

研究报告



一株类芽孢杆菌的分离鉴定及其抗革兰氏阴性菌活性测定

陈上 赵瑞 丁双阳 朱奎*

中国农业大学动物医学院 国家兽药安全评价中心 北京 100193

摘要:【背景】随着碳青霉烯类和多粘菌素类可转移耐药基因的发现及扩散,多重耐药革兰氏阴性细菌感染更加难以治疗。【目的】筛选有效拮抗革兰氏阴性菌的菌株,为新型抗生素的发掘奠定基础。

【方法】利用胰蛋白胨大豆琼脂培养基筛选土壤源细菌,通过16S rRNA基因序列鉴定其种属;通过全基因组测序,antiSMASH比对分析菌株产抗生素潜能,双层琼脂平板法验证其抗菌活性;通过甲醇萃取其次级代谢产物,高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)进行次级代谢产物分析。【结果】从北京周边土壤样品中分离到一株类芽孢杆菌 CAU136 (*Paenibacillus pabuli* CAU136),经过生物信息学分析和 antiSMASH 比对,表明该菌株有较强合成次级代谢产物的潜能,双层琼脂平板法验证其能抑制多株革兰氏阴性菌生长,HPLC-MS/MS 检测结果显示其可能分泌多粘菌素 E。【结论】类芽孢杆菌 CAU136 可能分泌多粘菌素 E,能有效拮抗革兰氏阴性菌。

关键词: 类芽孢杆菌, 抗菌活性, 多粘菌素 E

Characterization of *Paenibacillus pabuli* and its antibacterial activity against Gram-negative bacteria

CHEN Shang ZHAO Rui DING Shuang-Yang ZHU Kui*

National Center for Veterinary Drug Safety Evaluation, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: [Background] The emergence and dissemination of new mobile antibiotic resistance genes such as *ndm* and *mcr*, poses a great threat to the treatment of infections associated with multi-drug resistant Gram-negative bacterial pathogens. [Objective] To screen new antibiotics, bacterial candidates were isolated and characterized against Gram-negative bacteria. [Methods] First, bacterial strains were isolated from soils using tryptic soy agar (TSA), and identified by 16S rRNA gene sequencing. Then, bioinformatics analysis was performed based on the whole genome. Meanwhile, the secondary metabolites of the candidate strains were predicted by antiSMASH and antibacterial activity was confirmed by the double layer agar plate assay. Finally, the crude was extracted in methanol and identified using HPLC-MS/MS. [Results] *Paenibacillus pabuli* CAU136 was isolated from the soil in Beijing, China. The

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFC1600305, 2018YFD0500500); National Natural Science Foundation of China (31772796); Fund of Beijing Innovation Team of Dairy Industry (BAIC06-2019)

*Corresponding author: Tel: 86-10-62733695; E-mail: zhukcau@gmail.com

Received: 16-10-2018; Accepted: 07-05-2019; Published online: 17-05-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1600305, 2018YFD0500500); 国家自然科学基金(31772796); 北京市奶牛生产业创新团队项目(BAIC06-2019)

*通信作者: Tel: 010-62733695; E-mail: zhukcau@gmail.com

收稿日期: 2018-10-16; 接受日期: 2019-05-07; 网络首发日期: 2019-05-17

whole genome sequence and antiSMASH analysis showed the great potential of *P. pabuli* CAU136 to produce secondary metabolites against bacteria. *P. pabuli* CAU136 showed antibacterial activity against different Gram-negative bacterial strains using the double layer agar plate method. Colistin in the crude extracts of *P. pabuli* CAU136 was demonstrated based on HPLC-MS/MS analysis. [Conclusion] *P. pabuli* CAU136 may produce colistin against diverse Gram-negative bacterial strains.

Keywords: *Paenibacillus pabuli*, Antibacterial activity, Colistin

自抗菌药物广泛应用后, 细菌耐药性问题就一直困扰着人类健康。随着临床批准使用的新型抗生素逐年减少, 多重耐药细菌感染已经变得越来越难以治疗, 人类即将面临无药可用的窘态^[1]。多粘菌素(Polymyxin 或 Colistin)作为多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)中分泌的一种脂肽类抗生素, 对革兰氏阴性菌具有良好的杀菌作用, 被广泛应用于治疗多重耐药革兰氏阴性菌的感染。特别是自 2009 年以来, 新德里金属 β -内酰胺酶(New Delhi metallo- β -lactamase 1, NDM-1)在印度被首次发现后^[2], 多粘菌素一度被认为是抗多重耐药革兰氏阴性病原菌的“最后一道防线”。尽管如此, 随着多粘菌素的大量使用, 细菌对多粘菌素的耐药性也相应得到迅速扩散。根据 Liu 等^[3]报道, 在中国首次分离出携带质粒介导多粘菌素耐药基因 *mcr-1* 的细菌。这意味着“最后一道防线”有可能被攻破, 所以寻找新型抗生素迫在眉睫。

类芽孢杆菌是一种广泛存在于土壤中的细菌, 因其次级代谢产物丰富, 可产生多种抗菌活性物质, 能有效拮抗多种病原菌, 所以常被用作生防菌^[4]。在类芽孢杆菌产生的多种抗菌活性物质中, 脂肽类抗生素因为能有效拮抗多重耐药革兰氏阴性菌而备受关注^[5]。脂肽类抗生素通常是由非核糖体肽合成酶(Nonribosomal peptide synthetases, NRPSs)合成的一类肽类衍生物, 具有抗菌谱广、抗菌活性强、抗菌机制独特、结构稳定、多样性丰富、难以产生耐药性等优点, 是一类具有广阔前景的新型抗生素, 为解决目前日益严重的细菌耐药问题提供了一个新思路。

本研究从北京周边土壤中分离筛选出一株类

芽孢杆菌, 根据全基因组测序分析其可能产生的抗生素类型, 通过双层琼脂平板法验证其抗菌能力, 利用 HPLC-MS/MS 进行次级代谢产物分析, 为筛选产新型抗生素细菌奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抑菌活性菌株和指示菌

抑菌活性菌株类芽孢杆菌 CAU136 分离自北京市延庆区的土壤样本中。供试指示菌标准菌株金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213)及大肠杆菌 ATCC 25922 (*Escherichia coli* ATCC 25922)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心, 其余大肠杆菌均由本实验室分离。肺炎克雷伯菌 CRKP-1 (*Klebsiella pneumonia* CRKP-1)由浙医二院张嵘主任技师惠赠。绿脓杆菌 PA14 (*Pseudomonas aeruginosa* PA14)由美国杜克大学 Lingchong You 教授惠赠。供试各菌株特征如表 1 所示。

表 1 双层琼脂平板法所用指示菌

Table 1 Indicator bacteria for double layer agar plate

菌株名称 Strains name	菌株信息 Information
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Standard strain
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Standard strain
<i>E. coli</i> L14	ESBL+MCR-1
<i>E. coli</i> B2	NDM-5+MCR-1
<i>E. coli</i> F9	ESBL+MCR-1
<i>E. coli</i> 30CZ20EE	FLO ^R +MCR-1
<i>K. pneumonia</i> CRKP-1	KPC-2
<i>P. aeruginosa</i> PA14	

注: FLO^R: 氟喹诺酮类耐药。

Note: FLO^R: Fluoroquinolone resistance.

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; EASYspin Plus 细菌 RNA 快速提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司; PrimeScript 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; 甲醇为色谱纯, 购自 Fisher chemical 公司。高效液相色谱串联质谱仪购自岛津公司。TSB、TSA 培养基购自北京路桥技术股份有限公司; 半固体培养基为 TSB 培养基加上 0.75% 细菌琼脂粉, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

1.2 细菌的分离

称取土壤样品 10 g, 放入盛有 90 mL PBS 的锥形瓶中, 振荡约 20 min。取土壤悬浮液 1 mL 10 倍比稀释至 10^{-6} , 分别取稀释至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的土壤悬浮液 200 μ L, 用 L 型棒均匀地涂于 TSA 琼脂平板上, 每个浓度梯度做 3 个重复, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。从平板上挑取不同培养性状的单菌落, 分别纯化得到单克隆, 将其依次编号以做进一步研究。

1.3 16S rRNA 基因序列分析

将待测菌株接种于 TSB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜, 10 000 r/min 离心 1 min 收集菌体。使用试剂盒提取所分离菌株的全基因组, 以其为模板进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增, 扩增引物为细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTT GTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times PCR Taq MasterMix 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, DNA 模板 1 μ L, 双蒸水补足至 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。所得 PCR 产物委托北京博迈德基因技术有限公司测序。所得基因序列在 NCBI 上进行序列相似性比对分析, 再利用 MEGA 7.0 构建邻接(Neighbor-Joining)法系统发育进化树。

1.4 全基因组文库构建及 antiSMASH 次级代谢产物基因预测

提取类芽孢杆菌 CAU136 的全基因组后, 通过

Covaris system 超声破碎仪(Covaris M220)将目标基因组进行破碎(目标片段大小约 300 bp), 使用 KAPA Hyper Prep Kit 建库试剂盒进行全基因组文库构建。构建的文库通过安捷伦 2100 进行质检后, 委托安诺优达基因科技(北京)有限公司 Illumina HiSeq X Ten System 进行测序, 测序数据量要求 1 Gb 以上。测序后 Cleaned reads 经由 CLC genomics workbench 9 进行序列拼接, De Novo Assembly 参数为默认。拼接后 CAU136 全基因组提交至 antiSMASH^[6] (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>)进行次级代谢产物基因预测。

1.5 RT-PCR 验证多粘菌素生物合成基因簇转录产物

将 CAU136 接种于 TSB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 48 h 后, 使用试剂盒提取 CAU136 的 RNA, 并将细菌 RNA 反转录为 cDNA 后, 设计引物进行多粘菌素生物合成基因的 PCR 扩增, 扩增体系及扩增条件与 1.3 一致。引物为 pmxE-F (5'-TC GTGCCTCCGTTATACAGC-3') 和 pmxE-R (5'-TCT GGCCTTCAGCGAACAAT-3'), 目的条带为 1 330 bp。16S rRNA 基因作为阳性对照, 以不加逆转录酶处理的样品作为阴性对照。

1.6 抑菌活性的测定

采用双层琼脂平板法对 *Paenibacillus pabuli* CAU136 进行抑菌活性的测定。取 5 μ L 培养过夜的 *P. pabuli* CAU136 培养液(约 10^7 CFU)于 TSA 平板中央, 使之形成一个直径为 0.5 cm 的接种点, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 24 h 后, 取高压灭菌后冷却至约 55 $^{\circ}$ C 的半固体培养基, 分别加入指示菌的菌悬液至指示菌浓度约为 10^6 CFU/mL (调整菌液浓度至 0.5 个麦氏比浊度后, 再稀释 100 倍), 摇匀, 将其缓慢覆盖在接种好待测菌的平板上, 晾干, 倒置 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后, 观察抑菌圈的大小, 用含有 10 μ g Colistin 的滤纸片作为阳性对照。

1.7 次级代谢产物的提取

将活性菌株 CAU136 接种于 TSB 肉汤中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜后均匀涂布于 TSA 固体

培养基中, 37 °C 恒温培养箱中培养 3 d 后将平板上的细菌菌落收集到 1 mL 甲醇中, 置于 80 °C 水浴中至甲醇完全挥发后, 加入 0.5 mL 甲醇复溶剧烈涡旋, 13 000 r/min 离心 3 min 后收集上清液, 40 °C 下 N₂ 吹干浓缩后, 用 0.5 mL 的甲醇复溶, 得到次级代谢产物的粗提物。将粗提物 14 000 r/min 离心 20 min 后, 用 0.22 μm 广泛滤器过滤溶液, 于进样瓶中等待进样。

1.8 HPLC-MS/MS 方法

色谱条件: 色谱柱为 Shim-pack GIST-Hp C18 (3 μm, 2.1 mm×50 mm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸乙腈, 流动相 B 为 0.5% 甲酸水; 流速为 0.3 mL/min; 进样量为 5 μL; 柱温为 40 °C; 时间程序为: 0.0–0.5 min, 5% 流动相 A; 0.5–1.0 min, 流动相 A 由 5% 线性变换至 20%; 1.0–2.5 min, 20% 流动相 A; 2.5–3.0 min, 流动相 A 由 20% 线性变换至 90%; 3–4 min, 90% 流动相 A; 4–5 min 流动相 A 由 90% 线性变换至 5%; 5–8 min, 5% 流动相 A。

质谱条件为: 离子源: 电喷雾离子源, 正离子模式; 检测方式: 多反应监测; 电喷雾电压(IS): 4 500 V;

离子源温度: 550 °C; 雾化气: 氮气 3.0 L/min; 干燥气: 氮气 10 L/min; 碰撞气: 氩气; DL 温度: 250 °C; 加热模块温度: 400 °C。其他质谱参数见表 2。

2 结果与分析

2.1 类芽孢杆菌的分离鉴定

从 5 份采自北京市延庆区的土壤中分离得到 26 株细菌, 通过 DNA 提取、PCR 扩增和测序得到的 16S rRNA 基因提交至 NCBI 进行 BLAST 比对后, 鉴定得到一株类芽孢杆菌属细菌, 与 *Paenibacillus pabuli* 16S rRNA 基因序列相似度高达 99%。从 GenBank 中调取其他 17 株标准菌株的 16S rRNA 基因序列构建系统发育进化树, 结果如图 1 所示,

表 2 多粘菌素 E 的特征离子对和碰撞能量

Table 2 Characteristic fragment ions and collision energy of colistin

化合物	特征离子对	碰撞能量
Analyte	Characteristic ions pair (<i>m/z</i>)	Collision energy (V)
Colistin A	391.10>384.70*, 391.10>101.40	-10.00, -20.00
Colistin B	386.30>380.20*, 386.30>101.50	-14.00, -20.00

注: *: 定量离子。

Note: *: Quantitative ion.

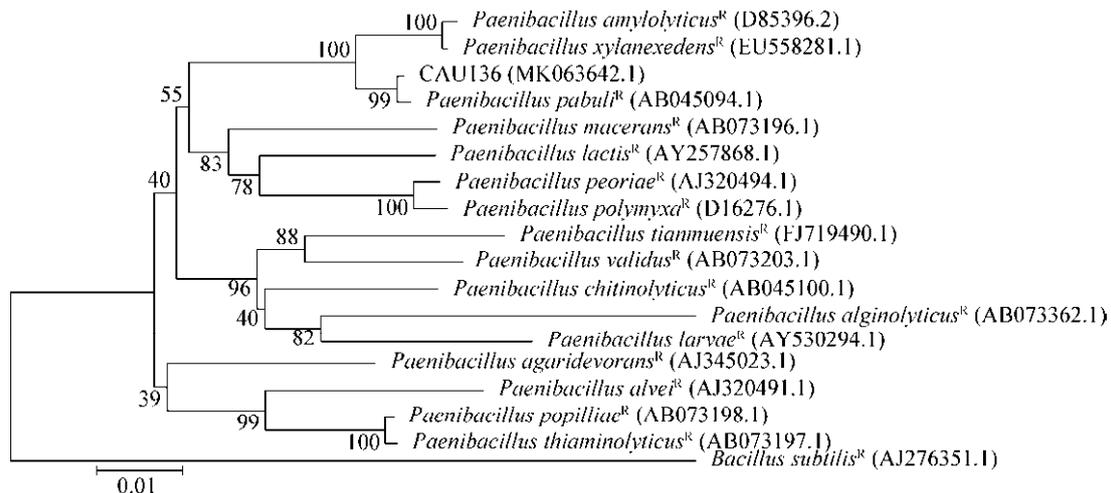


图 1 基于 16S rRNA 基因序列相似性构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of strain CAU136 and its related bacteria based on 16S rRNA gene sequence

注: ^R: 模式菌株; 括号内的序号表示相应序列在 GenBank 的登录号; 分支点上的数字是基于邻接法 1 000 次重复取样数据集的 Bootstrap 支持率; 比例尺 0.01 表示 100 个核苷酸中有 1 个被替换。

Note: ^R: The reference strains; Numbers in the parentheses indicated GenBank accession number of the sequences; The values on the branches were Bootstrap support rates based on the neighbor-joining method by 1 000 repeated sampling; The scale bar 0.01 represented one out of 1 000 nucleotides was replaced.

CAU136 与 *Paenibacillus pabuli* 同源关系最近, 因此命名为 *Paenibacillus pabuli* CAU136。

2.2 全基因组文库构建及 antiSMASH 比对结果

P. pabuli CAU136 通过全基因组文库构建, 二代测序组装后得到含有 47 个 Contig 的全基因组。

将全基因组提交至 antiSMASH 进行次级代谢产物预测。如表 3 所示, 结果显示 *P. pabuli* CAU136 具有较强的次级代谢产物合成潜能, 且含有 Polymyxin 等生物合成基因簇 (Biosynthesis gene clusters, BGC), 可能产生有效的抗菌活性物质。

表 3 类芽孢杆菌 CAU136 次级代谢产物预测结果

Table 3 The secondary metabolite of *Paenibacillus pabuli* CAU136 predicted by antiSMASH

基因簇 Clusters	次级代谢产物类型 Type of secondary metabolite	起始位点 Start site	终止位点 Termination site	相似基因簇 Most similar known cluster	相似度 Similarity (%)
CAU136_Contig_1					
Cluster 1	Other	345 227	388 934	—	—
Cluster 2	Lasso peptide	657 024	680 990	Paeninodin	60
CAU136_Contig_3					
Cluster 3	T3PKS	26 031	67 188	—	—
Cluster 4	T3PKS	304 275	345 432	—	—
CAU136_Contig_4					
Cluster 5	Bacteriocin-Lantipeptide-NRPS	67 599	151 797	Bacillibactin	53
CAU136_Contig_5					
Cluster 6	Terpene	269 930	290 802	Carotenoid	33
CAU136_Contig_6					
Cluster 7	NRPS	109 344	231 019	Lomaiviticin	3
Cluster 8	TransatPKS-NRPS	319 230	394 021	—	—
CAU136_Contig_7					
Cluster 9	Siderophore	92 778	110 418	—	—
CAU136_Contig_9					
Cluster 10	NRPS	154 462	176 550	—	—
CAU136_Contig_11					
Cluster 11	NRPS	1	6 743	—	—
CAU136_Contig_14					
Cluster 12	TransatPKS	152 503	234 396	Basiliskamides	9
Cluster 13	T1PKS	436 875	483 035	Pellason	33
CAU136_Contig_17					
Cluster 14	Ladderane-NRPS	1	44 923	WS9326	5
CAU136_Contig_18					
Cluster 15	Bacteriocin	133 886	144 125	—	—
CAU136_Contig_22					
Cluster 16	NRPS	1	25 586	Tridecaptin	40
CAU136_Contig_29					
Cluster 17	NRPS	1	2 208	—	—
CAU136_Contig_30					
Cluster 18	NRPS	1	3 044	Polymyxin	60
CAU136_Contig_31					
Cluster 19	NRPS	1	2 499	—	—
CAU136_Contig_35					
Cluster 20	NRPS	1	9 775	Polymyxin	100

注: “—”表示相应片段可能编码次级代谢产物, 但 antiSMASH 数据库中无相似基因簇。

Note: “—” indicates that the gene fragments may produce secondary metabolites, but there are no similar gene clusters in the antiSMASH database.

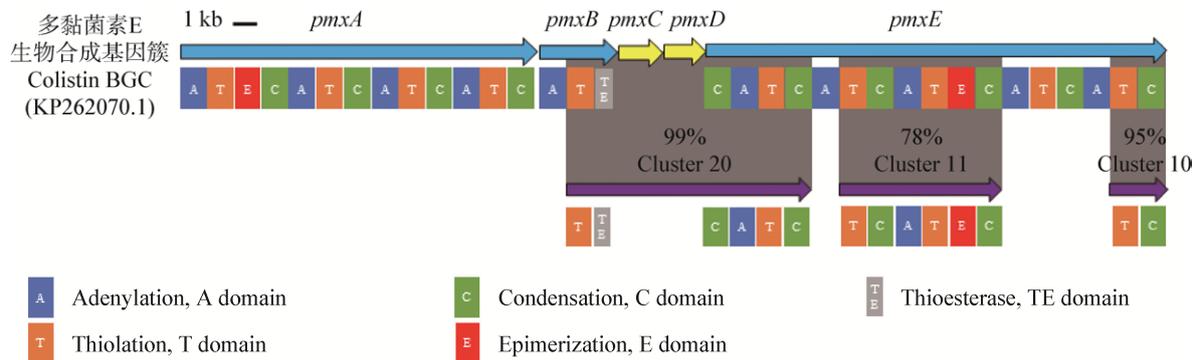


图 2 类芽孢杆菌 CAU136 含有 Colistin 生物合成基因簇

Figure 2 *P. pabuli* CAU136 contains the biosynthesis gene clusters of colistin

注：括号内的序号表示相应序列在 GenBank 的登录号。

Note: Numbers in the parentheses indicated GenBank accession number of the sequences.

根据 BLAST 结果, Cluster 10、Cluster 11 和 Cluster 20 分别属于 Colistin 生物合成基因簇的一部分,如图 2 所示, Cluster 20 不仅包括 *pmxB* 和 *pmxE* 的一部分,还包含 *pmxC* 和 *pmxD* 两个负责转运的基因(灰色阴影中百分比表示氨基酸相似度)。由于二代测序的局限性,Colistin 的生物合成基因簇未能完全测序,但特异性基因片段 Cluster 20 的存在验证了其存在多粘菌素生物合成基因簇。

2.3 RT-PCR 验证多粘菌素生物合成基因簇转录产物

提取 *P. pabuli* CAU136 的 RNA,通过反转录得到 cDNA,PCR 验证多粘菌素生物合成基因转录产物。对全基因组测序结果 Cluster 20 中的多粘菌素合成基因 *pmxE* 部分设计引物后进行 PCR 扩增,16S rRNA 作为阳性对照基因。凝胶电泳验证结果如图 3 所示,*P. pabuli* CAU136 表达多粘菌素生物合成基因簇。

2.4 抗菌活性验证

如图 4 所示,*P. pabuli* CAU136 对金黄色葡萄球菌没有抑菌效果,对多种革兰氏阴性菌有抑菌效果,但对携带 *mcr-1* 的大肠杆菌抑菌圈明显减小,结合基因组预测结果,说明 *P. pabuli* CAU136 可能分泌多粘菌素,从而产生抗菌效果。

2.5 HPLC-MS/MS 验证次级代谢产物活性成分

为确证 *P. pabuli* CAU136 次级代谢产物中的有

效抗菌活性成分,通过 HPLC-MS/MS 扫描 *P. pabuli* CAU136 的粗提取物中是否含有 Colistin。Colistin 有两种主要同系物 Colistin A 和 Colistin B,其差别在于脂肪酸链的碳原子数量不同,相对分子质量分别为 1 169 和 1 155。

Colistin A 和 Colistin B 在电喷雾离子源模式下,易质子化生成多电荷的分子离子。其中三电荷

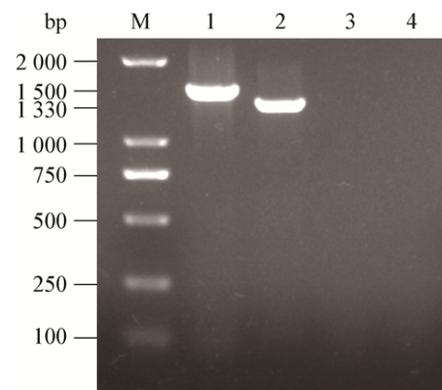


图 3 *P. pabuli* CAU136 表达多粘菌素生物合成基因簇
Figure 3 *P. pabuli* CAU136 expresses the biosynthetic gene clusters of colistin

注: M: DL2000 DNA marker; 1: 16S rRNA 基因; 2: *pmxE* 基因; 3: 阴性对照 16S rRNA 基因; 4: 阴性对照 *pmxE* 基因。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: 16S rRNA gene; 2: *pmxE* gene; 3: 16S rRNA gene of negative control; 4: *pmxE* gene of negative control.

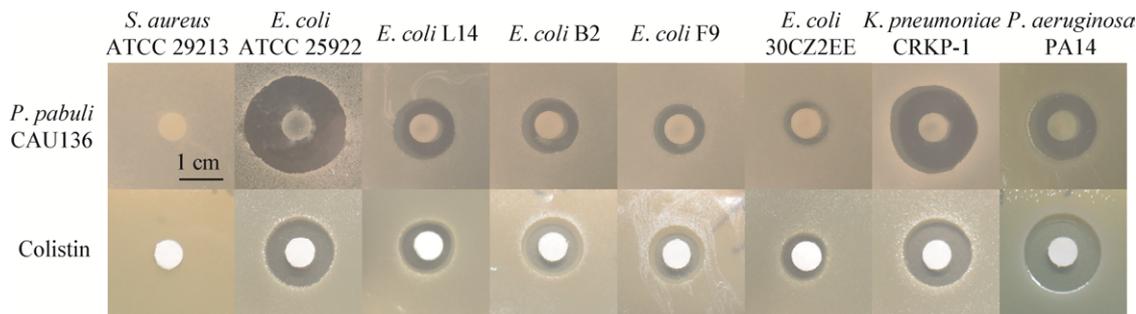


图 4 双层琼脂平板法验证类芽孢杆菌 CAU136 抗菌活性

Figure 4 The antibacterial activity of *Paenibacillus pabuli* CAU136 was identified by double layer agar plate

离子 $[M+3H]^{3+}$ 响应最高, 母离子(m/z)分别为 391.1 和 386.3。Colistin A 的主要碎片离子 m/z 为 384.7 和 101.4; Colistin B 的主要碎片离子 m/z 为 380.2 和 101.5。分别是母离子失去一个 H_2O 的 $[M+3H-H_2O]^{3+}$ 和一个断裂自侧链的 $[L-Dab-\gamma-NH_2]^{+7}$ 。特征离子对扫描结果如图 5 所示, 粗提物中含有大量 Colistin A 和 Colistin B 的特征碎片离子对, 说明 *P. pabuli* CAU136 分泌抗菌化合物多粘菌素 E。

3 讨论与结论

类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)是 Ash 等^[8]于 1994 年在分子生物学研究结果基础上由芽孢杆菌中分离出来的一个新属, 其与芽孢杆菌属(*Bacillus*)很相似, 如均呈杆状、产芽孢、次级代谢产物较丰富。但类芽孢杆菌与芽孢杆菌也有不同之处, 比如类芽孢杆菌能产生 Polymyxin、Tridecaptin 等特异性拮抗革兰氏阴性菌的抗生素; 而芽孢杆菌主要产生 Iturin、Fengycin 和 Surfactin 等广谱抗菌或对真菌有较好抗菌活性的抗生素, 而鲜见特异性拮抗革兰氏阴性菌的抗生素, 所以类芽孢杆菌是筛选特异性拮抗革兰氏阴性菌抗生素的良好来源。人们已经在类芽孢杆菌属中发现许多具有良好抗菌活性的脂肽, 目前应用最广泛的有多粘菌素 B (Polymyxin B)和多粘菌素 E (Colistin)等多粘菌素类抗生素^[9]。此外, 从 *Paenibacillus tianmuensis* 中也分离出了其他脂肽类化合物 Battactin (Octapeptins B5)^[10], 对于临床分离的多重耐药革兰氏阴性菌的最小抑菌浓度能达到 2–4 $\mu\text{g/mL}$ 。Octapeptins 类化合物与多粘菌素结构类似, 对多种多重耐药革兰氏阴性菌具有抗菌效果, 未发现与多粘菌素有交叉耐药发生, 被认为是替代多粘菌素作为有效杀灭多重耐药革兰氏阴性菌的良好替代品^[11]。线状阳离子脂肽 Tridecaptin 最早在 1978 年被发现^[12], 是一种由 13 个氨基酸组成的多肽, 对多种革兰氏阴性菌有良好的抗菌效果。2016 年, Cochrane 等重新研究了 Tridecaptin 的抗菌机制, 发现 Tridecaptin 是通过特异性结合革兰氏阴性菌的 Lipid II 结合而杀菌且不

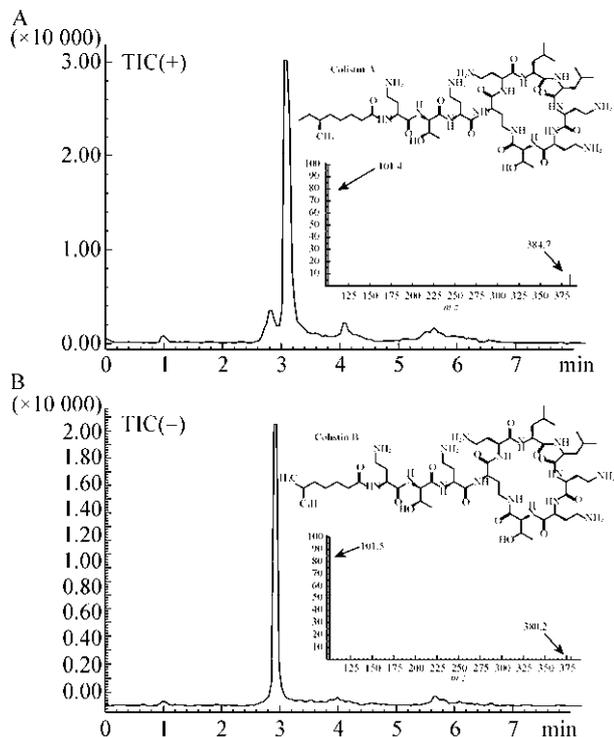


图 5 粗提物中 Colistin A (A)、Colistin B (B)特征离子扫描色谱图

Figure 5 Chromatograms of colistin A (A) and colistin B (B) in the crude extract

易产生耐药性,是一种良好的治疗多重耐药革兰氏阴性菌感染的抗生素候选物^[13]。类芽孢杆菌还被报道能分泌 Pelgipeptins^[14]、Paenibacterin^[15]以及 Fusaricidins (LI-F 类抗生素)^[16-17]等多种抗菌活性物质,均未发现与已知耐药菌有交叉耐药的表型,表明这些抗菌活性物质具有新的抗菌机制,是良好的抗生素开发候选化合物。

本研究从北京周边土壤分离到一株类芽孢杆菌,通过全基因组分析和双层琼脂平板法验证其在 TSA 平板上产抗菌活性物质的能力,同时选择敏感菌和耐药菌作为指示菌,观察其抑菌圈大小,推测其在 TSA 平板上可能产生多粘菌素;通过 HPLC-MS/MS 分析检测到其次级代谢产物粗提物中含有 Colistin 的特征离子对,因此推测其产生 Colistin,但其抗菌活性是否全部为 Colistin 引起需要进一步试验证明。除此之外,*P. pabuli* CAU136 可能分泌其他抗菌活性物质,有待进一步试验探究。我们通过全基因组分析发现 *P. pabuli* CAU136 有较强的次级代谢产物合成潜能,具有许多其他活性产物合成基因簇,但在实验室条件下相应活性产物生物合成基因簇可能沉默。接下来可以采用单菌多次级代谢产物(One strain-many compounds, OSMAC)的方法^[18]更换培养条件,检测其能否产生其他新型抗菌活性物质,为发掘新型抗生素奠定基础。

REFERENCES

- [1] Kupferschmidt K. Resistance fighter[J]. Science, 2016, 352(6287): 758-761
- [2] Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla_{NDM-1}*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(12): 5046-5054
- [3] Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2016, 16(2): 161-168
- [4] Wang MY, Wang F, Han JZ, et al. Optimization of fermentation medium and application in cucumber Fusarium wilt of *Paenibacillus polymyxa* JSa-9[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2016, 39(4): 673-680 (in Chinese)
王美英,王芳,韩金志,等. *Paenibacillus polymyxa* JSa-9 发酵培养基优化及其在黄瓜枯萎病中的应用研究[J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(4): 673-680
- [5] Cochrane SA, Vederas JC. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates[J]. Medicinal Research Reviews, 2016, 36(1): 4-31
- [6] Weber T, Blin K, Duddela S, et al. antiSMASH 3.0 — a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(Web Server issue): W237-W243
- [7] Liu Q, Sun L, Zhang L. Determination of colistin and bacitracin residues in milk by SPE-UPLC-MS/MS[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2011, 45(7): 17-20 (in Chinese)
刘琪,孙雷,张骊. 牛奶中粘菌素和杆菌肽残留的固相萃取超高效液相色谱-串联质谱法测定[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(7): 17-20
- [8] Ash C, Priest FG, Collins MD. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1994, 64(3): 253-260
- [9] Chen HY, Liao FP, Lin JR. Isolation and structure analysis of the components of anti-gram-negative bacteria by the strain CP7 of *Paenibacillus polymyxa*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(6): 2105-2110 (in Chinese)
陈海英,廖富蕓,林健荣. *Paenibacillus polymyxa* CP7 菌抗革兰氏阴性菌活性组分的分离和结构分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(6): 2105-2110
- [10] Qian CD, Wu XC, Teng Y, et al. Battacin (octapeptin B5), a new cyclic lipopeptide antibiotic from *Paenibacillus tianmuensis* active against multidrug-resistant gram-negative bacteria[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 56(3): 1458-1465
- [11] Velkov T, Roberts KD, Li J, et al. Rediscovering the octapeptins[J]. Natural Product Reports, 2017, 34(3): 295-309
- [12] Shoji J, Hinoo H, Sakazaki R, et al. Isolation of tridecaptins A, B and C (studies on antibiotics from the genus *Bacillus*. XXIII)[J]. The Journal of Antibiotics, 1978, 31(7): 646-651
- [13] Cochrane SA, Findlay B, Bakhtiary A, et al. Antimicrobial lipopeptide tridecaptin A1 selectively binds to Gram-negative lipid II[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(41): 11561-11566
- [14] Wu X, Shen X, Ding R, et al. Isolation and partial characterization of antibiotics produced by *Paenibacillus elgii* B69[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 310(1): 32-38
- [15] Guo YQ, Huang E, Yuan CH, et al. Isolation of a *Paenibacillus* sp. strain and structural elucidation of its broad-spectrum lipopeptide antibiotic[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(9): 3156-3165
- [16] Deng Y, Lu ZX, Lu FX, et al. Identification of LI-F type antibiotics and di-*n*-butyl phthalate produced by *Paenibacillus polymyxa*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 85(3): 175-182
- [17] Hua BQ. Purification, characterization and properties of antibacterial substances produced by *Paenibacillus bovis* sp. nov. BD3526[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2017 (in Chinese)
花榜清. *Paenibacillus bovis* sp. nov. BD3526 抗菌物质的分离纯化、结构表征及其性质的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2017
- [18] Hewage RT, Aree T, Mahidol C, et al. One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete* sp.[J]. Phytochemistry, 2014, 108: 87-94