菌株提供一定的理论基础和一定的技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品、培养基和仪器

#### 1.1.1 实验样品

用于分离筛选产生物表面活性剂的土壤样

品采集于广东省佛山市某加油站,该样品受到原油长时间浸染。

#### 1.1.2 培养基

种子培养基(LB 液体培养基, g/L): NaCl 10, 酵母提取物 5, 胰蛋白胨 10, pH 调至 7.2。

LB 固体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, NaCl 10, 酵母粉 5, 琼脂粉 15。

血琼脂平板: LB 固体培养基中添加 5%的无菌脱纤维羊血(广州鸿泉生物科技有限公司)。

营养肉汤培养基(nutritious broth, NB 培养基), 广东环凯微生物科技有限公司。

发酵培养基(Landy 培养基, g/L): 葡萄糖 20, L-谷氨酸 5, MgSO<sub>4</sub> 0.5, KCl 0.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.000 15, MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 0.005, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 0.000 16, 增加 1 g/L 的酵母粉(作为生长因子), 调 pH 至 7.0 (试剂均购自上海麦克林生化科技有限公司)。

#### 1.1.3 仪器和设备

ZQZY-78CE 振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; Vir Tis Bench Top Pro 冷冻干燥机、SP Scientific、JM50-Plus 真空离心浓缩仪, 北京吉艾姆科技有限公司; 傅立叶变换红外光谱仪 Bruker/TENSORII, BRUKER 公司; Eppendorf Centrifuge 5804R 离心机、Bio-Rad T100 PCR 仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; L-8900 氨基酸分析仪, 日立高新技术(上海)国际贸易有限公司; 液相色谱-质谱联用赛默飞-U3000, 安捷伦科技有限公司。

### 1.2 生物表面活性剂菌株的筛选

#### 1.2.1 样本处理

对土壤样本采取 2 套方案处理样品: 一是直接取适量土壤样品用 2 mL 无菌 0.9% NaCl 溶液充分振荡, 去除上层漂浮的杂质, 取 100  $\mu$ L 溶有土壤样品的上清液, 于含有 900  $\mu$ L 0.9% NaCl 溶液的 1.5 mL EP 管中充分混匀, 记为 10<sup>0</sup>,

再取  $10^0$  样液 100  $\mu\text{L}$  于 900  $\mu\text{L}$  0.9% NaCl 溶液混匀, 记为  $10^{-1}$ , 依次按体积稀释, 直到  $10^{-7}$ , 然后取 100  $\mu\text{L}$  梯度稀释的样液于 LB 固体平板上均匀涂布, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱培养至有单菌落长出。将单菌落挑取到含有 NB 半固体培养基的 96 孔板中 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱培养待有明显菌落长出, 转移到 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。二是取适量样本土壤充分振荡使其溶于 LB 中, 再将样品置于 80  $^{\circ}\text{C}$  水浴加热 20 min, 目的是除去大肠杆菌等非芽孢菌的干扰。然后梯度稀释, 涂布到 LB 平板上, 重复上述操作, 保存单菌落于 96 孔板中, 待后续用于进一步的筛选。

### 1.2.2 血平板与氯化十六烷基吡啶和溴百里酚蓝显色反应筛选

将分离保存的菌落转接到含有 5% 无菌脱纤维绵羊血的 LB 琼脂平板上, 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 12 h 左右观察溶血圈出现的情况。将有溶血圈的菌株在 96 孔板对应的位置上挑取, 集中在新的 NB 半固体培养基上, 再一次培养保存。将具有溶血圈的菌株转接到含有 2 mL LB 液体培养基的 96 深孔板中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床 180 r/min 的条件下发酵培养 24 h, 发酵液在常温下使用 10 000 $\times g$  离心 15 min, 收集无细胞的上清液并保存于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱, 用于氯化十六烷基吡啶和溴百里酚蓝显色反应(溶血实验与显色反应可同时进行)。按照文献[19]所述进行氯化十六烷基吡啶和溴百里酚蓝显色反应, 0.1 mol/L PBS ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 8.0)、0.2 mmol/L 氯化十六烷基吡啶和 0.2 mmol/L 溴百里酚蓝三者等量混合, 取 800  $\mu\text{L}$  氯化十六烷基吡啶和溴百里酚蓝混合溶液与 100  $\mu\text{L}$  发酵液无细胞上清在 48 孔板中常温下反应 5 min, 使用酶标仪测得发酵液无细胞上清在 600 nm 处的吸光值, 相互对照并选择值相对较高者单独保存, 为后续实验做准备。

### 1.2.3 生理生化实验

经过多次实验筛选, 选定一株编号为 SX-20 的表面活性较明显菌株, 为确定其菌种属进行如下实验: 高倍显微镜下观察形态; 革兰氏染色试剂盒(广东环凯微生物科技有限公司), 按照试剂盒的说明书进行操作, 对菌株进行革兰氏染色; API 实验, 根据试剂盒的说明书进行操作, 使用 *Bacillus subtilis* ATCC 21332 为对照菌株。在培养长有单菌落的平板上挑取适量的菌体, 按要求加入对应的反应孔。37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养过夜, 根据菌液反应颜色变化对照结果判读表, 读出并记录阴阳性, 并在系统中进行比对, 确定菌株的种属关系。

### 1.2.4 16S rRNA 基因的体外扩增、测序和系统发育树

挑取适量待提取总 DNA 菌株的单菌落, 混入 1 mL 的无菌去离子水中, 采用珠磨法使其细胞壁细胞膜充分破碎, 暴露出核酸, 利用通用引物 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'; 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 在热启动 *Taq* 聚合酶的作用下, 扩增目的菌株的 16S rRNA 基因。热循环程序如下: 95  $^{\circ}\text{C}$ , 3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$ , 15 s, 56  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ , 15 s; 循环 34 次, 72  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min。将扩增出目的片段的 PCR 产物与质粒载体 pUC19 在连接酶的作用下 16  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 将连接完成的质粒转化到大肠杆菌中, 利用含氨苄西林(ampicillin, Amp)、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG)、 $\beta$ -半乳糖苷酶(X-Gal)的琼脂平板进行蓝白斑筛选, 选取白斑菌落, 利用通用引物 M13F: 5'-TGAAAACGACGGC CAGT-3'; M13R: 5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3'进行菌落 PCR, 然后进行测序, 菌株的 16S rRNA 基因序列上传到 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)与模式菌株进行比

对分析。然后用 MEGA X 软件, 采用临近法计算 1 000 次比对重复验证, 并构建进化树。

### 1.3 生物表面活性剂的发酵

将甘油保存的菌株于 LB 平板上划线 37 °C 恒温过夜培养, 挑取单菌落转接到适量的 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 制成种子液, 种子液的  $OD_{600}$  值在 1 左右。根据 Landy 等<sup>[20]</sup>的研究, 采用改进过的 Landy 培养基, 100 mL 无菌培养基接种 5 mL 的种子液(5%, 体积分数), 并在 37 °C、180 r/min 条件下培养 36 h。

### 1.4 生物表面活性剂的提取

对表面活性蛋白的提取采用酸沉淀和甲醇萃取的方法<sup>[13]</sup>。液体发酵培养 36 h 后的发酵液, 在常温下 10 000×g 的高速离心机中离心 15 min, 去除细菌细胞, 收集无细胞上清液(cell free supernatant, CFS), 使用 6 mol/L HCl 调节发酵上清的 pH, 使其最终的 pH 约为 2.0, 然后置于 4 °C 冰箱过夜沉淀。将酸沉淀后的发酵液在 4 °C 10 000×g 的条件下离心 10 min, 以获取沉淀物, 收集沉淀物加入适量的无菌去离子水溶解, 并用 11 mol/L NaOH 溶液将 pH 调至中性, 然后过夜冻干。冻干后的提取样加入适量的甲醇溶液回溶, 振荡使其充分溶解, 然后在常温下 10 000×g 离心 10 min, 去除沉淀, 收集上清液, 并过 0.22 μm 的有机相滤膜, 将过膜后的溶有表面蛋白的甲醇溶液在 45 °C 下真空旋转蒸发干燥, 收集表面活性蛋白粗提取物样品, 待后续验证实验使用。

### 1.5 抑菌实验

为验证产物的抑菌性, 选取大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、痤疮丙酸杆菌 IV (*Propionibacterium acnes* IV) (菌种均为本实验室所保存)作为指示菌株。采取平板打孔法进行抑菌实验, 抑菌样品浓度为 2 g/L, 上样量为 50 μL。大肠杆菌和金色葡萄球菌在 37 °C 恒温培养箱培养 24 h,

观察抑菌圈大小。痤疮丙酸杆菌属于厌氧菌, 在 37 °C 恒温厌氧培养箱中培养 48 h, 再观察记录抑菌圈。用已知的产表面活性蛋白的菌株枯草芽孢杆菌 ATCC 21332 (*Bacillus subtilis* ATCC 21332)作阳性对照, 溶质无菌水做阴性对照。

### 1.6 傅里叶变换红外质谱

为了推断筛选得到菌株产物中的化学键和官能团的整体性质, 将经过酸沉淀甲醇萃取, 真空旋转蒸发干燥后收集到的粗产物, 使用傅里叶变换红外光谱对产物进行分析。取提前干燥的溴化钾(KBr) 100 mg 和 1 mg 产物充分研磨, 使粗产物与溴化钾完全混合磨细后负载加压 30 s 制成半透明的压片, 在 400  $\text{cm}^{-1}$  到 4 000  $\text{cm}^{-1}$  之间收集分辨率为 2  $\text{cm}^{-1}$  的 FTIR 的光谱数据, 并进行分析。

### 1.7 氨基酸分析

关于获取产物中所含的氨基酸种类及含量, 进行了氨基酸种类分析, 使用耐高温的专用反应试剂瓶, 取浓度为 2 mg/mL 的样品适量, 按体积比 1:1 与 12 mol/L HCl 混合, 使最终 pH 为 6, 在油浴锅中 120 °C 反应 2 h, 油浴结束后, 开盖在 80 °C 的恒温沙子中蒸干水分, 样品进行预处理后, 使用氨基酸分析仪进行分析, 并使用氨基酸标准品作为对照。

### 1.8 LC-MS 分析

将筛选所得菌株 SX-20 的发酵产物经过提取旋转蒸发干燥, 液相色谱-气质色谱联用(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)对其粗产物进行结构分析。淡黄色粉末状样品用无菌去离子水溶解, 过 0.22 μm 的水相滤膜, 制成样品待使用。气相色谱电喷雾电压设置最高为 5 000 V, 毛细管温度设置为 320 °C, 鞘气(sheath gas) 45.00 arb, 辅助气体(aux gas) 20.00 arb, 最大喷雾电流(max spray current) 80.00 uA, 液相色谱-大气压化学电离串联四极杆质谱正离子监测模式, 液相分析柱为 ZORBAX SB-CN 4.6 mm×75 mm, 3.5 μm, 流

动相 A: 甲醇、B: 0.1%甲酸水, 柱温 30 °C、流速 0.4 mL/min, 进样 20  $\mu$ L, 得到 LC、MS1、MS2 图谱。

## 2 结果与分析

### 2.1 筛选结果及菌株鉴定

经过初步筛选和氯化十六烷基吡啶和溴百里酚蓝显色反应复筛, 以及产物特性的初步筛选, 从原油污染的土壤中挑取的 1 000 多株菌株中, 挑选出表现较好溶血性和显色值较高的单菌落, 从这些菌株中选择其中表现较其他菌株更好的, 最后选定一株, 编号为 SX-20。

对 SX-20 生理生化的实验结果显示, 该菌的单菌落周围不规则, 表面粗糙, 呈白色不透明, 为革兰氏阳性菌, 在光学显微镜 10 $\times$ 100 倍下呈柱状或者短棒状, 芽孢位于菌体中央或稍偏, 如图 1A、1B 所示; API 50 CH 及 20E 实验结果显示该菌与 *Bacillus subtilis* 的相似度为 99.7%, 结果如表 1 所示。提取菌株 SX-20 的 16S rRNA 测序, 与 *Bacillus subtilis* NCIB 3 610 (T) 的相似度为 99.80%, 得到图 2 所示的进化树, 结果显示菌株 SX-20 与 *Bacillus subtilis* NCIB 3 610 (T) 在同一分支上, 结合生理生化实

验结果<sup>[21]</sup>可鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌。

### 2.2 筛选菌株发酵产物的抑菌作用

筛选所得菌株 SX-20 的产物, 对大肠杆菌、金色葡糖球菌、痤疮丙酸杆菌具有抑制生长的作用, 对痤疮丙酸杆菌的抑制作用在之前的报道中几乎没有。抑菌圈如图 3 所示, 用溶剂无菌去离子水做阴性对照, 已知产脂肽的菌株 *Bacillus subtilis* ATCC 21332 做阳性对照。图 3A 为粗产物对大肠杆菌的抑制效果, 图 3B 为粗产物对金色葡萄球菌的抑制效果, 图中阳性对照 *Bacillus subtilis* ATCC 21332 与实验菌株 SX-20 对应的孔均有明显的抑菌圈, 阴性对照没有抑菌圈。图 3C 是 SX-20 粗产物对痤疮丙酸杆菌 IV 的抑制效果, 在无氧条件下 20  $\mu$ L 粗产物对痤疮丙酸杆菌 IV 具有明显的抑制效果(抑菌圈有重叠部分), 图 3D 为 SX-20 粗产物对痤疮丙酸杆菌 IV 完整的抑菌圈图。综上所述, 该菌的发酵产物可抑制大肠杆菌、金色葡糖球菌以及痤疮丙酸杆菌的生长。

### 2.3 发酵产物鉴定

菌株 SX-20 的发酵产物经酸沉淀法提取后, 呈淡黄色粉末状, 发酵提取物含量约为 1.03 g/L。傅里叶变换红外质谱去除水分和二氧化碳后的峰图如图 4 所示, 红外图谱在 3 396  $\text{cm}^{-1}$  (N-H

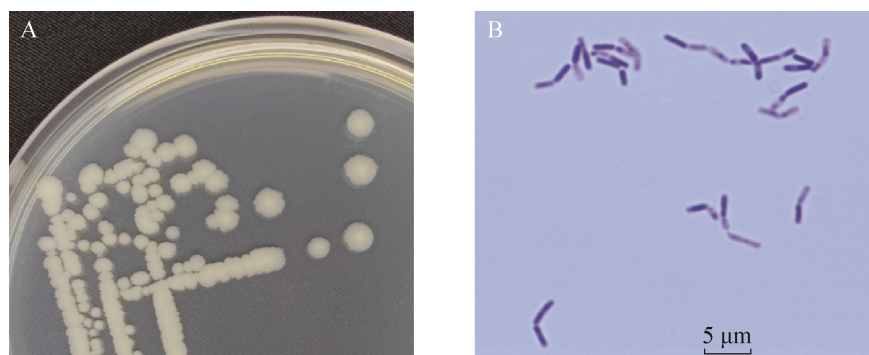


图 1 菌株 SX-20 的单菌落和革兰氏染色

Figure 1 Single colony and Gram staining of strain SX-20. A: Single colony morphology of strain SX-20, single colony around irregular, rough surface and opaque. B: Gram staining of strain SX-20 (imaging under optical microscope 10 $\times$ 100 times, spores in the central/paracentral), spores located in the center or paracentral.

表 1 SX-20 菌株的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain SX-20

Characteristic	1	2	Characteristic	1	2
Spore location	C/P	C/P	Colony color	CW	CW
Pigmentation	O	O	Control	—	—
Glycerol	+	+	Salicin	+	+
Erythritol	—	—	D-cellobiose	+	+
D-arabinose	—	—	D-malt sugar	+	+
L-arabinose	+	+	D-lactose	—	—
D-ribose	+	+	D-melibiose	+	+
D-xylose	+	+	D-sucrose	+	+
L-xylose	—	—	D-trehalose	+	+
D-adonitol	—	—	Inulin	+	+
Methyl- $\alpha$ -D-xylopyranoside	—	—	D-raffinose	—	—
D-galactose	—	—	D-raffinose	+	+
D-glucose	+	+	Starch	+	+
D-fructose	+	+	Glycogen	+	+
D-mannose	+	+	Xylitol	—	—
L-sorbose	—	—	D-gentiobiose	+	+
L-rhamnose	—	—	D-toulon sugar	—	—
Melampyrite	—	—	D-lyxose	—	—
Cyclohexitol	+	+	D-tagatose	—	—
Mannitol	+	+	D-fucose	—	—
Sorbitol	+	+	L-fucose	—	—
Methyl- $\alpha$ -D-pyranoside	—	—	D-arabitol	—	—
Methyl- $\alpha$ -D-glucoside	+	+	L-arabitol	—	—
N-acetylglucosamine	—	—	Potassium gluconate	—	—
Amygdalin	+	+	Potassium 2-ketogluconic acid	—	—
Arbutin	+	+	Potassium 5-ketogluconic acid	—	—
Esculin and ferric citrate	+	+	2-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	+	+
Decomposition under anaerobic conditions of: Arginine	—	—	Decomposition of urea	—	—
Lysine	—	—	Decomposition of: Tryptophan	—	—
Ornithine	—	—	Production of indole	—	—
Utilization of citrate	—	—	Voges-proskauer reaction	+	+
Hydrogen sulfide production test	—	—	Gelatin liquefaction	+	+

1: *Bacillus subtilis* ATCC 21332; 2: Strain SX-20; C: Central; C/P: Central/Paracentral; P/S: Paracentral/Subterminal; S: Subterminal; O: Opaque; CW: Creamy-white. +: Positive; —: Negative.

键的拉伸模式)和  $1\,649\text{ cm}^{-1}$  (CO—N 键的拉伸模式) 处具有肽特征的条带,在  $1\,415\text{ cm}^{-1}$  和  $1\,252\text{ cm}^{-1}$  处的峰显示的是脂肪族链(—CH<sub>3</sub>、—CH<sub>2</sub>)的部分, 这些峰表明产物样品中存在脂肪族碳氢化合物以及肽链部分<sup>[22]</sup>。在相同的波数范围内存在 N—H 键、CO—N 键和—CH<sub>3</sub>、—CH<sub>2</sub> 部分的拉伸模式的峰图, 这表明菌株 SX-20 产生的生物表面

活性剂与表面蛋白的结构具有相似的部分。

发酵产物粗提取物氨基酸分析结果如图 5A、5B 所示, SX-20 的粗提取产物中含 14 种氨基酸: Asp、Thr、Ser、Glu、Gly、Ala、Val、Met、Ile、Leu、Tyr、Phe、Lys 和 Arg, 其中 Asp、Glu、Val 和 Leu 的摩尔含量分别为 6.875、17.542、7.272、27.138 nmol, Asp、Glu、Val

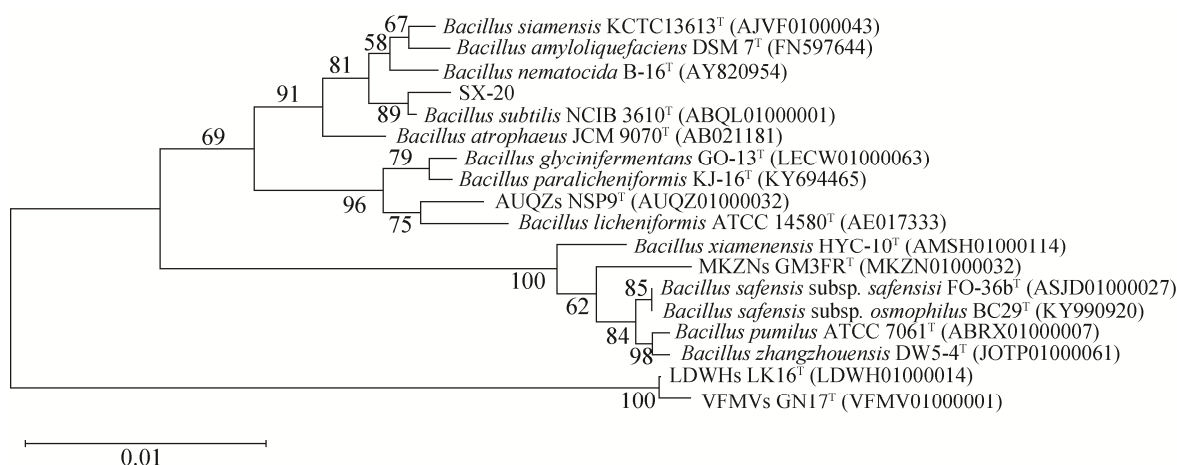


图2 基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationship between strain SX-20 and closely related species in the *Bacillus subtilis*. Bootstrap values were expressed as a percentage of 1 000 replications. Only bootstrap values of more than 50% are shown. Bar: 0.01 substitutions per nucleotide position. Numbers at nodes are percentage bootstrap values based on 1 000 replicates.

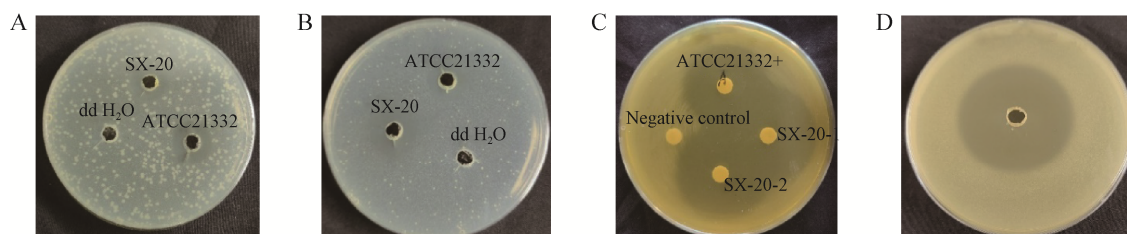


图3 大肠杆菌(A)、金色葡萄球菌(B、C)和痤疮丙酸杆菌IV(D)的抑菌圈

Figure 3 Inhibition zone of *Escherichia coli* (A), *Staphylococcus aureus* (B, C) and *Propionibacterium acnes* IV (D).

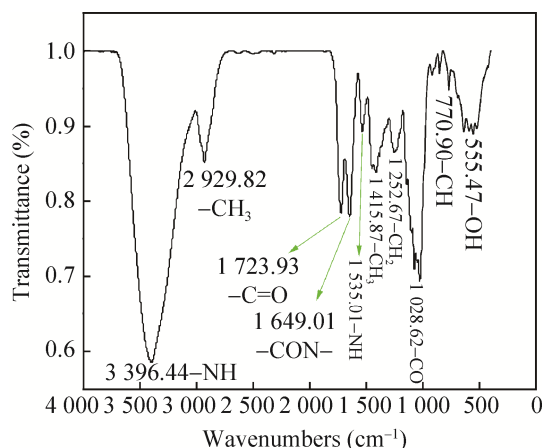


图4 菌株SX-20发酵产物FTIR图谱

Figure 4 FTIR spectra of fermentation products of strain SX-20.

与 Leu 摩尔含量比值接近于 1:2.5:1:4, 与文献中报道的 Asp、Glu、Val 和 Leu 比值为 1:1:1:4 相似<sup>[19]</sup>, 不同在于 Glu 含量更高, 原因可能是本研究发酵培养基中加入了大量的谷氨酸作为发酵的前体物质, 但其他 3 种主要氨基酸的摩尔含量比例与参考文献中相似。结合红外光谱图和氨基酸分析, 可初步判断所提取的该菌株粗产物是表面活性蛋白。液相-质谱联用在正离子监测模式得到 SX-20 发酵产物的液相图谱主峰在 10.27 (图 6A), 对 10.27 处进行质谱分析, 得到样品的一级质谱图(图 6B), 分析可得样品分子式为 C<sub>53</sub>H<sub>94</sub>O<sub>13</sub>N<sub>7</sub>, 分子质量为 1 036.689 3,

这与文献中报道的分子式和质量是一致的。然后对一级质谱主峰 1 036.689 3 进行二次分析, 得到二级质谱图(图 6C)。将二级质谱图与网站 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/surfactin>

factin#section=LC-MS)进行对比, 可得出该菌株产物的结构(图 7), 结合氨基酸分析可得出菌株 SX-20 的产物是含 C15 的脂肪酸链, 氨基酸顺序为 Leu-Leu-Asp-Val-Leu-Leu-Glu 的 surfactin C。

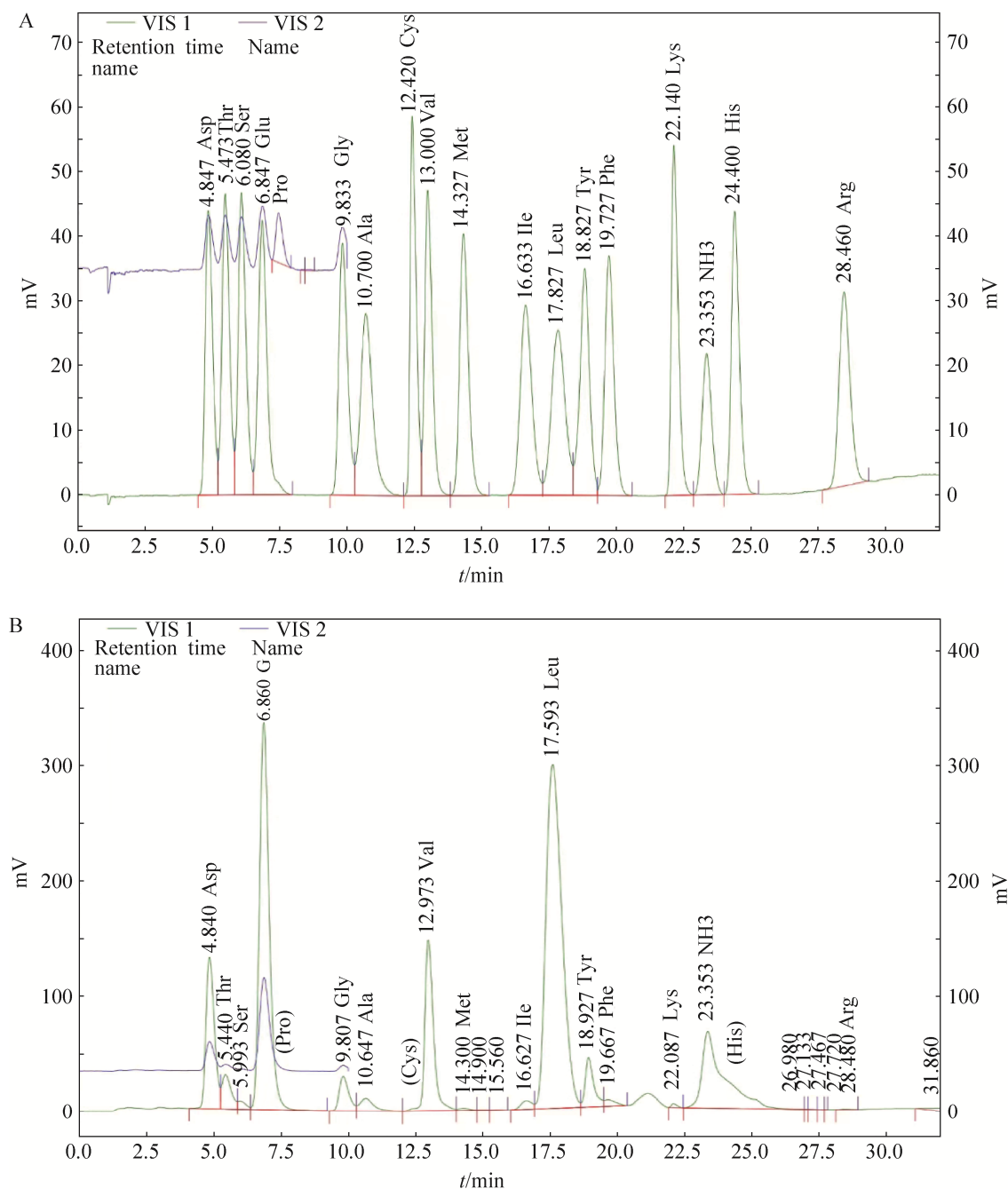


图 5 SX-20 菌株发酵提取物氨基酸分析

Figure 5 Amino acid analysis of fermentation extract from strain SX-20. A: Amino acid standard sample analysis chart. B: Analysis of fermentation products of strain SX-20.

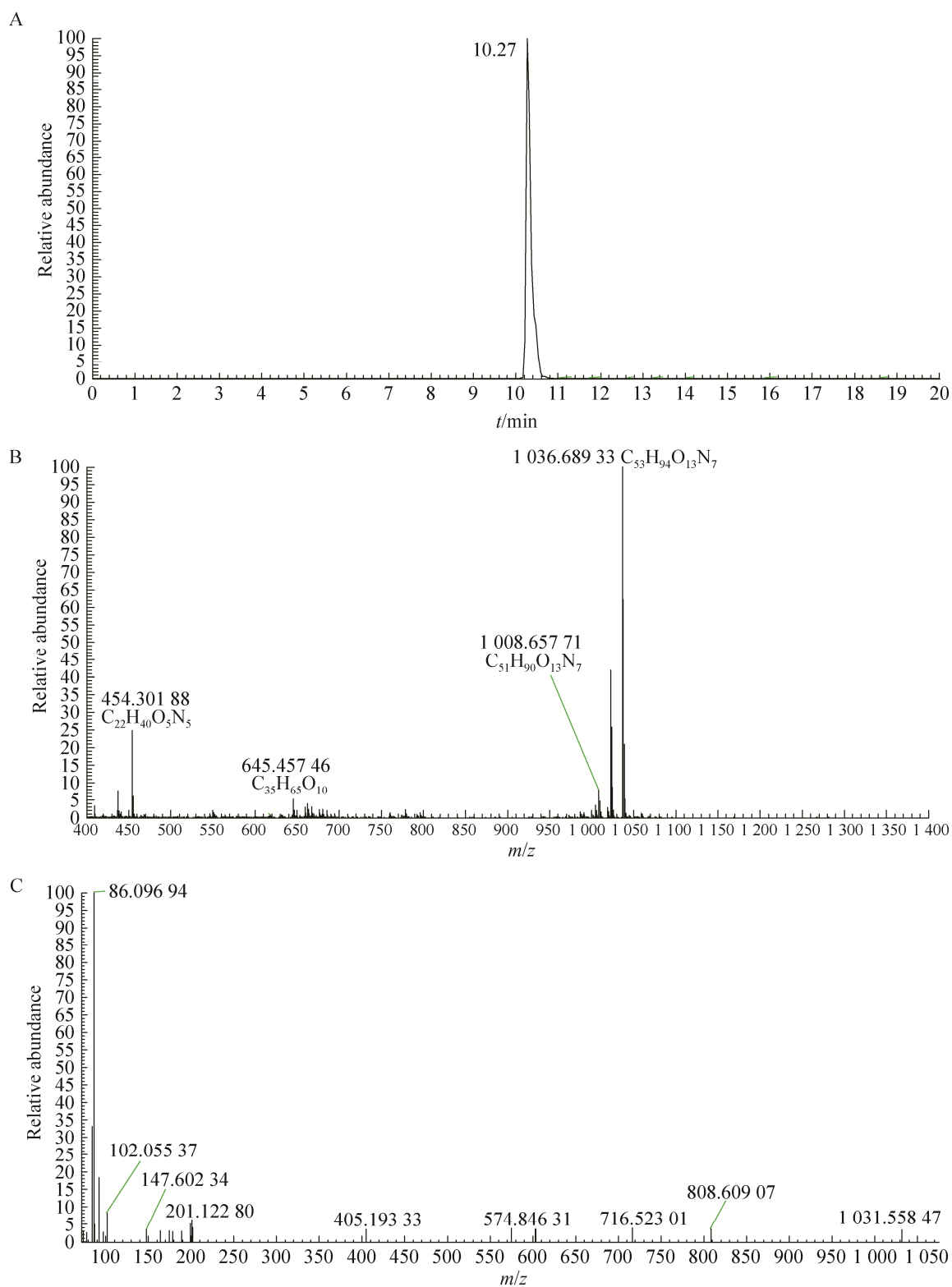


图 6 菌株 SX-20 发酵产物的图谱分析

Figure 6 Analysis of the fermentation products of strain SX-20. A: Liquid phase diagram of the fermentation products. B: Primary liquid phase mass spectra. C: Secondary mass spectra.

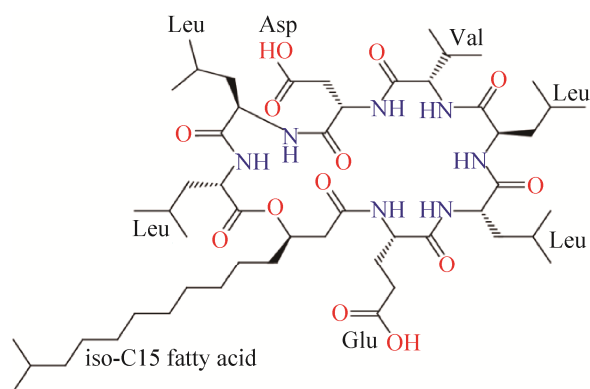


图 7 菌株 SX-20 发酵产物的结构

Figure 7 Structure diagram of strain SX-20 fermentation product.

### 3 讨论与结论

本文通过借鉴杨欢等的高通量 CPC-BTB 显色法结合溶血性和抑菌性，高效地从原油污染的土壤样本中筛选得到一株产表面活性剂的菌株，枯草芽孢杆菌 SX-20。结合 2 种方法可高效简便地从土壤样本中有目的地筛选出目的菌种。菌株 SX-20 的发酵产物经过酸沉淀、甲醇萃取等处理后得到粗产物，其含量为 1.03 g/L。对菌株 SX-20 的粗产物进行 FTIR 分析其中的化学键和官能团，氨基酸分析粗产物中所含氨基酸种类和含量，初步确定产物类型，然后利用 LC-MS 对粗产物进行结构分析，得出该粗产物的分子式为  $C_{53}H_{94}O_{13}N_7$ ，结构分析得出产物是含 C15 脂肪酸链的 surfactin C，综合分析可知其氨基酸顺序为 Leu-Leu-Asp-Val-Leu-Leu-Glu。SX-20 发酵产物对痤疮丙酸杆菌的抑制效果比较明显，在此之前对痤疮丙酸杆菌的抑制作用报道较少。对大肠杆菌、金色葡萄球菌均具有抑制作用，另外发现该产物对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌表现出不同的抑制作用，经分析这个表面活性剂的结构跟已发现的酯肽类生物表面活性剂不完全一样，这可能与其抑菌效果的表现有关，具体机理以后将进一步探讨。表

面活性剂是一种新型化学品，在提高石油采收率和微生物采油、农业、生物修复环境、化妆品和医疗保健、食品等方面具有巨大前景。本研究为更高效、准确地筛选得到表面活性剂的生产菌株提供了技术路线，以及更好地应用表面活性剂提供了理论基础。

### 致谢

感谢中国科学院广州分院广东省微生物研究所的施庆珊研究员在选题上的帮助，感谢实验组的成员在实验中的帮助以及广东省科学院微生物研究所提供的实验设备和实验环境，以及昆明理工大学生命科学与技术学院的张琦教授的大力支持和关心。

### 参考文献

- [1] SOBERÓN-CHÁVEZ G. Biosurfactants[M]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [2] LIN SC. Review biosurfactants: recent advances[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 1996, 66(2): 109-120.
- [3] MNIF I, GHRIBI D. Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications[J]. *Biopolymers*, 2015, 104(3): 129-147.
- [4] FEI D, LIU FF, GANG HZ, LIU JF, YANG SZ, YE RQ, MU BZ. A new member of the surfactin family produced by *Bacillus subtilis* with low toxicity on erythrocyte[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 94: 164-171.
- [5] 王大威, 刘永建, 林忠平, 杨振宇, 郝春雷. 一株产生脂肽的枯草芽孢杆菌的分离鉴定及脂肽对原油的作用[J]. *微生物学报*, 2008, 48(3): 304-311.  
WANG DW, LIU YJ, LIN ZP, YANG ZY, HAO CL. Isolation and identification of surfactin producing *Bacillus subtilis* strain and its effect of surfactin on crude oil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(3): 304-311 (in Chinese).
- [6] YAO L, SELMI A, ESMAEILI H. A review study on new aspects of biodemulsifiers: production, features and their application in wastewater treatment[J]. *Chemosphere*, 2021, 284: 131364.

- [7] BANAT IM. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review[J]. Bioresource Technology, 1995, 51(1): 1-12.
- [8] JAHANBANI VESHAREH M, GANJI AZAD E, DEIHIMI T, NIAZI A, AYATOLLAHI S. Isolation and screening of *Bacillus subtilis* MJ01 for MEOR application: biosurfactant characterization, production optimization and wetting effect on carbonate surfaces[J]. Journal of Petroleum Exploration and Production Technology, 2019, 9(1): 233-245.
- [9] GARCÍA-REYES S, YÁÑEZ-OCAMPO G, WONG-VILLARREAL A, RAJARETINAM RK, THAVASIMUTHU C, PATIÑO R, ORTIZ-HERNÁNDEZ ML. Partial characterization of a biosurfactant extracted from *Pseudomonas* sp. B0406 that enhances the solubility of pesticides[J]. Environmental Technology, 2018, 39(20): 2622-2631.
- [10] GHARAEI-FA E. Biosurfactants in pharmaceutical industry (a mini-review)[J]. American Journal of Drug Discovery and Development, 2010, 1(1): 58-69.
- [11] 邹青青, 欧阳琛琛, 堀川贵生, 柳泽惠広, 长野卓人. 具有环状肽结构的生物表面活性剂: 枯草菌脂肽钠[J]. 中国洗涤用品工业, 2016(2): 50-54.  
ZOU QQ, OUYANG CC, HORIKAWA TAKAO, YANAGISAWA SATOHIRO, NAGANO TAKUTO. Green surfactant with unique cyclic peptides—KANEKA surfactin[J]. China Cleaning Industry, 2016(2): 50-54 (in Chinese).
- [12] PINTO AP, SERRANO C, PIRES T, MESTRINHO E, DIAS L, TEIXEIRA DM, CALDEIRA AT. Degradation of terbuthylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures[J]. Science of the Total Environment, 2012, 435/436: 402-410.
- [13] ZHAO PC, XUE Y, LI X, LI JH, ZHAO ZQ, QUAN CS, GAO WN, ZU XY, BAI XF, FENG SX. Fungi-derived lipopeptide antibiotics developed since 2000[J]. Peptides, 2019, 113: 52-65.
- [14] OLASANMI I, THRING R. The role of biosurfactants in the continued drive for environmental sustainability[J]. Sustainability, 2018, 10(12): 4817.
- [15] LIU Q, LIN JZ, WANG WD, HUANG H, LI S. Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 93: 31-37.
- [16] 潘冰峰, 徐国梁, 施邑屏, 李江云, 李祖义. 生物表面活性剂产生菌的筛选[J]. 微生物学报, 1999, 39(3): 264-267.  
PAN BF, XU GL, SHI Y(B/P), LI JY, LI ZY. Screening of biosurfactant producing bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1999, 39(3): 264-267. (in Chinese).
- [17] 刘向阳, 杨世忠, 牟伯中. 微生物脂肽的结构[J]. 生物技术通报, 2005(4): 18-26.  
LIU XY, YANG SZ, MOU BZ. Molecular structures of microbial lipopeptides[J]. Biotechnology Information, 2005(4): 18-26 (in Chinese).
- [18] PŁAZA GA, ZJAWIONY I, BANAT IM. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils[J]. Journal of Petroleum Science and Engineering, 2006, 50(1): 71-77.
- [19] YANG H, YU HM, SHEN ZY. A novel high-throughput and quantitative method based on visible color shifts for screening *Bacillus subtilis* THY-15 for surfactin production[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2015, 42(8): 1139-1147.
- [20] LANDY M, WARREN GH. Bacillomycin; an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine: New York, N Y, 1948, 67(4): 539-541.
- [21] GATSON JW, BENZ BF, CHANDRASEKARAN C, SATOMI M, VENKATESWARAN K, HART ME. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(Pt 7): 1475-1484.
- [22] AL-WAHAIBI Y, JOSHI S, AL-BAHRY S, ELSHAFIE A, AL-BEMANI A, SHIBULAL B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 114: 324-333.