

文章编号: 1000-5862(2013)02-0162-04

炭样小单孢菌 JXNU-1 产抗生素对 G^- 的体外抗菌作用及其机理的初步研究

彭伟梦, 黄运红, 李 瑾, 高兴强, 龙中儿*

(江西师范大学生命科学学院 江西 南昌 330022)

摘要: 基于土壤中分离到的一株具广谱抗菌活性的炭样小单孢菌 JXNU-1, 研究了 JXNU-1 所产抗生素对 G^- 的体外抗菌作用. 研究结果表明: 炭样小单孢菌 JXNU-1 所产抗生素对产气肠杆菌、伤寒沙门氏菌、铜绿假单孢菌、福氏志贺氏菌等常见 G^- 细菌均有抗菌作用, 其最低杀菌浓度一般是最低抑菌浓度的 8~16 倍. 杀菌曲线表明其对 G^- 的杀菌作用非常快速, 8 h 的杀菌率已超过 90%. 进一步的研究表明抗生素抗 G^- 的作用机理在于抑制细菌蛋白质的合成, 进而抑制细胞的分裂.

关键词: 炭样小单孢菌; 抗生素; 革兰氏阴性菌; 抗菌作用

中图分类号: Q 939.9

文献标志码: A

0 引言

炭样小单孢菌(*Micromonospora carbonacea*) 在分类学上属于放线细菌纲(Actinobacteria), 放线菌目(Actinomycetales), 小单孢菌科(Micromonosporaceae), 小单孢菌属(*Micromonospora*). 炭样小单孢菌最初由 Luedemann 和 Brodsky 于 1964 年分离^[1-3], 并研究发现该菌可以产生一多组份的糖类衍生物抗生素——扁枝衣霉素(Everninomicin) 复合物^[2-6]. 从海洋中分离获得一株炭样小单孢菌也可产生有抗肿瘤和免疫抑制作用, 但没有抗菌作用的染料木素和大豆黄素^[7]. 目前, 暂未见有关炭样小单孢菌发酵产其他活性物质的文献报道.

本课题组从土壤样品中分离获得一株具有广谱抗菌作用的炭样小单孢菌 JXNU-1 (*Micromonospora carbonacea* JXNU-1)^[8], 其对水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo) 等植物病原菌也有较强的抗菌活性^[9], 其产抗生素的发酵工艺过程、影响发酵产抗生素的因素及其作用规律在文献[10]中作了系统探讨, 文献[11]优化了分离纯化抗生素的工艺, 并获得了分析纯的抗生素. 该抗生素经紫外-可见光谱、红外光谱、质谱及核磁共振谱等仪器分析确定为核苷类抗生素. 本文以产气肠杆菌

(*Enterobacter aerogenes*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、铜绿假单孢菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 等革兰氏阴性菌(G^-) 为例, 报道它的体外抗菌活性及其作用机理, 为该抗生素的开发利用提供理论依据.

1 实验材料与方法

1.1 实验菌种

炭样小单孢菌 JXNU-1、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*) 和铜绿假单孢菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 均由本实验室提供.

1.2 培养基

1.2.1 牛肉膏蛋白胨培养基(供细菌活化培养用)

牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 15~20 g, 水 1 L, pH 值为 7.0~7.2, 121 °C 灭菌 20 min.

1.2.2 高氏 I 号培养基(供斜面保存炭样小单孢菌用)

FeSO₄ 0.01 g, 可溶性淀粉 20 g, KNO₃ 1 g, K₂HPO₄ 0.5 g, NaCl 0.5 g, MgSO₄ 0.5 g, 琼脂 20 g, 水 1 L, 调节 pH 值为 7.2~7.4. 配置时, 先用少量冷水将淀粉调成糊状, 倒入煮沸的水中, 在火上加热, 边搅拌边加入其他成分, 待溶化后补足水分至 1 L,

收稿日期: 2012-12-19

基金项目: 国家自然科学基金(31160029) 和江西省自然科学基金(20122BAB204008) 资助项目.

通信作者: 龙中儿(1970-), 男, 江西崇仁人, 教授, 博士, 主要从事基础和应用微生物学研究.

121 ℃ 灭菌 20 min.

1.2.3 种子培养基(供炭样小单孢菌种子培养用)

黄豆粉 12.5 g,蔗糖 22.5 g, CaCO₃ 2 g, NaCl 1 g, Na₂SO₄ 0.1 g, K₂HPO₄ 0.2 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, 用水定容至 1 L, pH 值为 7.2, 121 ℃ 灭菌 20 min.

1.2.4 发酵培养基(供炭样小单孢菌发酵用)

FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, 蔗糖 13 g, 花生饼粉 35 g, 淀粉 20 g, CaCO₃ 3 g, NaCl 1 g, Na₂SO₄ 0.1 g, K₂HPO₄ 0.1 g, 以水定容至 1 L, pH 值为 7.7, 121 ℃ 灭菌 20 min.

1.2.5 营养肉汤(MH 肉汤) 上海沪峰生化试剂有限公司产品.

1.3 实验方法

1.3.1 抗生素发酵液的制备 炭样小单孢菌 JXNU-1 接种于斜面活化 20 ℃ 培养 5 d, 并用无菌生理盐水洗脱孢子, 按体积比 1% 接种于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角摇瓶中, 于 200 r/min、28 ℃ 条件下振荡培养 72 h. 然后以体积比为 6% 的接种量移种于装有 20 mL 发酵培养基的 250 mL 三角摇瓶中, 在 200 r/min、28 ℃ 条件下振荡培养 108 h, 最后收集抗生素发酵液.

1.3.2 抗生素的制备 鉴于文献[11]的研究结果表明, 炭样小单孢菌 JXNU-1 发酵液中有且仅有单一抗菌活性组分. 本研究将抗生素的制备过程简化如下: 首先将发酵液 4 000 r/min 离心 20 min, 除菌体、收集上清; 用新华滤纸过滤除油脂, 然后向滤液中加入 2 倍体积的冷无水乙醇, 并置于 4 ℃ 冰箱中, 4 h 后离心收集上清; 上清调 pH 值为 7.0, 旋转蒸发去乙醇, 蒸馏水定容至原发酵液体积, 121 ℃ 灭菌 20 min, 备用.

1.3.3 菌悬液的制备 将靶菌在营养琼脂培养基平板上划线分离, 并倒置于 37 ℃ 培养箱中培养 16 h, 挑取单菌落接种于装有 5 mL 营养肉汤培养基的 15 mL 试管中, 在 200 r/min、37 ℃ 条件下振荡培养 4~6 h, 培养物稀释至 10⁶ cfu/mL 左右.

1.3.4 抗生素的抑菌作用 抗生素的抗菌谱采用琼脂扩散法测定, 抗生素的最低抑菌浓度(Minimal Inhibition Concentration, MIC) 采用试管二倍稀释法测定^[12].

1.3.5 抗生素的杀菌作用 抗生素的最低杀菌浓度(Minimal Bacteriocidal Concentration, MBC) 和抗生素的时间-杀菌曲线具体实验操作步骤参见文献[12].

1.3.6 抗生素对靶菌细胞形态的影响 MH 肉汤培养基中接入靶菌, 使其细胞的终浓度约为 10⁵ cfu/

mL, 抗生素的终浓度为 MIC, 200 r/min、37 ℃ 培养 12~24 h, 革兰氏染色、镜检, 观察细胞的形态, 并摄像. 同时设不加抗生素的对照组.

1.3.7 抗生素对细菌细胞蛋白质合成的影响 在含抗生素的 MH 肉汤培养中接入靶菌, 使其细胞的终浓度为 10⁵ cfu/mL, 200 r/min、37 ℃ 培养 12 h 后, 4 000 r/min 离心 20 min 后弃上清, 尽量吸干离心管壁水分, 计量菌体的湿质量, 向管中加入已知体积的蒸馏水, 悬浮细胞均匀后, 超声破壁(间歇 5 s, 工作 3 s, 共 5 min), 12 000 r/min 离心 10 min, 弃沉淀, 测上清蛋白质浓度, 计算单位湿质量菌体中的蛋白质含量. 然后以抗生素浓度与相应浓度抗生素作用下的生长的菌体中的蛋白质含量, 计算出在 MIC 浓度条件下的菌体蛋白质含量.

1.3.8 蛋白质浓度测定 采用考马斯亮蓝法^[13]测定.

2 结果与讨论

2.1 抗生素的抑菌作用

体外抗生素实验目的是检测抗生素的体外抑制细菌生长的效力和抗菌谱, 其方法有定量的液体稀释法和定性的琼脂扩散法. 本文首先探讨了抗生素对革兰氏阴性细菌的抗菌谱, 结果表明抗生素对好氧的如铜绿假单孢菌、兼性厌氧的如产气肠杆菌、伤寒沙门氏菌和福氏志贺氏菌等常见的革兰氏阴性细菌均有较强的抗菌作用. 抗生素对上述靶菌的 MIC 如表 1 所示.

表 1 抗生素对 G⁻ 最低抑菌浓度(MIC) 和最低杀菌浓度(MBC)

供试菌	MIC	MBC
铜绿假单孢菌	2 ⁻⁷	2 ⁻³
福氏志贺氏菌	2 ⁻⁷	2 ⁻⁴
伤寒沙门氏菌	2 ⁻⁷	2 ⁻⁴
产气肠杆菌	2 ⁻⁷	2 ⁻³

2.2 抗生素的杀菌作用

最低杀菌浓度(MBC) 和时间-杀菌曲线是定量评价抗生素杀菌效力的参数, 其中 MBC 可用于评价抗生素的杀菌强度, 炭样小单孢菌产抗生素对靶菌的 MBC 如表 1 所示. 新型抗生素对靶菌的 MBC 是其 MIC 的 8~16 倍.

时间-杀菌曲线是评价抗生素对靶菌的杀菌速率的参数. 炭样小单孢菌产抗生素对靶菌的时间-杀菌曲线如图 1 所示. 由图 1 可见, 该抗生素对 G⁻ 的杀菌作用非常强, 在 8 h 内对 4 种菌的杀菌率均已超过 90%.

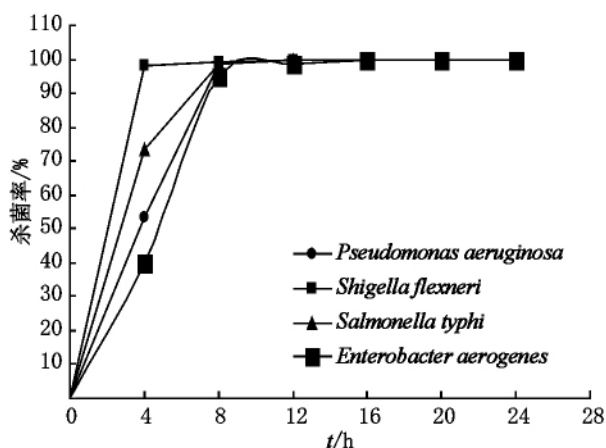
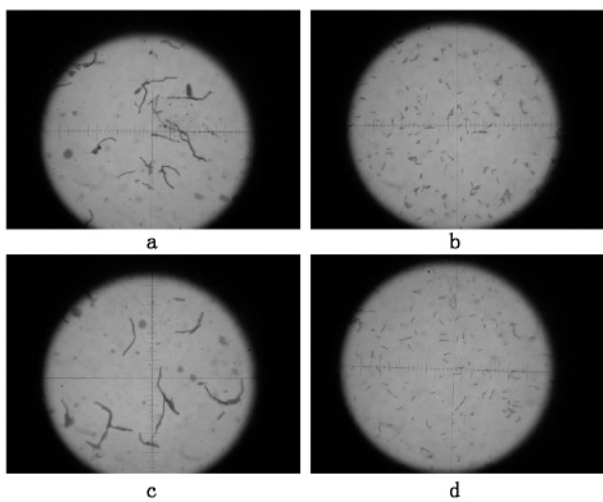


图1 炭样小单孢菌 JXNU-4 产抗生素对 G^- 的时间-杀菌曲线

2.3 抗生素对 G^- 菌形态的影响

实验观察了最低抑菌浓度的抗生素作用下的细菌细胞形态变化,以分析炭样小单孢菌 JXNU-4 产抗生素的抗菌作用机理.结果表明,在最低抑菌浓度的抗生素作用下,细菌个体明显变长呈丝状,体积也明显增大(抗生素作用后的福氏志贺氏菌和产气肠杆菌的形态变化如图 2 所示),数量明显少于对照组(实验管始终澄清,而对照管变得浑浊),且连续 7 d 染色镜检结果均保持一致,但革兰氏染色结果依然呈革兰氏阴性.上述结果说明,炭样小单孢菌 JXNU-4 产抗生素抑制了 G^- 的细胞分裂.



(a)、(c) 分别为最低抑菌浓度抗生素处理后的福氏志贺氏菌和产气肠杆菌;(b)、(d) 则分别为对照组的福氏志贺氏菌和产气肠杆菌.

图2 炭样小单孢菌 JXNU-4 产抗生素对 G^- 形态影响

2.4 抗生素对 G^- 蛋白质合成的影响

由于本研究所用的炭样小单孢菌 JXNU-4 所产抗生素具有核苷类物质的光谱吸收特征峰^[11],初步表明该抗生素为一核苷类抗生素,核苷类抗生素的抗菌作用机理包括抑制蛋白质合成^[14]、抑制核酸合

成^[15],进而抑制细胞的分裂^[16-17].本研究在证实抗生素能够抑制 G^- 细胞分裂的基础上,进一步研究了不同浓度抗生素条件下培养的 G^- 细胞蛋白质的含量.结果表明,在一定抗生素浓度范围内, G^- 细菌细胞蛋白质含量随抗生素浓度的增加呈线性递减(如图 3 所示),进而可求得在抗生素(MIC 浓度)作用下各 G^- 细胞蛋白质的含量,如产气肠杆菌在不含抗生素的 MS 肉汤中培养时的蛋白质含量为 69.283 mg/g,而在 MIC 的抗生素条件下培养的细胞蛋白质含量为 23.963 mg/g(如表 3 所示).由此可知,抗生素可显著抑制 G^- 细胞蛋白质合成.

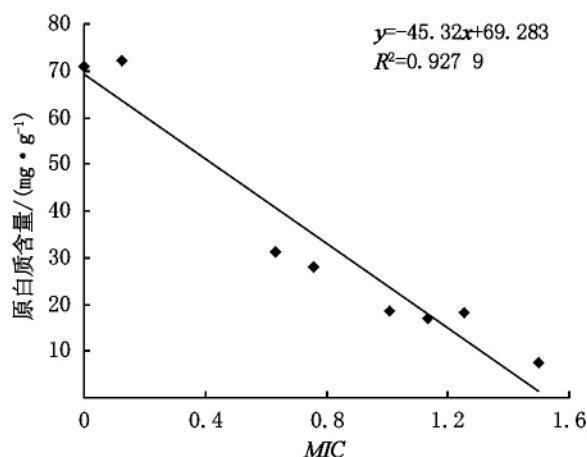


图3 抗生素作用浓度对产气肠杆菌细胞蛋白质含量的影响

表3 抗生素对 G^- 细胞蛋白质含量的影响

菌种	抗生素作用下的细胞蛋白质含量/(mg · g ⁻¹)	对照/(mg · g ⁻¹)
铜绿假单孢菌	14.669	70.985
福氏志贺氏菌	20.358	58.762
伤寒沙门氏菌	17.287	35.901
产气肠杆菌	23.963	69.283

3 结论与展望

本文研究了炭样小单孢菌 JXNU-4 产抗生素对 G^- 的体外抗菌作用,结果表明:

(i) 炭样小单孢菌 JXNU-4 所产抗生素对产气肠杆菌、伤寒沙门氏菌、铜绿假单孢菌、福氏志贺氏菌等 G^- 均有拮抗作用,且在相对较低浓度时表现为抑菌,在相对较高浓度时表现为杀菌,其最低杀菌浓度一般是最低抑菌浓度的 8~16 倍,在最低杀菌浓度条件下处理 8 h 时的杀菌率均超过 90%;

(ii) 通过观察抗生素处理的 G^- 的个体形态变化,说明抗生素可抑制 G^- 的细胞分裂.

(iii) 通过分析检测不同浓度的抗生素作用下 G^- 细胞蛋白质的含量变化,表明抗生素可抑制 G^- 的细胞蛋白质的合成.

从上述结果可以进一步推断,炭样小单孢菌

JXNU-1 产抗生素对 G⁻ 的抗菌作用机理在于抑制细菌蛋白质的合成,进而抑制细胞的分裂。当然,有关该抗生素抑制细胞蛋白质合成的具体分子机制还有待于进一步研究。

4 参考文献

- [1] 布坎南 R E,吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 1186-1198.
- [2] Luedemann G M, Brodsky B C. *Micromonospora carbonacea* sp. n., an everninomicin producing organism [M] // Sylvester J C. Antimicrobial agents and chemotherapy-1964. Ann Arbor, Michigan: American Society for Microbiology, 1965: 47-52.
- [3] Weinstein M J, Luedemann G M, Oden E M, et al. Everninomicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora carbonacea* [M] // Sylvester J C. Antimicrobial agents and chemotherapy-1964. Ann Arbor, Michigan: American Society for Microbiology, 1965: 24-32.
- [4] Herzog H L, Meseck E, Delorenzo S, et al. Chemistry of antibiotics from micromonospora: III. Isolation and characterization of everninomicin D and everninomicin B [J]. Applied Microbiology, 1965, 13(4): 515-520.
- [5] Kabasakalian P, Kalliney S. Quantitative thin-layer chromatography of everninomicin D [J]. Journal of Chromatography, 1973, 86(21): 145-149.
- [6] Sanders W E, Sanders C C. Microbiological characterization of everninomicins B and D [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1974, 6(3): 232-238.
- [7] 江红, 程元荣, 郑卫. 海洋炭样小单孢菌产生的大豆黄素和染料木素 [J]. 中国海洋药物, 2007, 26(1): 8-12.
- [8] 龙中儿, 朱跃进, 黄运红, 等. 一株具有广谱抗菌活性小单孢菌的分离和鉴定 [J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 378-383.
- [9] 戴菲, 黄运红, 宁茜, 等. 炭样小单孢菌抗生素对水稻白叶枯病菌的抑菌作用 [J]. 农药, 2011, 50(4): 302-304.
- [10] 朱跃进, 龙中儿, 黄运红, 等. 一株稀有放线菌发酵产抗生素的工艺研究 [J]. 化学与生物工程, 2006, 23(12): 39-42.
- [11] 龙中儿, 朱跃进, 黄运红, 等. 炭样小单孢菌 JXNU-1 广谱抗生素产物的分离及其理化性质 [J]. 微生物学通报, 2008, 35(9): 1450-1454.
- [12] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1647-1664.
- [13] 刘箭. 生物化学实验教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 17-19.
- [14] Isino K. Nucleoside antibiotics: structure, biological activity and biosynthesis [J]. The Journal of Antibiotics, 1988, 41(12): 1711-1739.
- [15] Rachakonda S, Cartee L. Challenges in antimicrobial drug discovery and the potential of nucleoside antibiotics [J]. Current Medicinal Chemistry, 2004, 11(6): 775-793.
- [16] Winn M, Goss R J M, Kimura K, et al. Antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall assembly: Recent advances in structure-function studies and nucleoside biosynthesis [J]. Natural Product Reports, 2010, 27(2): 279-304.
- [17] Isono K. Current progress on nucleoside antibiotics [J]. Pharmacology and Therapeutics, 1991, 52(3): 269-286.

Studies on the Antimicrobial Activity and Its Mechanism of an Antibiotic from *Micromonospora carbonacea* JXNU-1 , Against Gram-Negative Bacteria *in Vitro*

PENG Wei-meng, HUANG Yun-hong, LI Jin, GAO Xing-qiang, LONG Zhong-er
(College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China)

Abstract: Based on the strain of *Micromonospora carbonacea* JXNU-1 with board-spectrum antimicrobial activity, isolated from a soil sample, the antibacterial activity of its antibiotics against gram-negative bacteria *in vitro* was studied. The results indicated that the antibiotics had antimicrobial activity against common gram-negative bacteria, such as *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* and so on. The killing curve proved that the bactericidal action was very rapidly, the sterilizing rate over 90% when germs were treated with antibiotics for 8 hours, and the *MBC* usually 8 to 16 times of the *MIC*. Further more, studies have shown that the mechanism of the antibiotics against gram-negative bacteria is to inhibit bacterial protein synthesis, and thereby inhibiting cell division.

Key words: *Micromonospora carbonacea*; antibiotics; gram-negative bacteria; antimicrobial activity

(责任编辑 刘显亮)