

一株类芽孢杆菌的鉴定及抗菌活性探究

陈利^{1,2}, 黄升^{1,2}, 苏国旗^{1,2},

杨飞云^{1,2}, 黄金秀^{1,2}, 齐仁立^{1,2*}, 刘作华^{1,2*}

¹重庆市畜牧科学院; ²国家生猪技术创新中心, 重庆 402460

摘要: 为了筛选产新型天然抗菌物质微生物, 本研究利用共培养的方法筛选目的菌株; 通过 16S rDNA、生理生化性质和全基因组测序鉴定菌株种属; 利用抗菌物质稳定性、菌株基因组次级代谢产物预测和最小抑菌浓度研究抗菌物质的生物学特性。从土壤中筛选了一株类芽孢杆菌 *Paenibacillus elgii* CL-1, 该菌所产抗菌物质具有广谱抗菌性能, 且耐受过氧化氢酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K 和酸碱, 高温不稳定; 利用 antiSMASH 分析发现 *Paenibacillus elgii* CL-1 含有 penisin 和 octapeptin C4 等 17 种次级代谢产物基因簇; 进一步的分析发现, 通过高效液相色谱从该菌发酵液中分离纯化出的抗菌物质抗菌谱广, 抗菌活性好, 最小抑菌浓度值可达 1 μg/mL。通过质谱分析发现类芽孢杆菌 *Paenibacillus elgii* CL-1 能够产生抗菌谱广、稳定性好和抗菌活性强的抗菌物质 pelgipeptin B。本研究为挖掘天然抗菌药物 Pelgipeptin B 提供底盘菌株, 为其研发和应用奠定基础。

关键词: 类芽孢杆菌; 天然抗菌物质; 抗菌活性; 最小抑菌浓度

中图分类号: R978.1

文章标识码: A

Identification and antimicrobial activity of a strain of

Paenibacillus elgii

CHEN Li^{1,2}, HUANG Sheng^{1,2}, SU Guo-qi^{1,2}, YANG Fei-yun^{1,2}, HUANG Jin-xiu^{1,2},

QI Ren-li^{1,2*}, LIU Zuo-hua^{1,2*}

¹ Chongqing Academy of Animal Sciences; ² National Center of Technology Innovation for Pigs, Chongqing

402460, China

Abstract: This study was conducted to screen the microorganisms producing novel natural antimicrobial substances. The target strains were screened by co-culture method; the strains were identified by 16S rDNA, physiological and biochemical properties, and whole genome sequencing; and the stability of the antimicrobial substances, the prediction of secondary metabolites in the genome of the strains, and the minimum inhibitory concentration (MIC) were utilized to study the biological properties of the antimicrobial substances. The results showed that a strain named *Paenibacillus elgii* CL-1 was screened from the soil, which produced antimicrobial substances with broad-spectrum antimicrobial properties and was resistant to catalase, pepsin, trypsin, proteinase

K, and acid/base, and unstable at high temperatures. The antiSMASH analysis was used to find out that *Paenibacillus elgii* CL-1 contains 17 secondary metabolite gene clusters, including penisin and octapeptin C4. Further analysis revealed that the antimicrobial substances isolated and purified from the fermentation broth of CL-1 by high-performance liquid chromatography had a broad antimicrobial spectrum and good antimicrobial activity, with a minimum inhibitory concentration value of up to 1 $\mu\text{g/mL}$. Through mass spectrometry analysis, it was found that the Bacillus-like bacterium *Paenibacillus elgii* CL-1 was able to produce Pelgipeptin B, which has a broad antimicrobial spectrum, good stability, and strong antimicrobial activity. The present study provides a chassis strain for the exploration of the natural antimicrobial drug Pelgipeptin B and lays a foundation for its research and development as well as its application.

Key words: *Paenibacillus elgii*; natural antimicrobial substances; antimicrobial activity; minimum inhibitory concentration

随着抗生素在人类健康和畜牧生产中的大量使用，病原菌的耐药性也逐渐增强。以甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA）与多重耐药结核分枝杆菌为主的革兰氏阳性菌和以超广谱 β -内酰胺酶（extended spectrum beta-lactamases, ESBLs）细菌为主的革兰氏阴性菌产生的耐药现象，已成为全球医疗解决的重要问题^[1]。筛选新的抗菌药物迫在眉睫，其中天然的产物来源的药物研发占据重要地位。天然抗菌药物主要破坏靶细胞的膜结构，且破坏的细胞膜很难快速修复，故不易产生耐药性^[2]，且主要来源于变形菌门、放线菌门和厚壁菌门，如假单胞菌、类芽孢杆菌、伯克霍尔德菌、芽孢杆菌等^[3,4]。其中，类芽孢杆菌的次级代谢产物丰富^[5]，是研究天然抗菌物质的重要资源，因此筛选具有抗菌活性的类芽孢杆菌新菌株具有重要意义。迄今，前人研究已经获得多种可产抗菌物质的类芽孢杆菌^[6]，如从发酵蔬菜中分离出来的 *Paenibacillus polymyxa* OSY-DF，能够产生羊毛硫抗生素，仅对革兰氏阳性菌有抗菌作用^[7]；从土壤中分离出来的 *Paenibacillus* sp. OSY-SE 能产生一种新型非核糖体环状阳离子脂肽 paenibacterin，它对革兰氏阳性菌和阴性菌均有抗菌作用^[8]；从土壤中分离的 *Paenibacillus polymyxa* KT-8，能产生一种环状非阳离子的脂肽 fusaricidin A，有广谱抗菌性能，且目前其天然和人工结构都可以合成，用以提高稳定性和降低细胞非特异毒性^[9]。类芽孢杆菌主要来源于土壤^[5]，因此，本研究在重庆周边采集土壤样品，筛选具有抗菌活性的新菌株，通过进一步探究菌株抗菌物质的活性和稳定性，为后续新型天然抗菌药物的开发奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923、ATCC 43300、ATCC 33591、ATCC 29213、ATCC 6538、CMCC 26003)、链球菌 *Streptococcus* (ATCC 35666、ATCC 700407)、粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299、ATCC 29212)、产气荚膜梭菌 *Clostridium perfringens* (ATCC 13124)、大肠杆菌 *Escherichia coli* (CVCC 1569、CVCC 2080、ATCC 25922、CVCC 1518、CVCC 1557)、伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* (CVCC 534)、鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella gallinarum* (CVCC 534)、绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* (CMCC 10104、ATCC 27853)、痢疾志贺氏菌 *Shigella dysenteriae* (ATCC 11835)、福氏志贺氏菌 *Shigella flexneri* (ATCC 12022)、宋内志贺氏菌 *Shigella sonnei* (ATCC 25931)，耐多粘菌素大肠杆菌 (Polymyxin resistant *Escherichia coli*) 为实验室所有。

1.1.2 培养基

R2A 液体培养基 (批号: 20221025)、NB 液体培养基 (批号: 20221223) 和琼脂粉 (批号: 20230225) 均来自青岛海博生物技术有限公司。

1.1.3 试剂

胰蛋白酶 (批号: A100260, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司); 胃蛋白酶 (批号: A600688, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司); 过氧化氢酶 (批号: C8070, 北京索莱宝科技有限公司); 蛋白酶 K (批号: SAE0009, 默克生物科技有限公司); API 50 CHB 生理生化试剂盒 (批号: 1008290010, 梅里埃生物科技有限公司); 其他常用试剂均为国产分析纯。

1.1.4 仪器

AKTA pure 25L 蛋白纯化仪 (中国 Cytiva 公司); Agilent 1260 制备型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Thermo Ultimate 3000-Q Exactive 组合型超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱联用仪 (美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 土壤样品采集

在重庆荣昌岚峰森林公园 (N 29°17'21"; E 105°33'01"), 取 0~30 cm 深度的土壤, 去除草根等杂质, 混匀后, 四分法到 100 g 后, 装入无菌自封袋中, 记录采样信息标记后 4 °C 冷藏箱暂时保存。

1.3 指示菌平板

用 NB 固体培养基 37 °C 培养活化指示菌金黄色葡萄球菌 ATCC 29213，取平板上的单菌落，接种到 R2A 培养液中培养过夜。转接过夜培养的指示菌至高压灭菌冷却至 50 °C 左右的 R2A 固体培养基，终浓度约 1×10^6 CFU/mL，混匀后倒平板。

1.4 微生物筛选

称取 5 g 土壤样品与 45 mL 的 R2A 培养液混匀制备成样品悬液，33 °C，180 r/min 培养 1 h。用生理盐水将样品悬液稀释至 100、1000、10000 倍，分别取 0.1 mL 涂布在金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 的 R2A 指示菌平板上培养筛选。25 °C 培养，持续观察 14 d，标记 R2A 平板上有抑菌圈的菌落，并用无菌牙签挑取，R2A 平板划线分离纯化。

1.5 抑菌圈

挑取活化的待测菌株接种到 3 mL 的 NB 培养基，33 °C、180 r/min 培养 16 h。然后 1% 转接到 50 mL 新的 NB 培养液中，33 °C、180 r/min 培养 24 h。发酵液 5 000 r/min 离心 5 min 得上清液，吸取 100 μ L 到指示菌平板上样孔中，静置 1 h，待液体完全吸收后，培养指示菌平板 16~18 h，观察并统计抑菌圈直径。

1.6 菌株生理生化测定

根据 API 50 CHB 试剂盒说明书进行试验，制备浊度相当于 2 McF 的 CL-1 菌株悬液，按照相关要求将细菌悬液加入到试条上 50 个管中，厌氧条件下根据细菌的生长条件进行孵育：在 24 h 和 48 h 两次判读试条，注意阳性反应和阴性反应，反应结果由鉴定软件 APIweb 进行分析。

1.7 16S rDNA 获取

取待测菌株菌液作为模板，用引物 27F：5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R：5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 扩增待测菌株 16S rDNA 保守区片段。PCR 扩增体系 50 μ L，Premix Taq：25 μ L；Primer 27 F：1 μ L；Primer 1492 R：1 μ L；菌液：3 μ L；灭菌水 20 μ L。PCR 扩增条件：98 °C 预变性 60 s；98 °C 变性 10 s，60 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 60 s，30 个循环；72 °C 延伸 5 min，1.5% 的琼脂糖凝胶检测 PCR 产物。PCR 产物送北京擎科生物科技有限公司进行测序，得到目的菌 16S rDNA 序列。

1.8 16S rDNA 同源比对分析

PCR 产物序列进行 BLAST 比对，使用 MEGA7 构建分析系统发育树。系统发育树的自展值 (bootstrap values) 需要大于 70^[10]，以 16S rDNA 的相似性 97% 作为种的界限。其相似性小于 97%，一定为新种；当大于 97%，所筛菌种是新菌种的概率随着相似性的增加而减小，在此基础上同时考虑 DNA 同源性，即 DDH (DNA-DNA hybridization) 值小

于 70%，即不同物种^[11]。

1.9 全基因组测序分析

收集待测菌株对数期菌体，由北京诺禾致源科技股份有限公司在 PacBio 平台进行细菌完成图测序。16S rDNA 和全基因组序列上传至国家微生物科学数据中心 NMDC <https://nmdc.cn>，获取登录号。全基因组序列上传至相关检测计算数据库 <https://www.ezbiocloud.net/tools/ani> 计算平均核苷酸一致性（Average Nucleotide Identity, ANI）鉴定菌种种属^[12]，以 ANI 数值 96%为界限，大于 96%为同一物种，小于 96%为不同物种，通过 antiSMASH 6.0 软件对基因组进行次级代谢产物基因簇分析^[13]。

1.10 抗菌活性物质稳定性测定

酶稳定性：将待测菌株发酵液上清 pH 调至 7.3，分别添加过氧化氢酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K，使酶的终浓度为 1 mg/mL，37 °C 孵育 3 h，沸水浴 5 min 使酶灭活；将待测菌株发酵液上清 pH 调至 2.0，添加胃蛋白酶，使酶的终浓度为 1 mg/mL，37 °C 孵育 3 h 后将胃蛋白酶及对照反应体系调回 pH 7.3，沸水浴 5 min 使酶灭活；高温稳定性：将待测菌株发酵液上清加热至 80 °C 处理 2 h，以 *S.aures* ATCC 29213 为指示菌平板，用抑菌圈法检测处理后发酵液上清的抑菌活性。将上述处理的抑菌圈标注为：O-稀释 1.25 倍的发酵上清液；A-调整 pH 为 7.3 的已稀释 1.25 倍的代谢发酵上清液；T-pH 值为 7.3 的稀释 1.25 倍的代谢发酵上清液经过 80 °C 加热处理 2 h；2-调整 pH 为 2.0 的已稀释 1.25 倍的代谢发酵上清液，无酶处理；7.3-调整 pH 为 7.3 的已稀释 1.25 倍的代谢发酵上清液，无酶处理；P-胃蛋白酶处理已稀释 1.25 倍的代谢发酵液；Tr-胰蛋白酶处理已稀释 1.25 倍的代谢发酵液；K-蛋白酶 K 处理已稀释 1.25 倍的代谢发酵液；H-过氧化氢酶处理已稀释 1.25 倍的代谢发酵液。

1.11 抗菌活性物质纯化

菌株发酵上清液在室温条件下加入经研磨的硫酸铵粉末至饱和度为 50%，在 4 °C 冰箱中放置过夜。析出的沉淀在 12 000 r/min，4 °C 条件下离心 15 min 得抗菌活性物质初提物。

初提物用双蒸水溶解并用 10 mol/L 的盐酸调溶液 pH 值至 2.0，在 4 °C 环境中静置过夜。析出的沉淀在 12 000 r/min，4 °C 条件下离心 20 min 后用乙酸乙酯抽提三次，合并抽提液用旋转蒸发器除去乙酸乙酯得抗菌活性物质粗提物。

粗提物用 0.1 mol/L 的 PBS 溶液稀释成 1 mg/mL 的溶液，采用 Superdex 30 increase 10/300 GL 凝胶柱对上述获得的粗提物进行初步分离纯化。用超纯水平衡凝胶柱后上样，用超纯水在 0.3 mL/min 的洗脱速度下洗脱，共得七个馏分，记为 FrA~FrG。其中 FrD 馏

分冷冻干燥得到抗菌活性物质初分物。

用初始流动相溶解 FrD 馏分，过 0.22 μm 滤膜后使用制备型反相高效液相色谱（HPLC）仪进行分离纯化。色谱柱为 C_{18} 反相柱（21.5 mm \times 250 mm），仪器参数设置：检测波长 220 nm；柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ ；流速 5 mL/min；流动相 A：超纯水+0.1%三氟乙酸，流动相 B：乙腈+0.1%三氟乙酸；进样量 500 μL 。梯度洗脱：0~2 min，30%A；2~22 min，30% \rightarrow 50%A；22~28 min，50%A；28~30 min，50% \rightarrow 100%A；30~40 min，100%A；40~43 min，100% \rightarrow 30%A；43~46 min，30%A。

1.12 活性物质结构鉴定

用超纯水溶解活性物质纯品并配制成 1 mg/mL 的溶液，过 0.22 μm 滤膜后使用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道离子阱串联质谱检测。采用全扫描和 MS/MS 模式分别采集活性物质的一级和二级质谱图。质谱仪的设置参数：喷雾电压 3.5 kV；鞘气流速 48 L/min；辅助气流速 11 L/min；毛细管温度 240 $^{\circ}\text{C}$ ；辅助气加热器温度 300 $^{\circ}\text{C}$ ；采集时间 0~20 min；全扫描模式的分辨率 70 000 FWHM；MS/MS 模式的分辨率 35 000 FWHM，采集范围 m/z 100~1 500。

1.13 抗菌活性物质最小抑菌浓度（MIC）检测

参照 NCCLS^[14]测定抗菌活性物质的最小抑菌浓度（minimum inhibitory concentration, MIC），用 0.01% 乙酸和 0.2% BSA 混合液（pH 7.7）连续 2 倍稀释抗菌肽浓度至 512、256、128、64、32、16、8、4、2、1 和 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。96 孔板每孔加 10 μL 稀释后的待检测样品，每孔加 100 μL 重悬在琼脂培养基的 $2\times 10^5\sim 7\times 10^5$ CFU/mL 的指示菌菌液，振荡培养至少 18 h，以抑制细菌肉眼可见生长的最低浓度为 MIC。

1.14 数据统计分析

试验数据使用 Excel 2016 进行整理，用 SPSS 19.0 软件进行 One-Way ANOVA 分析， $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。差异显著时采用 Duncan's 方法对各组间平均数进行多重比较，结果表示为平均值 \pm 标准误。

2 结果与分析

2.1 菌株 CL-1 的筛选

将采集的土壤样品处理涂板后，通过指示菌金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 共培养，发现有明显抑菌圈的菌落（见图 1），该菌落湿润呈圆形，边缘光滑，经分离纯化得到一株目标菌株，命名为 CL-1。

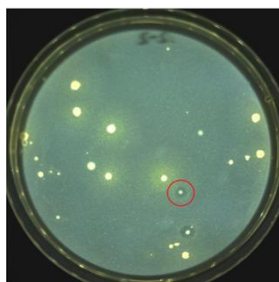


图 1 筛选菌株 CL-1 的 R2A 平板

Fig. 1 The R2A plate for screening strain CL-1

注：红色圆圈中为筛选的目标菌株 CL-1。

Note: The selected target strain CL-1 is marked with red circle.

2.2 菌株 CL-1 发酵液的抗菌活性分析

为进一步探究 CL-1 发酵上清液的抗菌活性，试验测定了其对革兰氏阳性（G+）指示菌、革兰氏阴性（G-）指示菌的抑菌圈（见图 2、表 1）。结果显示 CL-1 发酵液对 5 株金黄色葡萄球菌（ATCC 43300-MRSA、ATCC 25923、ATCC 33591、ATCC 29213、ATCC 6538）、2 株链球菌（ATCC 35666、ATCC 700407）、3 株大肠杆菌（CVCC 1569、ATCC 25922、Polymyxin resistant *E. coli*）、1 株沙门氏菌（CVCC 534）指示菌的抑菌活性强，抑菌圈直径在 20.0~25.0 mm 之间；对产气荚膜梭菌（ATCC 13124）、大肠杆菌（CVCC 2080）、绿脓杆菌（CMCC 10104）也具有较强的抑菌活性，抑菌圈直径 15.0~19.9 mm 之间，而对粪肠球菌（ATCC 51299）的抑菌活性较小，抑菌圈直径在 10.0~14.9 mm 之间。

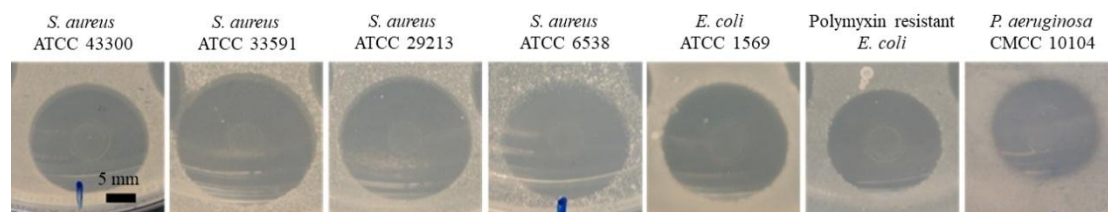


图 2 菌株 CL-1 发酵上清液抑菌圈

Fig. 2 The inhibition zone of fermentation supernatant of strain CL-1

表 1 菌株 CL-1 发酵上清液对各种指示菌的抑菌圈

Table 1 The inhibition zone of fermentation supernatant of strain CL-1 against various indicator bacteria

指示菌株 Indicator bacteria	革兰氏染色 Gram's stain	抑菌圈 Antimicrobial zone
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	G+	+++
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	G+	+++
<i>S. aureus</i> ATCC 33591	G+	+++
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	G+	+++

<i>S. aureus</i> ATCC 6538	G+	+++
<i>S. lactis</i> ATCC 35666	G+	+++
<i>S. mammaris</i> ATCC 700407	G+	+++
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	G+	++
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	G+	+
Polymyxin resistant <i>E. coli</i>	G-	+++
<i>E. coli</i> CVCC 1569	G-	+++
<i>E. coli</i> ATCC 25922	G-	+++
<i>E. coli</i> CVCC 2080	G-	++
<i>S. gallinarum</i> CVCC 534	G-	+++
<i>P. aeruginosa</i> CMCC 10104	G-	++

注：“+”表示抑菌圈直径在 10.0~14.9 mm；“++”表示抑菌圈直径在 15.0~19.9 mm；“+++”抑菌圈直径在 20.0~24.9 mm。

Note: “+” indicated that the diameter of the antimicrobial zone is 10.0~14.9 mm, “++” indicated that the diameter of the antimicrobial zone is 15.0~19.9 mm, “+++” indicated that the diameter of the antimicrobial zone is 20.0~24.9 mm.

2.3 菌株 CL-1 理化鉴定

由表 2 可知，CL-1 对丙三醇、D-阿拉伯糖等 31 种碳源呈现阳性反应，再利用软件 APIweb 分析发现，CL-1 检测结果与数据库中芽孢杆菌数据基本一致，初步判断 CL-1 可能是一株芽孢杆菌。

表 2 菌株 CL-1 的生理生化特性

Table 2 The physiological and biochemical characters of the strain CL-1

序号 No.	编码 Code	检测项目 Test item	结果 Result	序号 No.	编码 Code	检测项目 Test item	结果 Result
0	N	阴性对照 Negative control	-	25	ESC	七叶灵铁柠檬酸盐 Esculin ferric citrate	+
1	GLY	甘油 Glycerol	+	26	SAL	水杨苷 Salicin	+
2	ERY	赤藓糖醇 Erythritol	-	27	CEL	纤维二糖 Cellobiose	+
3	DAR A	D-阿拉伯糖 D-Arabinose	+	28	MAL	D-麦芽糖 D-Maltose	+
4	LAR A	L-阿拉伯糖 L-Arabinose	-	29	LAC	D-乳糖 D-Lactose	+
5	RIB	D-核糖 D-Ribose	+	30	MEL	D-二糖 D-Disaccharide	+
6	DXY L	D-木糖 D-Xylose	+	31	SAC	D-蔗糖 D-Sucrose	+
7	LXY L	L-木糖 L-Xylose	-	32	TRE	D-海藻糖二水合物 D-Trehalose dihydrate	+
8	ADO	D-核糖醇 D-Ribitol	-	33	INU	聚果糖 Synanthrin	-

9	MDX	甲基- β -D-木糖苷 Methyl β -D-xylopyranoside	+	34	MLZ	密蒙花 Melezitose	-
10	GAL	D-半乳糖 D-Galactose	+	35	RAF	D-棉籽糖 D-Raffinose	+
11	GLU	D-葡萄糖 D-Glucose	+	36	AMD	淀粉 Amylum	+
12	FRU	D-果糖 D-Fructose	+	37	GLYG	淀粉 Amylum	+
13	MNE	D-甘露糖 D-Mannose	+	38	XLT	木糖醇 Xylitol	-
14	SBE	L-索布糖 L-Sorbose	-	39	GEN	龙胆二糖 D-Gentiobiose	+
15	RHA	L-鼠李糖 L-Rhamnose	-	40	TUR	D-土伦糖 D-Toulon sugar	+
16	DUL	杜尔糖醇 Dulcitol	-	41	LYX	D-溶菌糖 D-Lyxose	-
17	INO	肌醇 Inositol	+	42	TAG	D-塔格糖 D-Tagatose	-
18	MAN	D-甘露醇 D-Mannitol	+	43	DFUC	D-岩藻糖 D-Fucose	-
19	SOB	山梨糖醇 Sorbitol	+	44	LFUC	L-岩藻糖 L-Fucose	+
20	MDM	甲基- α -D-甘露糖苷 Methyl α -D-mannopyranoside	-	45	DARL	D-阿拉宾醇 D-Arabinito	+
21	MDG	甲基- α -D-甲基葡萄糖苷 Methyl α -D-methylglucoside	+	46	LARL	L-阿拉宾醇 L-Arabinito	-
22	NAG	N-乙酰氨基葡萄糖 N-Acetyl glucosamine	+	47	GNT	葡萄糖酸钾 Potassium gluconate	-
23	AMY	硝基化合物 Nitrilosides	+	48	2KG	2-Keto-potassium gluconate	-
24	ARB	羟基醌 O- β -D-葡萄糖苷 Hydroquinone O- β -D-glucopyranoside	+	49	5KG	5-Keto-potassium gluconate	-

注：“+”表示结果阳性；“-”表示结果阴性。

Note: “+” Positive; “-” Negative.

2.4 菌株 CL-1 的基因组分析

2.4.1 16S rDNA 测定

通过引物 27F/1492R 扩增出菌株 CL-1 的 16S rDNA 长度为 1 354 bp (NMDC <https://nmdc.cn>, 登录号 NMDCN00011E1), 在 NCBI 数据库中进行同源序列比对得出 CL-1 与两株 *Paenibacillus elgii* 菌株 SD17 和 NBRC10025 序列相似程度超过 99%, 利用 MEGA7 软件构建系统发育树 (见图 3), CL-1 与 *P. elgii* NBRC100335 (同 *P. elgii* SD17) 同源关系最近, 同属 *Paenibacillus elgii* 菌株。

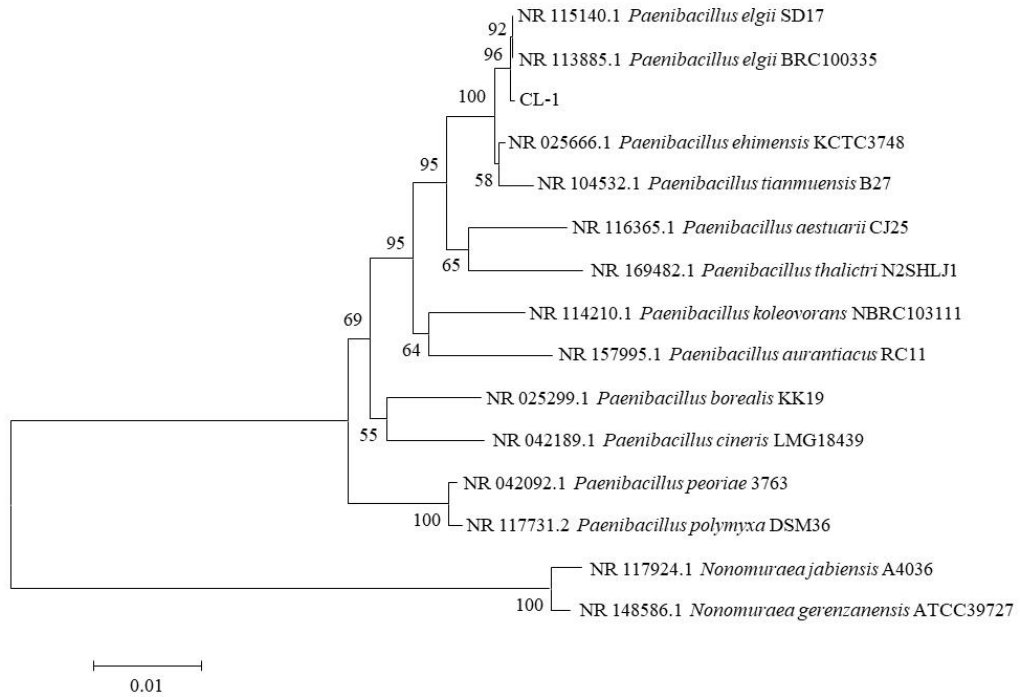


图 3 基于菌株 CL-1 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences

2.4.2 全基因组测序和代谢产物基因簇分析

通过全基因组测序，组装获得 CL-1 基因组的大小为 7.74 Mb，GC 含量为 53.34%（测序深度 330×，组装 0 gap，登录号 NMDCN00011EH）。菌株 CL-1 和类芽孢杆菌 *Paenibacillus elgii* SD17 进行全基因组比对分析，得出 ANI 一致性为 98.23%，超过 96% 的数值界限判断为同一物种，且通过 Non-Redundant Protein Database 蛋白质注释，共注释 6649 个基因，其中 5646 个基因集中于 *Paenibacillus elgii* 种属，占比 84.9%（见图 4），鉴定 CL-1 是一株类芽孢杆菌 *Paenibacillus elgii*。

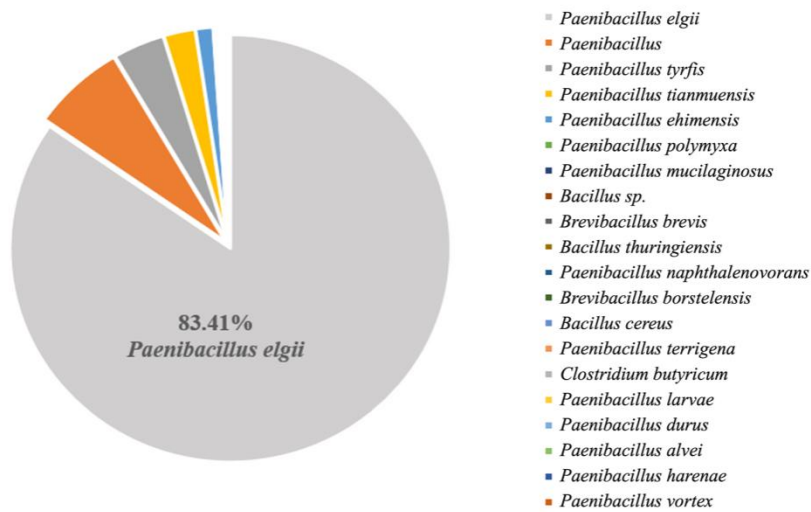


图 4 菌株 CL-1 全基因组测序的 NR 注释分析

Fig. 4 NR annotation analysis of the whole genome sequencing of strain CL-1

基于 CL-1 的抑菌特性，将全基因组用 antiSMASH 6.1.0 进行次级代谢产物分析，发现 CL-1 次级代谢产物丰富，共有 17 个基因簇（表 3），包括 2 个核糖体肽基因簇和 10 个非核糖体肽基因簇，其中存在与 penisin、octapeptin C4 一致性高达 100% 的基因簇，说明 CL-1 具有产生抗菌活性物质的潜力。

表 3 菌株 CL-1 次级代谢产物基因簇预测结果

Table 3 The prediction results of secondary metabolite gene clusters of strain CL-1

基因簇 Cluster	类型 Type	开始 Begin	结束 End	最相似的基因簇/类型 The most similar gene cluster/type	相似度 Similarity
	非核糖体肽合成酶 Non-ribosomal peptide synthetase;				
1	I 型聚酮合酶 Type I Polyketide synthase	396 884	452 812	粘噻唑 Myxothiazol	28%
2	氧化还原辅因子 Redox-cofactor	534 223	556 281	兰卡杀菌素 CLankacidin C	13%
3	萜烯 Terpene	800 627	822 537	—	
4	非核糖体肽合成酶 Non-ribosomal peptide synthetase;	1 741 491	1 838 190	派尼生素 Penisin	100%
5	I 类羊毛硫肽 Lanthipeptide-Class-I 非核糖体肽合成酶	2 012 623	2 059 037	—	

	Non-ribosomal peptide synthetase				
6	环状内酯自动诱导子 Cyclic-lactone-autoinducer	2 384 397	2 404 225	—	
7	非核糖体肽合成酶 Non-ribosomal peptide synthetase	2 665 990	2 725 696	镰刀菌素 B Fusaricidin B	25%
8	非核糖体肽合成酶 Non-ribosomal peptide synthetase	2 870 659	2 936 124	镰刀菌素 B Fusaricidin B	75%
9	非核糖体肽合成酶 Non-ribosomal peptide synthetase	3 800 918	3 853 350	—	
10	非核糖体肽合成酶 I 型聚酮合酶 Type I Polyketide synthase	3 924 779	4 068 967	类杆菌素 Paenibacterin	60%
11	非核糖体肽合成酶 反式乙酰转移酶聚酮合酶 Trans-AT Polyketide synthase	4 110 223	4 211 079	类芽孢杆菌脂肽 Paenilipoheptin	7%
12	含线性唑肽 LAP; 硫肽 Thiopeptide; 类核糖体合成和翻译后修饰肽 Ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide like	4 395 593	4 440 148	卡奇霉素 Calicheamicin	2%
13	非核糖体肽合成酶 Non-ribosomal peptide synthetase	4 781 826	4 854 496	八肽素 C4 Octapeptin C4	100%
14	磷酸酯 Phosphonate	5 604 229	5 645 128	去乙酰胺 Desotamide	9%
15	环状内酯自动诱导子 Cyclic-Lactone-Autoinducer	5 992 110	6 012 631	—	
16	非核糖体肽合成酶 Non-ribosomal peptide synthetase	6 147 639	6 208 475	枯草杆菌素 Bacillibactin	53%
17	类核糖体合成和翻译后修饰肽 Ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide like	7 048 199	7 059 848	—	

注：“-”表明 CL-1 可能产生次级代谢产物，但是 antiSMASH 数据库中无类似基因簇。

Note: “-” indicates secondary metabolites may have been produced by the CL-1, but there are no similar gene clusters in the antiSMASH database.

2.5 CL-1 抗菌物质稳定性分析

为研究 CL-1 代谢产物中的抗菌物质经不同处理后的抑菌活性稳定性，试验检测了 CL-1 发酵上清液经处理后的抑菌圈（见表 4）。结果表明，CL-1 发酵上清液中抗菌物质耐受过氧化氢酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K 和胃蛋白酶，且 pH 调整为 7.3 时抑菌活性几乎不受影响，

说明 CL-1 发酵上清液中抗菌物质非过氧化氢类和非有机酸碱类物质。但是 80 °C 高温处理显著降低抑菌圈直径，说明高温会影响 CL-1 代谢产物的抗菌性能。

表 4 菌株 CL-1 发酵上清液经不同处理后的抑菌活性

Table 4 Antibacterial activity of the fermentation supernatant of CL-1 after different treatments

项目 Project	抑菌圈 Antimicrobial zone (mm)	
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 25922
	发酵液 Fermentation broth	16.8±1.4 ^b
pH 7.3	16.6±1.4 ^b	12.8±0.3 ^{ab}
pH 2	16.8±1.4 ^b	13.3±0.8 ^b
80 °C	12.7±1.3 ^a	11.5±1.3 ^a
胃蛋白酶 Pepsin	16.0±1.0 ^b	12.9±0.1 ^{ab}
胰蛋白酶 Trypsin	16.2±0.6 ^b	13.0±0.0 ^{ab}
蛋白酶 K Protease K	15.7±0.3 ^b	12.3±0.6 ^{ab}
过氧化氢酶 Catalase	16.2±0.8 ^b	12.3±0.6 ^{ab}

注：同一列有相同字母表示差异不显著。

Note: The same letter in the same column indicates no significant difference.

2.6 抗菌活性物质结构鉴定

获得的三个抗菌活性物质经高分辨质谱分析，结果如图 5 所示。其中，图 5A 为 PA1 一级高分辨质谱图，质荷比 (m/z) 1 119.713 2 和 560.360 5 信号峰对应 PA1 带一个和两个电荷的分子离子峰，可推断 PA1 的分子量为 1 118.713 1，推测其分子式为： $C_{54}H_{94}O_{12}N_{13}$ 。图 5B 为 PA2 的一级高分辨质谱图， m/z 为 1 087.685 3、544.346 5 和 363.233 3 信号峰对应 PA2 带一个、两个和三个电荷的分子离子峰，可推断 PA2 的分子量为 1 086.685 3，其分子式有待进一步确认。图 5C 为 PA3 的一级高分辨质谱图， m/z 为 1 101.700 5，551.354 0 和 367.905 3 信号峰对应 PA3 带一个、两个和三个电荷的分子离子峰，可推断 PA3 的分子量为 1 100.700 5，推测其分子式为： $C_{54}H_{92}O_{11}N_{13}$ 。

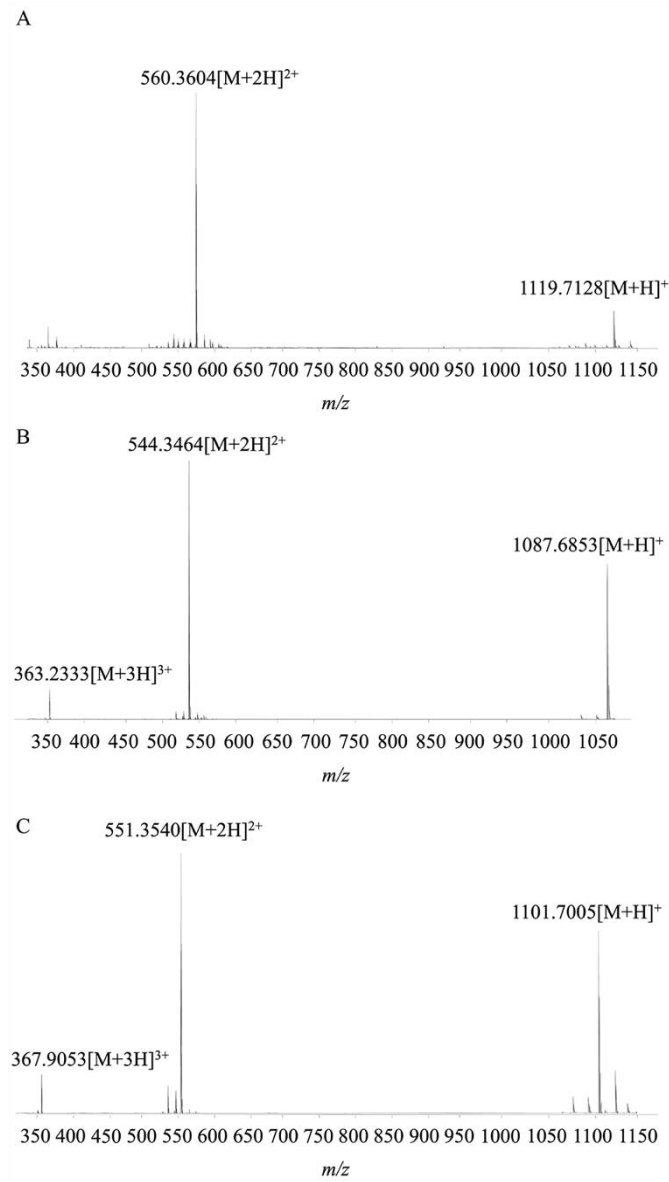


图 5 抗菌活性物质 PA1 (A)、PA2 (B) 和 PA3 (C) 在高分辨质谱图

Fig. 5 Mass spectra of the antibacterial substances PA1 (A), PA2 (B), and PA3 (C) in high-resolution mass spectrometry

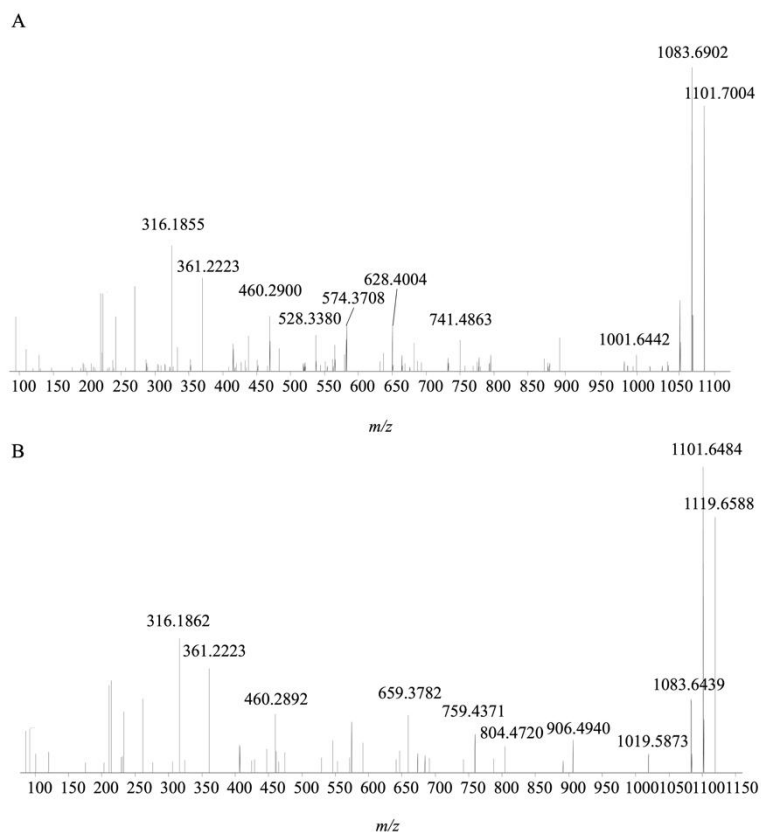


图 6 抗菌活性物质 PA3 (A) 和 PA1 (B) 二级质谱图

Fig. 6 MS² spectrum of antimicrobial active substances PA3 (A) and PA1 (B)

ESI 质谱法利用碰撞诱导解离技术 (collision-induced dissociation, CID), 通过获得的离子碎片值和理论计算获得的相应碎片值进行比对, 来推定化合物的分子结构。试验中选择 PA1 和 PA3 分子离子峰为母离子峰进入质谱仪碰撞室, 经 CID 法碎裂后获得 MS² 质谱图, 如图 6 所示。检测到一系列离子峰 (见图 6A): m/z 1001.70→741.49→628.40→574.37→528.34→460.29→361.19。通过高分辨质谱检测 PA3 获得的分子离子峰和碎片离子峰信息与 Wu 等^[15]报道的研究结果一致, 可推断 PA3 为 plgipeptin B, 化学结构式如图 7A 所示。在图 6B 中, m/z 在 100~600 范围内时, PA1 和 PA3 有多个相同碎片离子峰, 即 574.37→460.29→361.19→316.19。而 m/z 在 600~1200 范围内, PA3 的碎片离子峰 m/z 值加一水分子, 即可得 PA1 中碎片离子峰的 m/z 值为 1119.66→1101.65→1083.64→1019.59→906.49→804.47→759.44→659.38。由此, 可推测 PA1 为 PA3 水解开环后的化合物, 化学结构式见图 7B 所示。

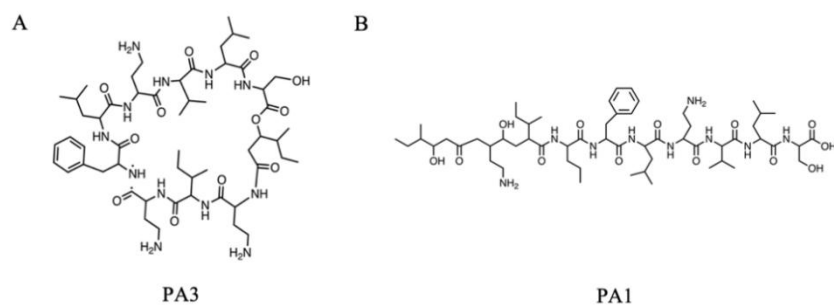


图 7 抗菌活性物质 PA3 (A) 和 PA1 (B) 的化学结构式

Fig. 7 Structural formula of antimicrobial active substances PA3 (A) and PA1 (B)

2.7 CL-1 抗菌物质的分离和抗菌活性检测

利用高效液相色谱分离纯化 CL-1 发酵产物，得到三种抗菌物质纯品，分别命名为 PA1、PA2、PA3，并对其抗菌活性进行了分析。结果显示，PA3 对革兰氏阳性和阴性指示菌均具有较强的抑菌活性，MIC 值在 1~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内；PA2 也具有很强的抑菌活性，MIC 值在 1~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内，对于多数革兰氏阳性菌的 MIC 值要高于 PA3，而对于多数革兰氏阴性菌的 MIC 值要低于 PA3（见表 5）。PA1 仅对于 *Salmonella gallinarum* CVCC 534、*Salmonella typhimurium* 具有较强的抑菌作用，而对于其他的革兰氏阳性菌（G+）和革兰氏阴性菌（G-）的抑菌活性要低于 PA2 和 PA3。

表 5 菌株 CL-1 发酵产物中抗菌物质的 MIC 值

Table 5 The MIC of antimicrobial substances in the fermentation products of strain CL-1

指示菌株 Indicator bacteria	革兰氏染色 Gram staining	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				
		PA1	PA2	PA3	万古霉素 Vancomycin	多粘菌素 Colistin
<i>S. aureus</i> CMCC 26003	G+	16	1	1	1	>256
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	G+	128	16	8	1	>256
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	G+	128	16	8	1	>256
<i>S. aureus</i> ATCC 33591	G+	128	8	4	1	>256
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	G+	128	32	8	1	>256
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	G+	64	8	4	1	>256
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	G+	16	2	2	1	256
<i>E. coli</i> CVCC 1518	G-	16	4	2	256	2
<i>E. coli</i> CVCC 1557	G-	8	2	4	256	2
<i>E. coli</i> CVCC 1569	G-	16	1	2	256	2
<i>E. coli</i> ATCC 25922	G-	16	2	2	256	2
<i>S. gallinarum</i> CVCC 534	G-	1	1	2	128	1
<i>S. typhimurium</i>	G-	4	2	4	128	1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	G-	16	2	4	>256	2
<i>S. dysenteriae</i> ATCC 11835	G-	16	2	2	128	1
<i>S. flexneri</i> ATCC 12022	G-	64	8	4	128	1

3 讨论与结论

现在全球抗生素耐药性不断加剧, 可利用的抗菌药物越来越少, 人类或许面临无药可用的状况, 因此挖掘新型抗菌药物对人类健康具有重要意义。微生物是传统抗生素发现和开发的主要来源, 包括放线菌、细菌和真菌等^[16]。传统观点认为自然界微生物只有 1% 可被培养出来^[17], 但是随着科技发展, 这一观点受到质疑。研究发现, 通过 Ichip (isolation chip) 微生物培养方法, 能够从培养的微生物中分离出得到新抗生素 clovibactin^[18]和 tixobactin^[19]。因此, 通过培养筛选微生物, 对于挖掘和开发新型抗菌药物仍是当前主要研究方法。

类芽孢杆菌是从芽孢杆菌分离出的一个新菌属, 具有与芽孢杆菌相似的生物学特性, 都能产生孢子和丰富的次级代谢产物。到目前为止, 类芽孢杆菌可以产生多种抗菌化合物, 对各种细菌和真菌具有广泛的抑制谱。这些抗菌物质主要包括多粘菌素、jollipeptin、gavaserin、saltavalin、fusaricidins A~D 和 gatavalin^[5]。研究发现, 在寡营养的培养条件下, 菌株对营养以及空间的争夺有利于抗菌物质的产生^[20], 便于目标菌株的筛选。本研究采用寡营养共培养的方式筛选到一株类芽孢杆菌, 其发酵上清液具有广谱的抑菌性能。自 2004 年首次发现 *Paenibacillus elgii* 以来, 关于 *Paenibacillus elgii* 的研究并不多, 现有的研究表明 *Paenibacillus elgii* 能够产生 pelgipeptin^[21]和 tridecaptin^[22]等抗菌活性物质。pelgipeptin 具有抗 MRSA、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 和亚麻炭疽菌 (*Colletotrichum lini*) 活性^[21], tridecaptin 具有抗大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的活性^[22]。与 *Paenibacillus elgii* CL-1 同源性较近的 *Paenibacillus elgii* SD-17 具有抑制枯草芽孢杆菌、葡萄伯克氏菌、大肠杆菌、多粘芽孢杆菌、荧光假单胞菌、米黄色单胞菌和水疱黄色单胞菌和真菌的活性^[23], *Paenibacillus elgii* CL-1 对细菌广谱抗菌活性与 SD-17 相似, 而 *Paenibacillus elgii* SD-17 的抑菌活性可能是其能够表达 permetin A。

本研究通过对类芽孢杆菌 *Paenibacillus elgii* CL-1 发酵液抗菌活性物质耐受性检测发现, CL-1 发酵液中抗菌活性物质不是过氧化氢、有机酸或有机碱。为了进一步确定 *Paenibacillus elgii* CL-1 产生的抗菌活性物质及其生物学特性, 本研究利用高效液相色谱分离纯化获得 3 种抗菌物质纯品, 其中物质 PA2 和 PA3 抗菌谱广, 抗菌活性较强, MIC 值可达 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。本研究发现的物质 PA2 和 PA3 与在 *Paenibacillus elgii* 中已发现的抗菌物质 pelgipeptin 和 tridecaptin 的其抗菌谱和抗菌活性相似^[21,22]。但是 tridecaptin 是不可分泌物质^[22], 因此 *Paenibacillus elgii* CL-1 表达的物质 PA2 和 PA3 不是 tridecaptin。antiSMASH 分析

也发现 *Paenibacillus elgii* CL-1 有 17 个次级代谢产物基因簇, 包括与 penisin 和 octapeptin C4 一致性高达 100% 的基因簇, 但没有 pelgipeptin 和 tridecaptin 的基因簇。penisin 和 octapeptin 都具有广谱抑菌性能, 且抗菌活性与本研究发现的物质 PA2 和 PA3 相似^[24,25]。然而, 目前尚无 *Paenibacillus elgii* 表达 penisin 和 octapeptin 的相关报道。为进一步确定 *Paenibacillus elgii* CL-1 分离纯化的 3 种抗菌物质, 本研究通过质谱分析发现物质 3 是 pelgipeptin B^[15], 物质 1 是 pelgipeptin B 水解开环后的化合物。物质 2 尚不确定是什么化合物。因此本研究筛选的 *Paenibacillus elgii* CL-1 是一种具有开发天然抗菌药物 pelgipeptin B 的潜力菌株。

综上所述, 本研究培养筛选到一株可产抗菌活性物质的类芽孢杆菌 *Paenibacillus elgii* CL-1, 该菌抗菌产物抗菌谱广、耐受性好和抗菌活性强, 有良好的应用前景, 为挖掘天然抗菌药物 pelgipeptin B 奠定基础。虽然本研究对 *Paenibacillus elgii* CL-1 的抗菌物质进行了初步研究, 但是仍需通过基因编辑或发酵工艺优化, 提高 pelgipeptin B 的表达水平, 这将更好地促进 pelgipeptin B 研发和应用。

参考文献

- 1 Lewis K. Antibiotics: recover the lost art of drug discovery[J]. Nature, 2012, 485: 439-440.
- 2 Cochrane SA, Vederas JC. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates[J]. Med Res Rev, 2014; 36: 31.
- 3 Li YX, Zheng Z, Zhang WP, et al. Discovery of cationic nonribosomal peptides as Gram-negative antibiotics through global genome mining[J]. Nat Commun, 2018, 9: 3273.
- 4 Wei XY, Liu X, Yu H W, et al. Advances in biosynthetic gene cluster mining and biosynthesis of microbial non-ribosomal peptides[J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2021, 46: 353-361.
- 5 Grady EN, Macdonald J, Liu L, et al. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review[J]. Microb Cell Fact, 2016, 15: 203.
- 6 Liu YJ, Han J, Wu J, et al. Purification and characterization of antimicrobial components produced by *Paenibacillus* sp. strain BD3526[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2015, 27: 1176-1180.
- 7 Huang E, Yousef AE. Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with N-terminal acetylation, by *Paenibacillus polymyxa*[J]. Microbiol Res, 2015, 181: 15-21.
- 8 Huang E, Guo YG, Yousef AE. Draft genome sequence of *Paenibacillus* sp. strain OSY-SE, a bacterium producing the novel broad-spectrum lipopeptide antibiotic paenibacterin[J]. J Bacteriol, 2012, 194: 6306.
- 9 Kajimura Y, Kaneda M, Fusaricidin A. A new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8

- taxonomy,fermentation,isolation,structure elucidation and biological activity[J].J Antibiot,1996,49:129-35.
- 10 Barry GH.Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA[J].Mol Biol Evol,2013,30:1229-1235.
- 11 Xu LH,Li WJ,Liu ZH,et al.Actinobacterial Systematics:Principles,Methods,and Practices(放线菌系统学)[M].Beijing:Science Press,2007.
- 12 Lee I,Ouk KY,Park SC,et al.OrthoANI:An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity[J].Int J Syst Evol Microbiol,2016,66:1100-1103.
- 13 Blin K,Shaw S, Kloosterman AM,et al.ANTISMASH 6.0:improving cluster detection and comparison capabilities[J].Nucleic Acids Res,2021,49:W29-W35.
- 14 Wayne P.National committee for clinical laboratory standards[J].Perform Stand Antimicrob Disc Susceptibility Test,2002,12:1-53.
- 15 Wu XC,Shen XB,Ding R,et al.Isolation and partial characterization of antibiotics produced by *Paenibacillus elgii* B69[J].FEMS Microbiol Lett,2010,310:32-38.
- 16 Hutchings MI,Truman AW,Wilkinson B.Antibiotics:past,present and future[J].Curr Opin Microbiol,2019,51:72-80.
- 17 Martiny AC.High proportions of bacteria are culturable across major biomes[J].ISME J,2019,13(8):2125-2128.
- 18 Shukla R,Peoples AJ,Ludwig KC,et al.An antibiotic from an uncultured bacterium binds to an immutable target[J].Cell,2023,186:4059-4073.
- 19 Ling LL,Schneider T,Peoples AJ,et al.A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance[J].Nature,2015,517:455-459.
- 20 Marmann A,Aly AH,Lin WH,et al.Co-cultivation—a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms[J].Mar Drugs,2014,12:1043-1065.
- 21 Kim J,Kim PI,Bong KM,et al.Isolation and structural elucidation of pelgipeptin E,a novel pore-forming pelgipeptin analog from *Paenibacillus elgii* with low hemolytic activity[J].J Antibiot(Tokyo),2018,71:1008-1017.
- 22 da Costa RA,Andrade IEPC,Pinto OHB,et al.A novel family of non-secreted tridecaptin lipopeptide produced by *Paenibacillus elgii*[J].Amino Acids,2022,54:1477-1489.
- 23 Kim DS,Bae CY,Jeon JJ,et al.*Paenibacillus elgii* sp. nov.,with broad antimicrobial activity[J].Int J Syst Evol Microbiol,2004,54:2031-2035.
- 24 Kato T,Shoji J.The amino acid sequence of octapeptin C1(333-25) studies on antibiotics from the genus

Bacillus[J].XIX.J Antibiot,1976,29:1339-1340.

25 Meyers E,Parker WL,Brown WE.A nomenclature proposal for the octapeptin antibiotics[J].J Antibiot,1976,29:1241-1242.

收稿日期: 2024-03-21 接受日期:

基金项目: 重庆技术创新与应用发展专项 (cstc2021jscx-dxwtBX0005); 重庆英才计划“包干制”项目 (21201)

*通信作者 Tel: 15223242910 ; E-mail: qirenli1982@163.com