

# 一株产脂肽类表面活性剂的碱性 *Dietzia* 菌 及特性研究

陈露<sup>1,2</sup> 李淑芹<sup>1\*</sup> 薛燕芬<sup>2</sup>

(1. 东北农业大学 黑龙江 哈尔滨 150030)

(2. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

**摘要:** 【目的】筛选降解性能良好的产生物表面活性剂的菌株, 对其进行分类学鉴定, 确定所产表面活性剂物质并对各影响因素进行评价。【方法】利用液体石蜡为底物筛选降解性能良好的产生物表面活性剂菌株, 通过形态特征观察、生理生化测定、16S rRNA 基因序列分析等实验确定菌株的分类地位。通过排油圈活性、表面张力值、薄层层析等方法确定生物表面活性剂的性质, 分析碳、氮源和温度、pH、盐浓度各因素对菌株产生物表面活性剂的影响。【结果】从大连新港采集的样品中分离得到一株产表面活性剂的嗜碱菌株 3372, 经分类鉴定表明其是 *Dietzia cercidiphylli* 的新菌株。嗜碱菌 3372 发酵液粗提物的排油直径为 6.1 cm, 表面张力可从 67.62 mN/m 降到 32.95 mN/m, 经薄层层析分析, 初步鉴定为脂肽类表面活性剂。综合各因素对发酵液表面活性的影响, 菌株 3372 在 pH 为 9.0、适盐浓度为 3% 的培养基中, 经 30 °C 培养可将发酵液表面张力值降到最低。【结论】嗜碱菌 3372 是脂肽类生物表面活性剂产生菌的新成员, 其高盐碱条件下产生表面活性剂的特性在工业应用上有一定的潜力。

**关键词:** 生物表面活性剂, 脂肽, 嗜碱菌, 迪茨菌属

# Characterization of an alkaliphilic biosurfactant-producing strain of *Dietzia*

CHEN Lu<sup>1,2</sup> LI Shu-Qin<sup>1\*</sup> XUE Yan-Fen<sup>2</sup>

(1. College Resource and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

(2. Laboratory of Extremophiles, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** [Objective] Isolating and characterizing biosurfactant-producing bacteria. [Methods] Biosurfactant-producing bacteria were isolated by enrichment method. The morphological, biochemical and physiological characteristics and 16S rRNA gene sequence were determined to identify the taxonomic position of strain 3372. The optimal conditions for the growth and biosurfactant production of strain 3372 were investigated. [Results] Strain 3372 was isolated from marine water sample. It grows from pH 7.0 to 11.0 (optimum at pH 9.0), from 10 °C to 45 °C (optimum at 30 °C) and up to 12 % salinity. 16S rRNA gene sequence analysis showed that the strain belonged to the genus *Dietzia* and most closely related to *Dietzia cercidiphylli*. Strain 3372 was able to grow and reduce the surface tension of culture broth to 32.95 mN/m when cultured using paraffin as sole carbon source at pH 9.0 and 3% salinity. The biosurfactants produced by strain 3372 was identified as lipopeptides by thin layer chromatography. [Conclusion] Strain 3372 was a new alkaliphilic member of lipopeptides-producing bacteria, which has potential application in the processes where high pH is common.

**Keywords:** Biosurfactant, Lipopeptides, Alkaliphiles, *Dietzia* sp.

生物表面活性剂是一类具有表/界面张力活性的微生物代谢产物,是由亲水基和疏水基构成的两亲化合物。与化学合成的表面活性剂相比,生物表面活性剂具有更好的选择性、可降解性、无毒性并且更具环境兼容性。目前来源于细菌<sup>[1]</sup>、真菌<sup>[2]</sup>、放线菌<sup>[3]</sup>的生物表面活性剂均已得到了不同程度的相关报道,且已成为医药、食品、化妆品、环境治理以及微生物采油等领域的研究热点<sup>[4]</sup>。

产生物表面活性剂的极端微生物由于其能够在特定的严苛条件下生长,且发挥降解优势而得到国内外研究学者的广泛关注。其中耐热菌<sup>[5]</sup>、

嗜冷菌<sup>[6]</sup>、嗜盐菌<sup>[7]</sup>已有相关报道,而嗜碱微生物产生物表面活性剂的研究罕见报道。嗜碱微生物是指菌株的最适生长 pH 在 9.0–10.0 之间,而在 pH 6.5 左右时不能生长或仅能缓慢生长的微生物<sup>[8]</sup>,在实际生产生活中碱性条件下产生物表面活性剂的菌株在去除金属离子污染、处理工业废水等研究领域更具应用开发价值<sup>[9–10]</sup>。本文从大连新港采集的海水样品中筛选得到一株产生物表面活性剂的嗜碱菌 3372,对其分类学特性和所产生物表面活性剂性质进行了分析,提供了碱性条件下产生物表面活性剂的新资源。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源:** 产生物表面活性剂的菌株 3372 分离自中国大连新港受溢油污染的海水样品。

**1.1.2 培养基:** 2216 人工海水培养基: NaCl 19.45 g, MgCl<sub>2</sub> 8.8 g, Peptone 5.0 g, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 3.24 g, CaCl<sub>2</sub> 1.8 g, Yeast extract 1.0 g, KCl 0.55 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.16 g, Ferric citrate 0.1 g, KBr 0.08 g, SrCl<sub>2</sub> 0.03 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.02 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.0 mg, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 4.0 mg, NaF 2.4 mg, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1.6 mg, 蒸馏水 1 000 mL, 固体培养基中加入 1.5% 的琼脂, pH 7.4–7.8。

产表面活性剂培养基: 在 2216 人工海水培养基中加入 1% 的液体石蜡作为碳源, 1×10<sup>5</sup> Pa 高温灭菌 15 min。

### 1.2 菌株分类鉴定

**1.2.1 形态学特征:** KOH 法确定菌株的革兰氏反应, 相差显微镜观察菌体形态、大小。

**1.2.2 生长特征:** 在 4 °C–50 °C 范围内测定各菌株在各个温度下的生长量; 在最适生长温度下, 测定菌株在不同 pH 培养基中的生长量; 在最适生长温度和最适 pH 条件下, 测定不同 NaCl 浓度下菌株的生长量, 菌株的生长量以 OD<sub>600</sub> 表征。

**1.2.3 生化特征:** 参照文献[11]测定了菌株 3372 的氧化酶、过氧化氢酶、酯酶、酪蛋白、淀粉酶、明胶水解、硫化氢产生、吲哚产生以及硝酸盐和亚硝酸盐还原性质, 所用培养基用无菌的 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 9.0。

**1.2.4 糖醇利用:** 在 2216 人工海水培养基中加入 10 g/L 的糖醇, 接种后振荡培养 2 d 后测定菌液吸光度(OD<sub>600</sub>), 与基础培养基相比较, 吸光度加倍或更多为阳性, 吸光值增加不足一倍为弱阳性, 其余为阴性。

**1.2.5 16S rRNA 基因序列分析:** 使用细菌 16S rRNA 基因通用引物进行菌落 PCR, 引物序列如下: 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';

1492r: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 45 s; 55 °C 30 s; 72 °C 1 min; 共 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物送北京诺赛公司测序, 将得到的序列用 GenBank 中的 BLAST 进行数据库比对, 用 MEGA 4.0 软件包<sup>[12]</sup>中的 Kimura 2-parameter 法计算遗传距离, 用 Maximum-likelihood 法构建系统发育树, 重复抽样 1 000 次分析系统树各分支的置信度。

### 1.3 表面活性剂的萃取与分析

**1.3.1 表面活性剂的萃取:** 取发酵液, 10 000 r/min 离心 30 min, 疏水层用等体积正己烷萃取其中残余的液体石蜡, 用氯仿: 甲醇=2:1 (V/V) 等体积萃取 3 次, 用滤纸过滤后收集合并有机相, 40 °C 旋转蒸发仪减压蒸干即得表面活性剂粗品, 适量点样于硅胶板上, 经展层液展开、显色, 取其斑点溶于氯仿: 甲醇=1:1 (V/V), 离心后去硅胶, 冷冻、干燥, 得米黄色疏松状物质即为生物表面活性剂纯品。

**1.3.2 表面活性剂的定性分析:** 将表面活性剂提取样品进行薄层层析, 采用德国 Merk 硅胶薄层层析板 0.3 μL 上样, 烘干, 用氯仿: 甲醇: 乙酸: 水=65:25:4:4 (V/V/V/V) 作为展层剂, 表面分别喷苯酚-浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 试剂(糖脂呈棕色)、溴百里香酚蓝-NaOH 试剂(磷脂呈蓝绿色)、茚三酮-丁醇试剂(脂肽呈紫红色)等显色剂, 110 °C 烘烤 20 min, 观察显色结果, 根据显色斑点计算 R<sub>f</sub> 值。

**1.3.3 表面张力值的测定:** 发酵液以 10 000 r/min 离心 30 min, 利用 JYW-200A 表面张力仪测定上清液的表面张力, 与空白培养基的表面张力进行比较。

**1.3.4 排油圈活性的测定:** 取直径 90 cm 的培养皿, 加水 20 mL, 滴加 4 mL 液体石蜡, 待形成稳定油膜后加入 100 μL 发酵液于油膜中心, 测定排油圈直径。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株分离与形态学特征

将海水样品用产表面活性剂培养基进行富集培养, 30 °C 振荡培养 5–7 d, 取富集培养物在 2216 人工海水固体培养基上进行稀释涂布获得单菌落, 将各单菌落接入液体产表面活性剂培养基, 30 °C 振荡培养 48 h, 比较各发酵液表面张力值和排油圈大小, 得到具有良好表面活性的菌株 3372。

菌株 3372 菌落呈圆形, 粉红色, 中间凸起, 边缘整齐透明。细胞大小为(0.5–1.0)  $\mu\text{m}$  × (2.0–4.0)  $\mu\text{m}$  的规则短杆状(图 1), 革兰氏阳性, 不运动, 不产芽孢。

### 2.2 菌株生理生化特性

菌株 3372 能在 pH 7.0–11.0 的条件下生长, 最适生长 pH 9.0; 生长的温度范围为 10 °C–45 °C, 最适生长温度 30 °C; 最高能耐受 12% 的 NaCl, 在含有 3% NaCl 条件下生长量最高。

菌株 3372 不能分解淀粉、酪蛋白、明胶、Tween 20、Tween 40、Tween 60、Tween 80。氧化酶、吲哚产生试验结果为阴性, 触媒、硫化氢产生、硝酸盐还原结果为阳性; 菌株 3372 能够利用葡萄糖、麦芽糖、果糖和甘露糖, 不能利用蔗

糖、乳糖、甘露醇、木糖、木聚糖、果胶、可溶性淀粉、支链淀粉和纤维素。

### 2.3 基于 16S rRNA 基因的系统发育分析

测序得到菌株 3372 的 16S rRNA 基因序列, 含有 1 368 bp, 其 GenBank 登录号为 JQ687534。将菌株 3372 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中的序列进行比对, 发现与 *Dietzia* 属成员具有较高的序列相似性, 用 Maximum-likelihood 方法构建的系统发育树(图 2)表明与 *Dietzia cercidiphylli* YIM 65002<sup>T</sup> 种亲缘关系密切, 序列相似性达到了 99.9%, 其次与 *Dietzia natronolimnaea* CBS 107.95<sup>T</sup> 种序列相似性为 99.6%。

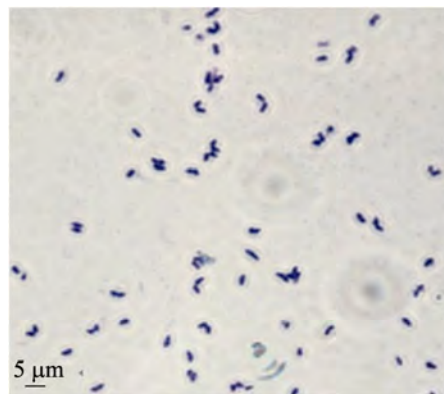


图 1 菌株 3372 细胞形态(1 000×)

Fig. 1 Phase contrast micrograph of strain 3372 showing the cell morphology (1 000×)

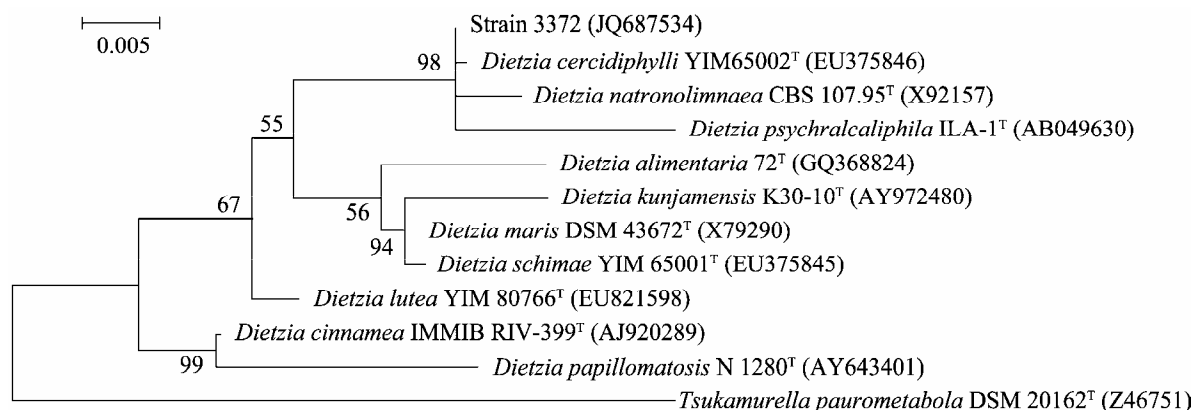


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 3372 与相关菌株的系统发育树

Fig. 2 Maximum-likelihood phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationships between strain 3372 and related species

## 2.4 表面活性剂性质

表面张力值: 离心除菌后的发酵液表面张力为  $32.95 \pm 0.5$  mN/m, 而发酵前空白培养基为  $67.62 \pm 0.5$  mN/m, 表明培养过程中细菌产生的代谢产物中有表面活性剂。

排油圈直径: 离心除菌后的发酵液经过萃取旋干得到的表面活性剂粗品, 其排油圈直径为 6.1 cm。

表面活性剂提取物经 TLC 展层后用茚三酮-丁醇试剂显色,  $R_f = 0.78$  处有紫红色斑点, 表明菌株 3372 产生的表面活性剂主要是脂肽类表面活性剂物质(图 3)。

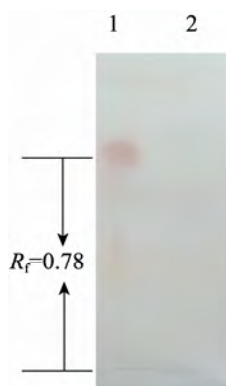


图 3 菌株 3372 所产表面活性剂 TLC 的显色结果  
Fig. 3 TLC result of biosurfactants produced by strain 3372

Note: 1: Filter layer; 2: Supernatant fluid.

## 2.5 培养条件对产表面活性剂的影响

考察了不同碳、氮的利用对于菌株 3372 产生

表面活性剂的影响, 如表 1 所示, 当以 1% 的液蜡为碳源时, 发酵液表面张力值可降到 32.87 mN/m, 当氮源选择 Tryprone 时, 发酵液表面张力值降低到最低。

菌株 3372 产生表面活性剂的最适反应温度为  $30\text{ }^\circ\text{C}$  (图 4A); 在 pH 8.5–10.5 范围内发酵液表面活性都较稳定, 当 pH 为 9.0 时(图 4B)可将发酵液表面张力值降至最低; 当 NaCl 浓度为 3% 时, 发酵液表面张力值降至最低, 大于 3% 时表面张力值只是小幅度增加(图 4C)。

## 3 讨论

随着生物表面活性剂在实际生产生活中的应用领域越来越广泛, 各种来源的产生物表面活性剂菌株的相关报道也层见迭出。近年来关于生物表面活性剂的研究很多, 细菌来源的生物表面活性剂中嗜盐菌、嗜热菌的相关研究居多, 而嗜碱菌产生物表面活性剂的研究罕见报道。本研究分离得到一株产生物表面活性剂的嗜碱菌株 3372, 属于迪茨菌属(*Dietzia*), 系统发育分析表明菌株 3372 与 *Dietzia cercidiphylli* 的亲缘关系最近, 但其一些生理生化特征却与 *Dietzia cercidiphylli* 模式菌 DSM 45140 有差异, 包括生长条件、硝酸盐还原、 $\text{H}_2\text{S}$  产生、糖醇的利用等, 表明菌株 3372 是不同于模式菌株 DSM 45140 的 *Dietzia cercidiphylli* 中的新菌株(表 2)。

表 1 不同碳、氮源表面张力值的比较

Table 1 Effects of different carbon source and nitrogen source on the surface tension of the culture

碳源 Carbon source	表面张力值 Surface tension (mN/m)	氮源 Nitrogen source	表面张力值 Surface tension (mN/m)
葡萄糖 Glucose	48.86	胰蛋白胨 Tryprone	33.92
果糖 Fructose	48.53	硝酸铵 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	45.68
甘露糖 Mannose	49.08	硝酸钠 $\text{NaNO}_3$	55.04
甘油 Glycerin	42.12	氯化铵 $\text{NH}_4\text{Cl}$	58.48
橄榄油 Olive oil	40.61	硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	60.74
液蜡 Liquid paraffin	32.87	硝酸钾 $\text{KNO}_3$	57.27
		酵母膏 Yeast extract	40.57

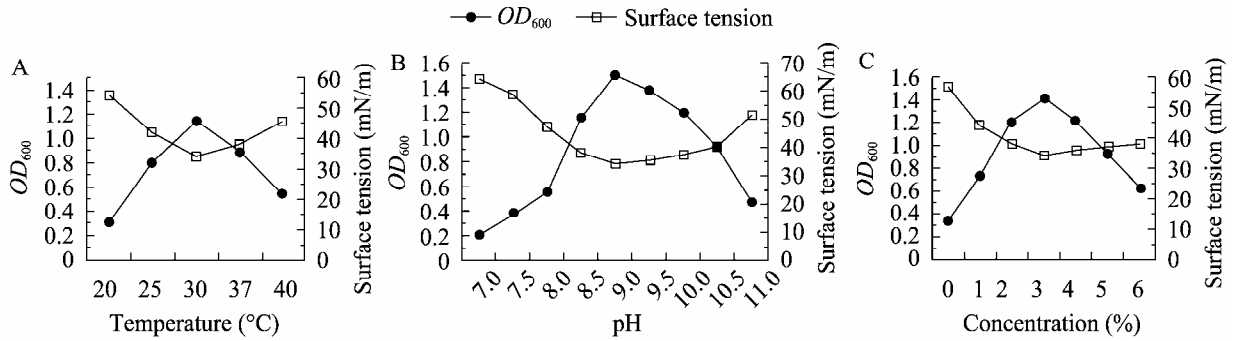


图 4 温度、pH 和盐度对菌株 3372 产生物表面活性剂的影响

Fig. 4 Effect of some factors on the activity of the biosurfactants produced by strain 3372

表 2 菌株 3372 与近缘标准菌株生理生化差异比较  
Table 2 Different morphological and physiological characteristics of strain 3372 and related species

理化特性 Characteristics	菌株 Stains		
	1	2	3
Temperature range for growth (°C)	10–45	10–37	10–45
pH range for growth	7–11	6–9	6–10
Tolerance to NaCl (% W/V)	12	10	10
Urea hydrolysis	–	+	+
Nitrate reduction	+	–	–
H <sub>2</sub> S production	+	–	+
Hydrolysis of Tween 80	–	+	ND
Hydrolysis of starch	–	–	+
Utilization of			
Maltose	+	+	–
Sucrose	–	W	–
Lactose	–	+	–

Note: 1: Strain 3372; 2: *Dietzia cercidiphylli* DSM 45140<sup>[13]</sup>; 3: *Dietzia natronolimnaea* DSM 44860<sup>[14]</sup>. +: Positive; -: Negative; W: Weak; ND: No data.

1968 年 Arima<sup>[15]</sup>等首次发现 *Bacillus subtilis* IFO3039 能够产生脂肽类表面活性剂, 可显著降低水的表面张力, 此后又有多种不同菌属来源的产脂肽菌被相继报道, 包括: *Staphylococcus*<sup>[16]</sup>、*Escherichia*<sup>[17]</sup>、*Brevibacterium*<sup>[18]</sup>等, 有关嗜碱菌产生脂肽类表面活性剂还未见报道。*Dietzia* 菌属的菌株有报道与石油烃降解相关<sup>[19]</sup>, 是进行生物

修复的关键降解菌, 例如, Pleshakova 等<sup>[20]</sup>利用 *Dietzia maris* 不仅促进石油污染的降解效率, 而且还刺激本土微生物进行共同修复。Miyo Nakano 最近报道了 *Dietzia maris* 可产生蜡酯表面活性剂<sup>[21]</sup>, 而该属菌株产脂肽类生物表面活性剂的能力之前未见有关报道。该菌株 3372 是首次报道 *Dietzia* 菌属可以在碱性环境下利用液蜡为唯一碳源产生脂肽类表面活性剂, 其在碱性条件下表现出良好的表面活性和排油活性, 展示了 *Dietzia* 菌属在生物修复过程中的应用潜力, 并且菌株所产的生物表面活性剂结构及机理尚未确定, 具有进一步研究的价值。

## 参 考 文 献

- [1] Bordoloi NK, Konwar BK. Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 170(1): 495–505.
- [2] 卢国满, 刘红玉, 曾光明, 等. 生物表面活性剂产生菌犁头霉菌(*Absidia orchidis*)的筛选及发酵条件优化[J]. 环境科学学报, 2006, 26(9): 1426–1432.
- [3] 司美茹, 江翠翠, 刘飞, 等. 一株降解原油链霉菌的分离鉴定与降解特性研究[J]. 生态与农村环境学报, 2010, 26(5): 508–512.
- [4] Lee SC, Lee SJ, Kim SH, et al. Characterization of

- new biosurfactant produced by *Klebsiella* sp. Y6-1 isolated from waste soybean oil[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(7): 2288–2292.
- [5] Joshi S, Bharucha C, Jha S, et al. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(1): 195–199.
- [6] Yumoto I, Nakamura A, Iwata H, et al. *Dietzia psychrocaliphila* sp. nov., a novel, facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(Pt 1): 85–90.
- [7] Kebbouche-Gana S, Gana ML, Khemili S, et al. Isolation and characterization of halophilic archaea able to produce biosurfactants[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2009, 36(5): 727–738.
- [8] Horikoshi K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63(4): 735–750.
- [9] Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2001, 85(1-2): 111–125.
- [10] 时进钢, 袁兴中, 曾光明, 等. 鼠李糖脂对沉积物中 Cd 和 Pb 的去除作用[J]. *环境化学*, 2005, 24(1): 55–58.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 349–400.
- [12] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [13] Li J, Zhao GZ, Zhang YQ, et al. *Dietzia schimae* sp. nov. and *Dietzia cercidiphylli* sp. nov., from surface-sterilized plant tissues[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(Pt 11): 2549–2554.
- [14] Duckworth AW, Grant S, Grant WD, et al. *Dietzia natronolimnaios* sp. nov., a new member of the genus *Dietzia* isolated from an East African soda lake[J]. *Extremophiles*, 1998, 2(3): 359–366.
- [15] Arima K, Kakinuma A, Tamura G. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1968, 31(3): 488–494.
- [16] Eddouaouda K, Mnif S, Badis A, et al. Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2011, 51: 1–11.
- [17] Sriram MI, Gayathiri S, Gnanaselvi U, et al. Novel lipopeptide biosurfactant produced by hydrocarbon degrading and heavy metal tolerant bacterium *Escherichia fergusonii* KLU01 as a potential tool for bioremediation[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(19): 9291–9295.
- [18] Kiran GS, Thomas AT, Selvin J, et al. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(7): 2389–2396.
- [19] Huang XF, Guan W, Liu J, et al. Characterization and phylogenetic analysis of biodemulsifier-producing bacteria[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(1): 317–323.
- [20] Pleshakova EV, Dubrovskaya EV, Turkovskaya OV. Comparison of efficiencies of oil-oxidizing *Dietzia maris* strain and stimulation of natural microbial communities in remediation of polluted soil[J]. *Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiia*, 2008, 44(4): 430–437.
- [21] Nakano M, Kihara M, Iehata S, et al. Wax ester-like compounds as biosurfactants produced by *Dietzia maris* from *n*-alkane as a sole carbon source[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2011, 51(5): 490–498.