一株分离自海水的产生物表面活性剂菌株的鉴定及其发酵优化

杜 瑾 郝建安 张晓青 王建艳 张爱君 王 静*
(国家海洋局天津海水淡化与综合利用研究所, 天津 300192)

摘 要 为研究分离自海水的芽孢杆菌 dhs-330 产生物表面活性剂的培养条件和产物特性,采用 16S rDNA 基因序列分析鉴定菌种,对发酵培养基的碳源、氮源、pH 值和培养温度进行优化,采用飞行时间质谱进行产物鉴定及抑菌圈法考察产物抑菌活性。结果显示,该菌株与 *Bacillus mojavensis* 菌株 16S rDNA 的序列相似性为 99%。菌株发酵液表面张力可由 70 mN·m^{-1}降低至 27 mN·m^{-1}。发酵培养基的最适碳源、有机氮源和无机氮源分别为甘油、酵母膏和尿素;pH 值为 6.5~7.0、温度为 30~35 ℃条件下,菌体生长和生物表面活性剂合成最为有利。发酵产物为脂肽-糖脂混合型生物表面活性剂,对海洋污损微生物 *Bacillus pumilus* dhs04 有显著的抑菌活性。菌株 dhs-330 是能合成脂肽-糖脂混合生物表面活性剂、具有海洋污损微生物防除潜力的优选菌株。

关键词 混合型生物表面活性剂; 脂肽和糖脂; 质谱鉴定; 抑菌活性; 防污损

Identification and fermentation optimization of a biosurfactant-producing strain isolated from seawater. DU Jin, HAO Jian-an, ZHANG Xiao-qing, WANG Jian-yan, ZHANG Ai-jun, WANG Jing* (*Institute of Seawater Desalination and Multipurpose Utilization, State Oceanic Administration, Tianjin* 300192, *China*).

Abstract: This experiment studied a biosurfactant-producing bacterial strain isolated from seawater, designated as dhs-330. Phylogenetic analysis of the homoeologous 16S rDNA gene sequences, the optimization of culture conditions of carbon source, nitrogen source, pH and temperature, MALDI-TOF Mass Spectrometry identification of the products, and antimicrobial activity assay were carried out. The 16S rDNA sequence of *Bacillus* sp. dhs-330 shared a 99% sequence similarity with *Bacillus mojavensis*. *Bacillus* sp. dhs-330 decreased the surface tension of culture medium from 70 mN·m^{-1} to 27 mN·m^{-1}. It could grow well with high production of biosurfactants under the following conditions: glycerol as carbon source, yeast extract as organic nitrogen source, urea as inorganic nitrogen source, initial pH 6.5-7.0 and 30-35 ℃. Its principal products were blend-biosurfactants of lipopeptide and glycolipid, which showed antimicrobial activity against marine fouling bacteria *Bacillus pumilus* dhs04. Strain dhs-330 presented a potential application in blend-biosurfactant production and anti-fouling technology.

Key words: blend-biosurfactant; lipopeptide and glycolipid; mass spectrometry identification; antimicrobial activity; anti-fouling.

生物表面活性剂是由微生物合成的具有表/界面张力活性、既含亲水基团又含疏水基团的化合物。与化学合成的表面活性剂相比,生物表面活性剂不仅具有高效的起泡性和良好的破乳性,而且具有可降解、低毒、结构多样等优势。如在石油开采中添加生物表面活性剂,降低水-原油-岩石间的界面张力,是提高原油采收率的有效技术方法(Joshi *et al.*, 2015);某些生物表面活性剂具有抗菌活性(Gudina

国家自然科学基金项目(21406042)、海洋公益性行业科研专项项目(201305022-5)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金项目(K-JBYWF-2015-G15)资助。
收稿日期: 2015-08-18 接受日期: 2016-02-26
* 通讯作者 E-mail: wang_nana@163.com

et al.,2015)或抗病毒(Itokawa *et al.*,1994)能力;某些生物表面活性剂能抑制藻华的生长,有效控制赤潮,降低赤潮灾害所带来的负面影响(Sun *et al.*,2004)。因此,生物表面活性剂在化工、医药、农业、环境修复等领域具有广阔的应用前景(Banat *et al.*,2010)。

生物表面活性剂根据结构特点主要有糖脂类、脂蛋白和脂肽类、脂肪酸磷脂及中性脂、高分子生物表面活性剂和微粒生物表面活性剂等五类(Ron *et al.*,2001),可由多种不同菌属的微生物合成。如分歧杆菌、诺卡氏菌、棒状杆菌等合成海藻糖脂,假单胞菌、伯克霍尔德氏菌等合成鼠李糖脂,酵母菌合成槐糖脂等糖脂类表面活性剂;芽孢杆菌合成表面活性素、伊枯草菌素等脂肽类表面活性剂;乙酸钙不动杆菌合成 Emulsan、Biodispersan 等高分子表面活性剂等。目前的研究主要集中在生物表面活性剂产生菌的筛选优化,及新型生物表面活性剂的开发、剖析与改性(Al-Wahaibi *et al.*,2014;Vijaya *et al.*,2014)。

海洋环境微生物往往具备优越的抗逆性,能适应多变的温度、pH、盐度及局部污染等不利的自然条件,成为筛选资源微生物的研究热点(Dash *et al.*,2013)。已发现能合成生物表面活性剂的海洋微生物包括芽孢杆菌、假单胞菌、红球菌、酵母菌等多个菌属(Satpute *et al.*,2010),活性产物成分包括脂肽类、糖脂类、胞外多糖等多种类型。本研究从渤海湾海水样品中筛选获得了一株产生物表面活性剂的芽孢杆菌 dhs-330,对其分类学特性、产物合成条件、产物结构及其抑菌活性进行了初步探索,提供了合成脂肽-糖脂混合型生物表面活性剂的新资源,为海洋环境修复和海洋工程污损防治等重要应用提供了新思路和新方法。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株来源　水样采自渤海湾,筛选获得菌株 dhs-330。指示菌株 *Bacillus pumilus* dhs04 为海洋污损细菌,由本实验室分离并保藏。

1.1.2　培养基　发酵培养基:葡萄糖 31.5 g,酵母提取物 1 g,尿素 5 g,KH_2PO_4 0.8 g,$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3 g,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15 g,微量元素溶液 1 mL,定容至 1 L 并调整 pH 至 7.0。其中,微量元素溶液:$CaCl_2$ 7.5 g·L^{-1},$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g·L^{-1},$MnSO_4 \cdot H_2O$ 2 g·L^{-1}。

血琼脂平板培养基:购自天津润泰科技发展有限公司。

LB 培养基:蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 10 g,定容至 1 L 并调整 pH 至 7.0。固体培养基中添加琼脂粉 20 g。

异养菌培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,KH_2PO_4 0.05 g,海水 0.5 L,蒸馏水 0.5 L,调整 pH 至 7.2。固体培养基中添加琼脂粉 20 g。

1.1.3　试剂　PCR 反应试剂与 DNA Marker 均购自大连宝生物公司,细菌基因组提取试剂盒购自天根生化科技有限公司。其他试剂为国产分析纯产品。

1.2　方法

1.2.1　菌株产表面活性剂能力的筛选和测定　应用排油圈法对菌株产表面活性剂能力进行初筛,将划线分离的单菌落接种于 20 mL 发酵培养基中,30 ℃、180 r·min^{-1}振荡培养 24 h;取直径 90 mm 培养皿加入适量蒸馏水,在蒸馏水表面滴加 3 mL 液体石蜡形成油膜,取 300 μL 发酵培养液加入油膜中心,形成排油圈,测定排油圈的直径。比较表面张力值对菌株进行复筛,使用科诺全自动表面张力仪、采用白金板法测定发酵液的表面张力值。

1.2.2　菌种 16S rDNA 鉴定　采用细菌基因组提取试剂盒提取菌株基因组,以基因组为模板进行 16S rDNA 的 PCR 扩增,引物为通用引物:

fd1:5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′

rp2:5′-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3′

PCR 反应体系(25 μL):10×Taq buffer 2.5 μL,2.5 mmol·L^{-1} dNTP 2 μL,上、下引物各 1.5 μL,模板 0.3 μL,exTaq 酶 0.2 μL,ddH_2O 17 μL。PCR 反应条件:98 ℃ 2 min;98 ℃ 10 s、54 ℃ 30 s、72 ℃ 3 min 进行 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。引物合成及 PCR 产物测序均由苏州金唯智生物科技有限公司完成。所测序列在 GenBank 核酸序列数据库中进行 16S rDNA 序列 BLAST 比对,并使用 MEGA 5.1 软件构建系统发育树。

1.2.3　发酵条件影响　以 OD_{600}和发酵液排油圈直径为指标,以发酵培养基为基础,分别考察不同碳源、有机氮源、无机氮源、初始 pH 值及温度对生物表面活性剂合成的影响。

1.2.4　表面活性剂产物提取　将培养 48 h 的发酵液于 4 ℃、8000 r·min^{-1}离心 15 min,取上清液;用 6 mol·L^{-1}的 HCl 溶液调节上清液 pH 至 2.0,静置于

4 ℃过夜;4 ℃、10000 r · min^{-1}离心 20 min,取沉淀,并用 pH 2.0 的 HCl 溶液洗涤沉淀 3 次,37 ℃烘干沉淀;向烘干后的沉淀中加入甲醇溶解,超声 20 min,取上清液,重复该操作一次,合并上清液,冷冻干燥去除甲醇后,得到的黄褐色疏松状粉末即为表面活性剂产物。方法参考文献(Cheng *et al.*,2013)。

1.2.5 表面活性剂产物的质谱鉴定 表面活性剂产物采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析鉴定其成分。质谱仪为 SCIEX 4800(美国 Applied Biosystem 公司),基质为 α-氰-4-羟肉桂酸(α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid),1 μL 样品与等体积的基质混匀,风干,置于仪器离子源进行测定。质量扫描范围为 400~4000。方法参考文献(Cheng *et al.*,2013)。

1.2.6 表面活性剂产物的平板抑菌实验 挑取新鲜的指示菌单菌落,接种于异养菌液体培养基中,30 ℃、180 r · min^{-1} 培养过夜;将指示菌培养物按 1∶100稀释混入尚未凝固的异养菌固体培养基中,快速混匀后倒至平板;待平板干燥后,在平板中心处滴加 10 μL 表面活性剂产物溶液,待液体吸收后倒置于 30 ℃静置培养 48 h;培养完成后,取出培养皿测量抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 菌株的初步分类及生长特性

从渤海湾海水样品中分离得到 1 株产生物表面活性剂能力较强的菌株 dhs-330。在 LB 固体培养基上 30 ℃培养 24 h,菌落呈白色,不规则,边缘不整齐;在血平板上形成溶血圈。对菌株基因组 16S rDNA 基因片段进行 PCR 扩增,测序并经 BLAST 比对,选出数据库中具有代表性的近缘细菌的序列构建系统发育树(图 1)显示,dhs-330 与 *Bacillus mojavensis* 亲缘关系最近,可鉴定为芽孢杆菌。

由图 2 可见,dhs-330 在 0~24 h 处于对数生长期,OD_{600}持续增大,至 24 h 进入稳定期,发酵液排油圈直径达 3 cm,表面张力降低至 27 mN · m^{-1},表明此时发酵液已具有较高的表面活性;24 h 后排油圈直径持续增大,至发酵 48 h 达最大值 7 cm,此时表面活性剂产量达最高值;48 h 后 OD_{600}逐渐降低,细胞生长进入衰亡期,菌体裂解形成芽孢。

2.2 培养基和培养条件对产表面活性剂的影响

以发酵培养基为基础,分别以 31.5 g · L^{-1}葡萄糖、30 g · L^{-1}蔗糖、32.2 g · L^{-1}甘油、28.4 g · L^{-1}淀粉和 40 g · L^{-1}糖蜜为碳源,在 30 ℃、180 r · min^{-1} 条件下培养 dhs-330 菌株 48 h,测定发酵液 OD_{600}值和排油圈直径,比较不同碳源对菌株生长和发酵液表面张力的影响(图 3a)。葡萄糖和甘油为碳源时,OD_{600}值和排油圈直径均较大,表明其适合被菌株利用进行生长代谢和生产表面活性产物。以蔗糖为碳源时,OD_{600}值很高但排油圈直径最小,表明其具有

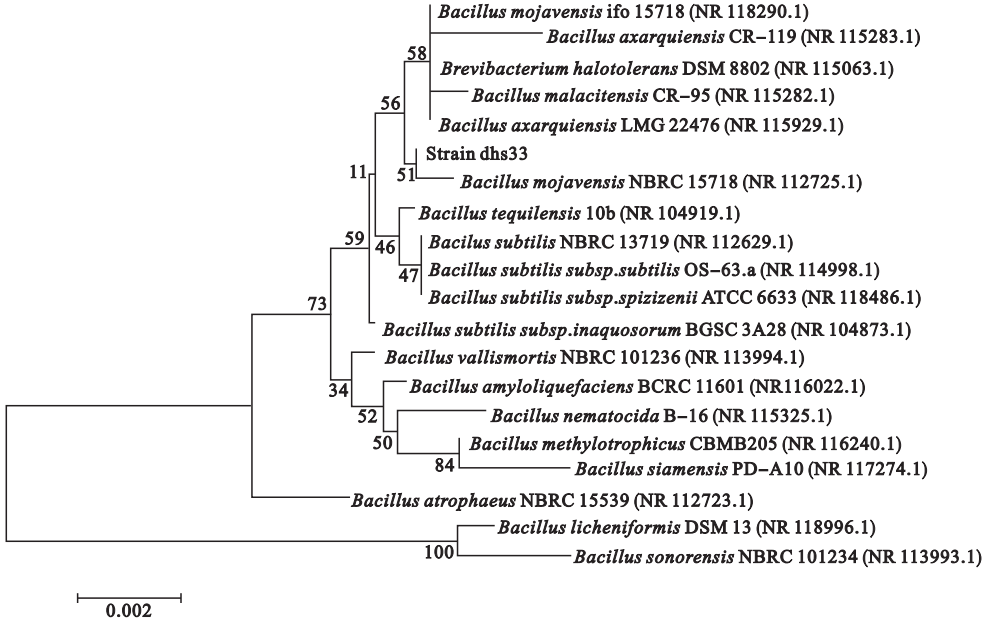


图 1 菌株 dhs-330 的 16S rDNA 系统发育树
Fig.1 Phylogenetic tree of 16S rDNA of dhs-330

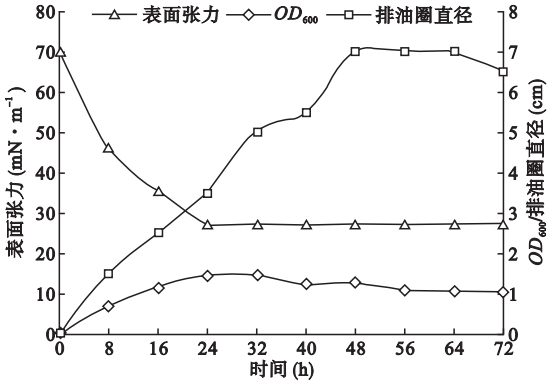


图 2　菌株 dhs-330 的生长动力学曲线
Fig.2　Kinetic curve of strain dhs-330

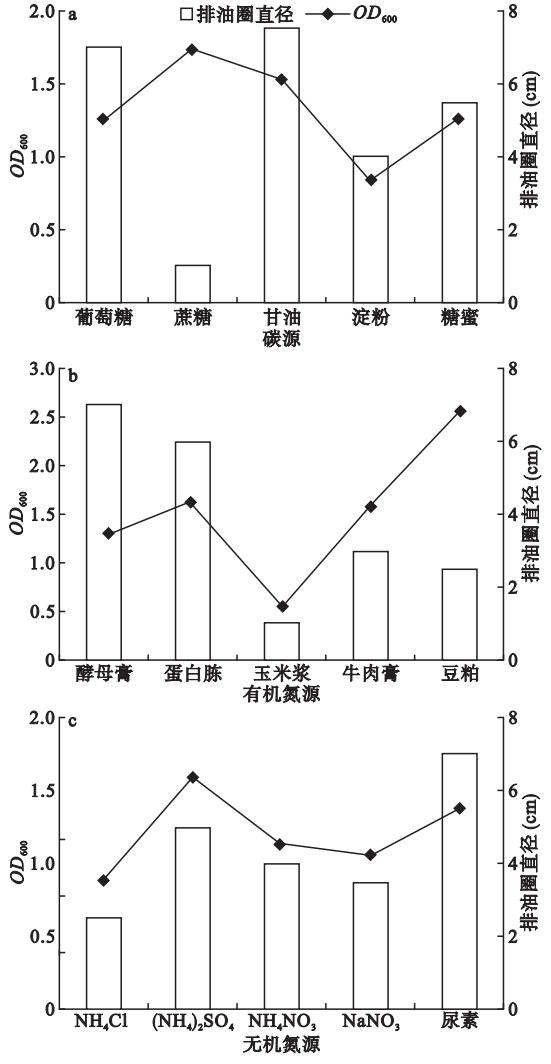


图 3　不同碳源、氮源对菌株生长及发酵液表面活性的影响
Fig.3　Effect of different carbon sources and nitrogen sources on growth and surface activity of the strain fermentation

对菌株生长的促进作用、但不利于表面活性产物的合成。

比较 1 g·L^{-1}酵母膏、1 g·L^{-1}蛋白胨、3 g·L^{-1}玉米浆、1 g·L^{-1}牛肉膏和 1 g·L^{-1}豆粕为有机氮源时(图 3b),玉米浆作为有机氮源时,OD_{600}值和排油圈直径均最小,不利于菌株生长和产物合成。菌株在含豆粕的培养基中细胞浓度最高,但表面活性较低,表明豆粕促进细胞生长、但抑制表面活性产物的生成。酵母膏作为有机氮源时,细胞生长良好,且发酵液排油圈直径最大,是最适有机氮源。以 8.7 g·L^{-1} NH_4Cl、10.87 g·L^{-1} $(NH_4)_2SO_4$、6.59 g·L^{-1} NH_4NO_3、17 g·L^{-1} $NaNO_3$和 4.94 g·L^{-1}尿素为无机氮源时(图 3c)可见,尿素作为无机氮源时,OD_{600}值较高,排油圈直径最大,是菌株合成生物表面活性剂的最适无机氮源。

调节发酵培养基初始 pH 值 5.5~8.5,在 30 ℃、180 r·min^{-1}条件下培养 dhs-330 菌株 48 h,测定发酵液 OD_{600}值和排油圈直径,比较不同 pH 值对菌株生长和发酵液表面张力的影响(图 4a)。培养基初始 pH 值在 6.0~7.5 时,发酵液排油圈直径均大于 5 cm,具有较强的表面活性。其中,pH 值在 6.5 时,OD_{600}值最高,pH 值在 7.0 时,排油圈直径最大,表明初始 pH 值在 6.5~7.0 对菌株 dhs-330 的菌体生长和产物合成最为有利。

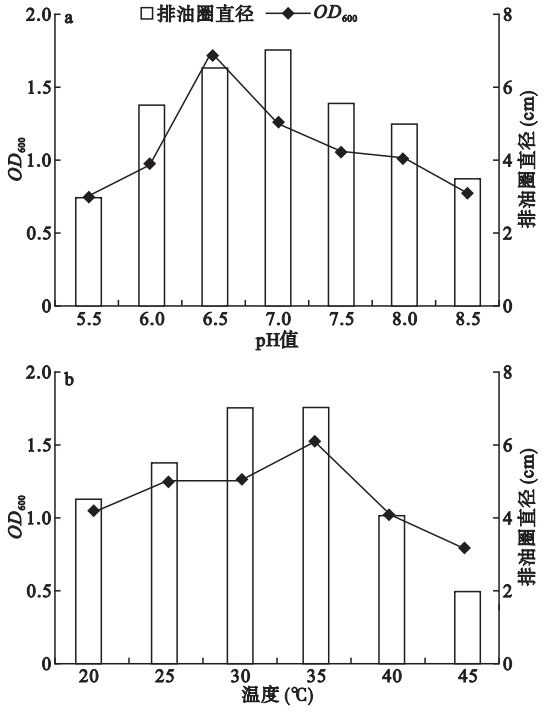


图 4　不同 pH 值和温度对菌株生长及发酵液表面活性的影响
Fig.4　Effect of pH and temperature on growth and surface activity of the strain fermentation

调节培养温度,在 pH 7.0 的发酵培养基中、180 r·min^{-1}条件下培养 dhs-330 菌株 48 h,测定发酵液 OD_{600}值和排油圈直径,比较不同温度对菌株生长和发酵液表面张力的影响(图 4b)。菌株 dhs-330 在 30~35 ℃的培养条件下,菌株生长和表面活性剂合成能力最佳;温度高于 35 ℃或低于 30 ℃时,OD_{600}值和排油圈直径均降低,不利于菌株生长和产物生成。

2.3 胞外活性物质的提取和定性检测

dhs-330 菌株在发酵培养基中培养后的胞外液,经酸沉淀、甲醇萃取、冷冻干燥获得黄褐色粉末,是菌株 dhs-330 发酵表面活性产物的粗提物。采用 MALDI-TOF-MS 技术对提取的表面活性产物进行了质谱分析(图 5),dhs-330 菌株产物特征峰对应的物质如表 1 所示。同时检测到糖脂和脂肽两类物质,表明产物为脂肽-糖脂混合型生物表面活性剂。从图 5a 可以看出,dhs-330 所产糖脂类物质为鼠李糖脂,谱图中最高峰出现在质子化峰值 m/z = 655.297 处,代表了糖脂类主要产物[Rha-Rha-$C_{10:1}$-$C_{9:1}$ + Na]$^+$加合离子。其他含量较少的峰出现在 m/z 545.365、583.286、595.286、609.354、633.400、669.317、683.331、699.287 对应[Rha-Rha-$C_{12:1}$ + K]$^+$、[Rha-C_{10}-C_{14} + Na]$^+$(或[Rha-C_{12}-C_{12} + Na]$^+$)、[Rha-$C_{10:1}$-$C_{14:1}$ + K]$^+$(或[Rha-$C_{12:1}$-$C_{12:1}$ + K]$^+$)、[Rha-$C_{12:1}$-C_{14} + Na]$^+$(或[Rha-C_{12}-$C_{14:1}$ + Na]$^+$)、[Rha-Rha-C_8-C_8 + K]$^+$、[Rha-Rha-$C_{10:1}$-$C_{10:1}$ + K]$^+$、[Rha-C_{14}-C_{16} + K]$^+$、[Rha-Rha-C_{10}-$C_{12:1}$ + Na]$^+$(或[Rha-Rha-$C_{12:1}$-C_{10}+Na]$^+$)加合离子。鼠李糖脂类物质质谱峰的分析参考(Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010; Nie *et al.*, 2010)。结果表明,dhs-330 能够合成多种不同结构的鼠李糖脂,以双鼠李糖脂为主,并含有少量单鼠李糖脂,脂肪酸链长度和饱和度呈多样性。

从图 5b~5d 可以看出,dhs-330 所产脂肽类物质主要有 3 类组分。m/z 处于 1000~1100 的峰表示表面活性素 surfactin 家族,峰值为 1030.628、1044.643 和 1058.66,分子量依次相差 14 Da,推测为脂肪酸链相差 1 个亚甲基(-CH_2-)的同系物,分别为 C_{13}-C_{15}的[surfactin+Na]$^+$加合离子。m/z 位于 1460~1540 的峰表示丰原素 fengycin 家族,峰值为 1463.780 和 1485.775 分别为 C_{16}-fengycin 的[M+H]$^+$和[M+Na]$^+$加合离子,且其肽环上 6 位氨基酸是 Ala;1477.800 和 1499.797 对应的是其 C_{17}的同系

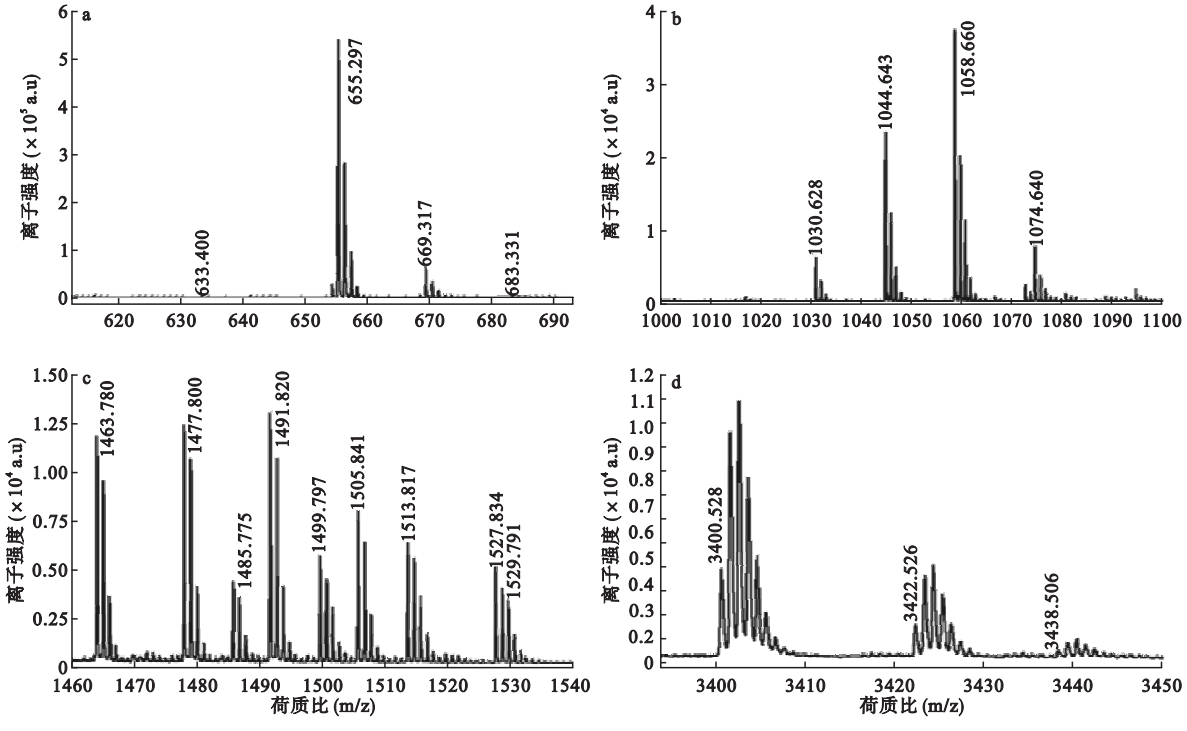


图 5 dhs-330 菌株表面活性产物的 MALDI-TOF-MS 检测图

Fig.5 MALDI-TOF-MS spectrum of biosurfactant products of dhs-330

图 a~d 表示不同荷质比(m/z)范围下的离子强度。

表 1　dhs-330 菌株表面活性产物 MALDI-TOF-MS 分析
Table 1　Biosurfactant products of dhs-330 detected by MALDI-TOF-MS

质谱峰	排布
鼠李糖脂	
633.400	[Rha-Rha-C_8-C_8+K]$^+$
655.297	[Rha-Rha-$C_{10:1}$-$C_{9:1}$+Na]$^+$
669.317	[Rha-Rha-$C_{10:1}$-$C_{10:1}$+K]$^+$
683.331	[Rha-C_{14}-C_{16}+K]$^+$
表面活性素	
1030.628	C_{13}-Surfactin [M+Na]$^+$(7-Leu/Ile)
1044.643	C_{14}-Surfactin [M+Na]$^+$(7-Leu/Ile)
1058.660	C_{15}-Surfactin [M+Na]$^+$(7-Leu/Ile)
1074.640	C_{15}-Surfactin [M+K]$^+$(7-Leu/Ile)
丰原素	
1463.780	C_{16}-Fengycin [M+H]$^+$(6-Ala)
1477.800	C_{17}-Fengycin [M+H]$^+$(6-Ala)
1485.775	C_{16}-Fengycin [M+Na]$^+$(6-Ala)
1491.820	C_{16}-Fengycin [M+H]$^+$(6-Val)
1499.797	C_{17}-Fengycin [M+Na]$^+$(6-Ala)
1505.841	C_{17}-Fengycin [M+H]$^+$(6-Val)
1513.817	C_{16}-Fengycin [M+Na]$^+$(6-Val)
1527.834	C_{17}-Fengycin [M+Na]$^+$(6-Val)
1529.791	C_{16}-Fengycin [M+K]$^+$(6-Val)
BSAP-254	
3400.528	未知
3422.526	未知
3438.506	未知

物。峰值为 1491.820 和 1513.817,也表示 C_{16}-fengycin 的[M+H]$^+$和[M+Na]$^+$加合离子,但其肽环上 6 位氨基酸是 Val;其 C_{17} 的同系物显示在 m/z 1505.841和 1527.837 处。Surfactin 和 fengycin 的质谱峰分析参考(Vater *et al.*,2002)。m/z 处于 3400~3450,与文献(Lee *et al.*,2010)报道的 *Bacillus subtilis* SC-8菌株产物相似,是一种新型脂肽类物质,具有抑菌活性(Yeo *et al.*,2011)。

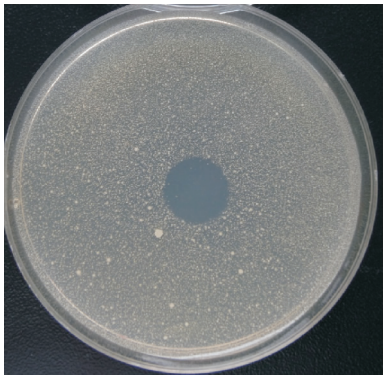


图 6　dhs-330 菌株表面活性产物对 *Bacillus pumilus* 的抑菌效果
Fig.6　Inhibitory effect of biosurfactant products of dhs-330 on *Bacillus pumilus*

2.4　表面活性剂产物的抑菌作用

采用平板抑菌实验考察菌株 dhs-330 所产表面活性剂的抑菌性能。如图 6 所示,dhs-330 发酵表面活性产物的粗提物溶液对海洋污损微生物 *B. pumilus* dhs04 表现出较好的抑菌效果,形成明显的抑菌圈,抑菌圈直径达 16.2 mm。这说明,菌株 dhs-330 合成的脂肽-糖脂混合型表面活性剂具备抑菌能力,可用于抑制某些污损微生物的生长。

3　讨　论

生物表面活性剂具有良好的表面活性且对环境友好,应用前景广阔,因此筛选表面活性剂产生菌、鉴定产物结构和功能以及开发其在化工、医药、环境修复等领域的应用已成为研究热点。本研究从渤海湾海水样品中筛选出一株表面活性剂产生菌 dhs-330,可使发酵液表面张力值降低至 27 mN·m^{-1},排油圈最大直径可达 7 cm。经形态观察和 16S rDNA 序列测定比对,初步鉴定该菌株属于 *Bacillus* sp.。本研究分别考察了各 5 种碳源、有机氮源和无机氮源对菌株生长和产生物表面活性剂水平的影响,分别优选甘油、酵母膏和尿素。甘油是柴油生产的副产物,其产量可观且价格便宜,与葡萄糖相比不受灭菌过程的损耗,是优选的较廉价碳源;酵母膏和尿素作为最适氮源,同时具备价格低廉的优势,能够降低发酵成本,具有工业价值(Tan *et al.*,2013)。考察培养环境 pH 和培养温度的影响,结果显示,菌株 dhs-330 生长和生物表面活性剂合成的最适 pH 值为 6.5~7.0,最适温度为 30~35 ℃。

芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)是合成脂肽类生物表面活性剂的最主要种属。1968 年 Arima 等首次发现 *Bacillus subtilis* IFO3039 产生脂肽类物质,商品名为表面活性素 Surfactin,是已知最有效的生物表面活性剂之一。此后又有研究报道芽孢杆菌合成丰原素(fengycin)、伊枯草菌素(iturin)、地衣素(lichenysin)等多种类型脂肽。本研究通过 MALDI-TOF-MS 的方法对菌株 dhs-330 的表面活性产物进行了鉴定,初步得到 3 类脂肽类物质,分别为 surfactin、fengycin 和一种类似 BSAP-254 的未知物质。同时,对 dhs-330 产物的定性分析还获得两类糖脂类物质,分别为双鼠李糖脂和单鼠李糖脂。糖脂由亲水性糖基和疏水性脂肪酸链组成,具有突出的乳化性和增溶性,较好的洗油效率,在提高原油采收率(Wang *et al.*,

2007)和修复海上溢油污染(Harvey *et al.*,1990)等方面取得了很好的应用效果,但在 *Bacillus* 种属的菌株中报道较少。Christova 等(2004)首次报道了一株具有鼠李糖脂合成能力的 *B. subtilis*,并能够降解烃类物质。最近,有研究报道了从油田地下废水、油污土壤中分离的 *B. subtilis* TU2(Cheng *et al.*, 2013)、THY-7(刘皓等,2013a)和 THY-8(刘皓等,2013b)菌株能够同时生成脂肽和鼠李糖脂混合生物表面活性剂,其乳化和驱油活性可用于石油开采。本研究中,dhs-330 是首次报道从海水中筛选获得产脂肽-糖脂混合型生物表面活性剂的芽孢杆菌菌株。

脂肽和糖脂类物质除具有较强的表面活性,还具有抑菌活性。脂肽 surfactin 能作用于微生物细胞膜磷脂双分子层,改变细胞膜通透性和功能性,抑制微生物生长(Sen,2010);fengycin 对抑制真菌起重要作用(Ongena *et al.*,2005);BSAP-254 类似物是一种具有抑菌活性的新型脂肽(Yeo *et al.*,2011);鼠李糖脂以细胞壁为作用靶点抑制致病菌生长(Ding *et al.*,2011)。本研究中,菌株 dhs-330 发酵液粗提物经 MALDI-TOF-MS 鉴定到上述物质,经平板抑菌实验验证,其产物表现出对 *B. pumilus* dhs04 的抑菌活性。*B. pumilus* 作为芽孢杆菌属,通过形成生物被膜附着于海洋工程管网中,是常见的海洋污损微生物(Vladkova *et al.*,2014)。本研究中,*B. pumilus* dhs04 是本实验室从海水处理系统中分离到的附着菌株,表明 dhs-330 产物可用于海洋工程中污损微生物的防除,为海洋工程污损防治提供了新资源,但其具体的抑菌机理、最佳抑菌条件及相关应用尚需进一步研究。

参考文献

刘 皓, 杨 欢, 李 雪, 等. 2013a. 脂肽-糖脂混合生物表面活性剂产生菌筛选和优化培养. 生物工程学报, **29**(12): 1870-1874.

刘 皓, 杨 欢, 袁 涛, 等. 2013b. 脂肽-糖脂混合型生物表面活性剂的性能及助剂. 化工进展, **32**(12): 2952-2956.

Abdel-Mawgoud AM, Lepine F, Deziel E. 2010. Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **86**: 1323-1336.

Al-Wahaibi Y, Joshi S, Al-Bahry S, *et al.* 2014. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **114**: 324-333.

Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, *et al.* 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **87**: 427-444.

Cheng F, Tang C, Yang H, *et al.* 2013. Characterization of a blend-biosurfactant of glycolipid and lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* TU2 isolated from underground oil-extraction wastewater. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **23**: 390-396.

Christova N, Tuleva B, Nikolova-Damyanova B. 2004. Enhanced hydrocarbon biodegradation by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **59**: 205-208.

Dash HR, Mangwani N, Chakraborty J, *et al.* 2013. Marine bacteria: Potential candidates for enhanced bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**: 561-571.

Ding N, Zhang Z, Zhang W, *et al.* 2011. Synthesis and antibacterial evaluation of a series of oligorhamnoside derivatives. *Carbohydrate Research*, **346**: 2126-2135.

Gudina EJ, Fernandes EC, Teixeira JA, *et al.* 2015. Antimicrobial and anti-adhesive activities of cell-bound biosurfactant from *Lactobacillus agilis* CCUG31450. *RSC Advances*, **5**: 90960-90968.

Harvey S, Elashvili I, Valdes JJ, *et al.* 1990. Enhanced removal of exxon valdez spilled oil from Alaskan Gravel by a microbial surfactant. *Nature Biotechnolgy*, **8**: 228-230.

Itokawa H, Miyashita T, Morita H, *et al.* 1994. Structural and conformational studies of [Ile7] and [Leu7] surfactins from *Bacillus subtilis natto*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **42**: 604.

Joshi SJ, Geetha S, Desai AJ. 2015. Characterization and application of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* R2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **177**: 346-361.

Lee NK, Yeo IC, Park JW, *et al.* 2010. Isolation and characterization of a novel analyte from *Bacillus subtilis* SC-8 antagonistic to *Bacillus cereus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **110**: 298-303.

Nie M, Yin X, Ren C, *et al.* 2010. Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3. *Biotechnology Advances*, **28**: 635-643.

Ongena M, Jacques P, Touré Y, *et al.* 2005. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **69**: 29-38.

Ron EZ, Rosenberg E. 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, **3**: 229-236.

Satpute SK, Banat IM, Dhakephalkar PK, *et al.* 2010. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances*, **28**: 436-450.

Sen R. 2010. Surfactin: Biosynthesis, genetics and potential applications// Sen R, ed. Biosurfactants. New York: Sprin-ger: 316-323.

Sun XX, Choi JK, Kim EK. 2004. A preliminary study on the mechanism of harmful algal bloom mitigation by use of sophorolipid treatment. *Journal of Experimental Marine Biolo-*

gy and Ecology, **304**: 35-49.

Tan H, Aziz AA, Aroua M. 2013. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **27**: 118-127.

Vater J, Kablitz B, Wilde C, *et al*. 2002. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 6210-6219.

Vijaya B, Jayalakshmi N, Manjunath K. 2014. Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* PAVIJ from contaminated soil. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **5**: 881-895.

Vladkova T, Akuzov D, Klöppel A, *et al*. 2014. Current approaches to reduction of marine biofilm formation. *Journal of Chemical Technology & Metallurgy*, **49**: 345-355.

Wang Q, Fang X, Bai B, *et al*. 2007. Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnology and Bioengineering*, **98**: 842-853.

Yeo IC, Lee NK, Cha CJ, *et al*. 2011. Narrow antagonistic activity of antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* SCK-2 against *Bacillus cereus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **112**: 338-344.

作者简介　杜　瑾,女,1985 年生,博士,工程师,主要从事海水利用技术及合成生物学相关研究。E-mail: dujin111@126.com

责任编辑　魏中青