

拮抗菌 X23 发酵液对金黄色葡萄球菌的抑制作用

卢芳国¹, 周清明^{2*}, 陈武², 何迎春¹, 张薇², 文礼湘¹

(1.湖南中医药大学 医学院, 湖南 长沙 410208; 2.湖南农业大学 农学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 为了解拮抗菌 X23 发酵液对金黄色葡萄球菌的杀菌作用及机理, 将拮抗菌 X23 发酵液与金黄色葡萄球菌作用后, 运用琼脂平板倾注法检测菌体克隆数, 扫描电镜观察菌体形态, 透射电镜观察菌体超微结构。结果表明: 拮抗菌 X23 发酵液与金黄色葡萄球菌作用 60、90、120 min 后, 金黄色葡萄球菌克隆数极显著低于生理盐水对照组($P<0.01$); 与拮抗菌 X23 发酵液作用 60 min 后, 金黄色葡萄球菌菌体表面出现囊状小突起, 细胞膜皱褶并最终破裂, 菌体内出现大块透电子区, 胞浆内容物稀疏, 胞质不均匀, 胞内空泡变性加重, 分裂相减少, 菌体溶解。推测拮抗菌 X23 发酵液可以通过破坏细胞膜结构而杀死金黄色葡萄球菌。

关 键 词: 拮抗菌; 金黄色葡萄球菌; 杀菌作用

中图分类号: Q939.92 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)05-0497-04

The bactericidal effect of antagonistic bacterium X23 fermentation liquid against *Staphylococcus aureus*

LU Fang-guo¹, ZHOU Qing-ming^{2*}, CHEN Wu², HE Ying-chun¹, ZHANG Wei², WEN Li-xiang¹

(1.School of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2.College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: *Staphylococcus aureus* was treated with antagonistic bacterium X23 fermentation liquid, then the number of bacterial colonies was counted using agar plate pouring method, and the morphology and ultrastructure of the bacteria were observed using scanning electron-microscope (SEM) and transmission electron-microscope (TEM) respectively to study the bactericidal effect and partial mechanism of antagonistic bacterium X23 fermentation liquid on *S. aureus*. The result showed that the number of *S. aureus* colonies in the treated groups was significantly lower than that in the control group ($P<0.01$). In the group treated for 60 min, the surface of *S. aureus* had many small protuberances and the cell membrane was folded and eventually ruptured, inside the bacterial cell, massive electron penetration areas appeared, contents in cytoplasm became sparse and uneven, intracellular vacuolar degeneration was aggravated. Besides, cell division was reduced, and bacterium cells were dissolved. These results indicated that antagonistic bacterium X23 fermentation liquid could kill *S. aureus* through disrupting the bacterial structure.

Key words: antagonistic bacterium; *Staphylococcus aureus*; antibacterial effect

短芽孢杆菌 X23(*Brevibacillus brevis* X23)是湖南农业大学植物病理研究室从湖南省嘉禾县烟草青枯病发病较重的烟区筛选得到的高效拮抗菌^[1-2]。前期研究^[3-4]已证明该菌有较强的抗逆和抗菌、防病能力。为进一步了解其抗菌范围与作用机理, 笔

者在研究该菌抗茄科作物青枯病菌的活性物质与作用机理的基础上, 分析了该拮抗菌发酵液对金黄色葡萄球菌的菌体形态和超微结构的影响。现将结果报道如下。

收稿日期: 2011-12-21

基金项目: 国家“863”计划专项(2009AA10Z403); 国家自然科学基金项目(81072751; 31101482)

作者简介: 卢芳国(1961—), 女, 湖南浏阳人, 博士, 教授, 主要从事抗菌抗病毒制剂研发与中药筛选研究; *通信作者, zqm0618@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

拮抗菌 X23 由湖南农业大学植物病理研究所分离、鉴定、保存。菌种活化、扩大培养后, 将培养液离心后经 0.22 μm 过滤器(购自 Millipore 公司)过滤除菌, 获无菌发酵液。考马斯亮蓝法检测无菌发酵液蛋白含量为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 琼脂扩散法检测证明发酵液原液(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、1:2 稀释液(15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、1:4 稀释液(7.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、1:8 稀释液(3.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对兔红细胞没有溶血作用。金黄色葡萄球菌(26003)系湖南中医药大学微生物免疫实验室保存菌株, 经活化后取对数生长期菌液; 营养肉膏汤及肉膏琼脂培养基购自杭州天和微生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 拮抗菌 X23 发酵液处理后金黄色葡萄球菌菌落数的检测

将活化后的金黄色葡萄球菌接于 5 mL 营养肉汤培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 8 h, 无菌生理盐水稀释 1 000 倍备用。每 1 mL X23 发酵液原液与 3 mL 对数生长期金黄色葡萄球菌液混合, 分别于作用 10、30、60、90 和 120 min 后用琼脂平板倾注法检测菌落数。每个处理设 3 次重复, 最终数据为 3 次重复的加权平均数。同步设生理盐水对照组。

1.2.2 拮抗菌 X23 发酵液处理后金黄色葡萄球菌菌体形态的观察

将活化后的金黄色葡萄球菌接种至 5 mL 液体营养肉汤培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 8 h 后分装, 每支 10 mL, 6 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 用 1 mL 无菌生理盐水悬浮备用。取 100 μL 菌悬浮液加 900 μL X23 发酵液原液, 分别处理 10、30 和 60 min。同步设生理盐水对照。离心收集发酵液原液作用后的菌体, 3% 戊二醛固定, 0.1 mol/L PBS 漂洗后涂片, 乙醇梯度脱水, 醋酸异戊醇浸透后真空镀膜, 在 JSM-6360LV 型扫描电镜下观察并拍照(由湖南师范大学电镜室完成)。

1.2.3 拮抗菌 X23 发酵液处理后金黄色葡萄球菌超微结构的观察

取 100 μL 菌悬浮液, 加 900 μL X23 发酵液原液, 分别处理 30 和 60 min。同步设生理盐水对照。离心收集发酵液原液处理后的菌体, 用 3% 戊二醛前固定 1 h 后, 经 0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次, 再用 1% 锇酸固定, 丙酮逐级脱水, Epen812 环氧树脂包埋, 修块, 超薄切片, 醋酸铀、硝酸铅双重染色, 置 JEM-1230 型透射电镜下观察与拍照(由湖南师范大学电镜室完成)。

1.3 数据处理

对试验数据采用 SPSS(7.0)软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌 X23 发酵液处理后的金黄色葡萄球菌菌落数

拮抗菌 X23 发酵液分别处理金黄色葡萄球菌 10、30、60 min 与处理 90 和 120 min 的菌落数有显著差异($P < 0.01$)。作用 90 和 120 min 后的菌落数极显著低于生理盐水对照组($P < 0.01$)(表 1), 表明拮抗菌 X23 发酵液对金黄色葡萄球菌有明显的杀伤作用。随着处理时间的延长, 金黄色葡萄球菌的菌落数显著减少, 这一现象说明拮抗菌 X23 的发酵液对金黄色葡萄球菌的杀灭作用与作用时间呈正相关。

表 1 拮抗菌 X23 发酵液处理后的金黄色葡萄球菌菌落数

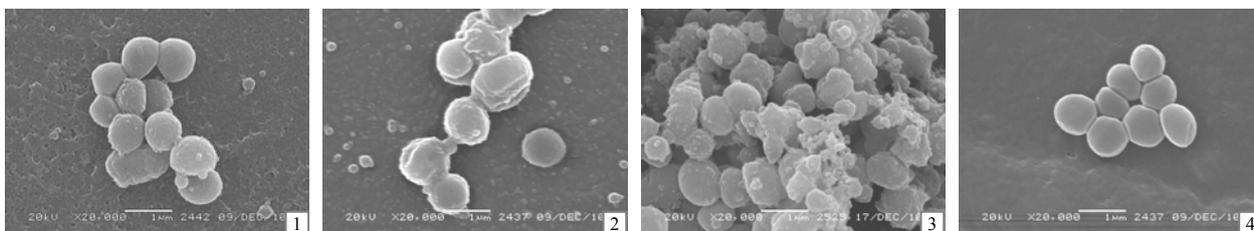
Table 1 Number of *S. aureus* colonies in the groups treated by antagonistic bacterium X23 fermentation liquid

作用时间/ min	菌落数/(cfu·mL ⁻¹)		T 值	P 值
	发酵液试验组	生理盐水对照组		
10	669.00±96.23	708.00±71.69	-0.564	0.604
30	623.00±62.95	701.00±43.41	-1.767	0.152
60	478.00±27.05	687.67±41.36	-7.348	0.002
90	399.33±25.17	717.67±26.35	-15.132	0.000
120	377.33±6.11	712.69±27.23	-20.814	0.000
F 值	17.670	0.201		
P 值	0.000	0.937		

2.2 拮抗菌 X23 发酵液处理后的金黄色葡萄球菌菌体形态

在扫描电镜下,生理盐水对照组的金黄色葡萄球菌为圆球形,直径约 $1\ \mu\text{m}$,排列成葡萄状,饱满,形态规则,表面光滑,菌体完整。发酵液处理 10 min

后,金黄色葡萄球菌形态无明显变化。发酵液处理 30 min 后,少数金黄色葡萄球菌菌体表面出现小突起,细胞膜皱褶,菌体破裂;处理 60 min 后,大多数金黄色葡萄球菌菌体表面出现小突起,细胞膜皱褶,菌体破裂(图 1)。



1、2、3 分别为拮抗菌 X23 发酵液处理 10、30 和 60 min 后的金黄色葡萄球菌的菌体形态; 4 为生理盐水处理 60 min 后的金黄色葡萄球菌的菌体形态。

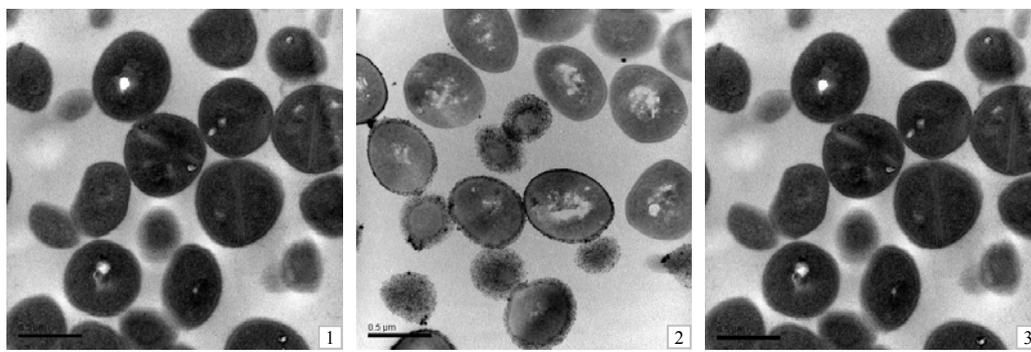
图 1 拮抗菌 X23 发酵液处理后的金黄色葡萄球菌形态(扫描电镜, $\times 20\ 000$)

Fig.1 Morphology of *S. aureus* in the groups treated by antagonistic bacterium X23 fermentation liquid (SEM, $\times 20\ 000$)

2.3 拮抗菌 X23 发酵液处理后的金黄色葡萄球菌超微结构

在透射电镜下,生理盐水对照组的金黄色葡萄球菌菌体切面多呈圆形,细胞壁、细胞膜完整,胞质均匀,电子密度中等。发酵液处理 30 min 后,少数金黄色葡萄球菌菌体内出现不均一的透电子区,

细胞壁、细胞膜仍然完整,有较多的分裂相;处理 60 min 后,大部分金黄色葡萄球菌菌体内出现大块透电子区,胞壁变薄不完整,细胞膜发生不同程度的凹陷变形,甚至穿孔,胞浆内容物稀疏,胞质不均匀或密度下降,胞内空泡变性加重,分裂相减少,菌体有溶解现象(图 2)。



1、2 分别为拮抗菌 X23 发酵液处理 30 和 60 min 后的金黄色葡萄球菌菌体超微结构; 3 为生理盐水处理 60 min 后的金黄色葡萄球菌菌体超微结构。

图 2 拮抗菌 X23 发酵液处理后的金黄色葡萄球菌超微结构(透射电镜, $\times 50\ 000$)

Fig.2 Ultra-microstructures of *S. aureus* in the groups treated by antagonistic bacterium X23 fermentation liquid (TEM, $\times 50\ 000$)

3 讨论

拮抗菌的抑菌机理包括与病原微生物竞争生长位点、合成并分泌抑菌物质和提高植物的免疫水平等^[5-8]。研究^[9-11]表明,合成并分泌抑菌物质被认为是拮抗菌最主要的作用机理。前期研究^[12]已经表明,拮抗菌 X23 的主要活性成分为多肽类物质,串

联质谱测序表明该抗菌肽与已知抗菌肽的同源性低,为一类新的抗菌肽。进一步的试验表明,抗菌肽处理导致青枯病菌的细胞膜破裂,内容物外渗(待发表)。本研究发现,X23 发酵液处理导致金黄色葡萄球菌表面出现小突起、细胞膜皱褶和菌体破裂等,说明 X23 发酵液能破坏金黄色葡萄球菌细胞膜的完整性。透射电镜观察表明,X23 发酵液处理 60

min后,金黄色葡萄球菌菌体内出现大块透电子区、胞浆内容物稀疏、胞质不均匀或密度下降、胞内空泡变性加重和分裂相减少等变化,说明拮抗菌 X23 发酵液中的活性成分能进入胞内,通过破坏细胞器或干扰核酸复制以及蛋白质合成等机制而发挥抑菌或杀菌作用。

金黄色葡萄球菌分布广泛,携带多种抗生素抗性基因,被公认为是一种危害较大的机会主义致病菌^[13-15]。筛选对金黄色葡萄球菌具有良好抑制或杀灭作用的拮抗菌并探索其作用机理,对于消除或减轻金黄色葡萄球菌的潜在威胁具有重要意义。本研究结果阐述了拮抗菌 X23 的无菌发酵液杀死金黄色葡萄球菌的部分作用机理,后续研究将集中探讨发酵液内各种活性成分的作用机理,为拓展拮抗菌 X23 及其代谢成分的应用打下基础。

参考文献:

- [1] 黎定军, 廖晓兰, 罗宽. 湖南烟草青枯病土壤拮抗菌的筛选[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 1997, 23(3): 256-259.
- [2] 张竹青, 罗宽, 高必达, 等. 七株抗青枯病菌生防菌的初步鉴定[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2002, 28(6): 512-513.
- [3] 陈武, 何命军, 易建华, 等. 三株拮抗菌对烟草幼苗根系活力的影响[J]. 湖南农业科学, 2005(4): 26-27.
- [4] 张旭, 陈武, 杨玉婷, 等. 青枯菌拮抗菌 2-Q-9 的分子鉴定及抑菌相关基因的克隆[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2009, 35(3): 233-236.
- [5] 杨柳, 兰涛, 巫升鑫, 等. 作物青枯病研究进展[J]. 亚热带农业研究, 2011, 7(4): 251-256.
- [6] 卢燕回, 钟启德, 韦大跃, 等. 烟草青枯病生物防治研究进展[J]. 广西农业科学, 2007, 38(4): 414-418.
- [7] 马文山, 廖富蘋, 范雪云, 等. 细菌抗菌肽的研究进展及其应用[J]. 生物技术通报, 2008, 23(3): 38-41.
- [8] 黎观红, 洪智敏, 贾永杰, 等. 抗菌肽的抗菌作用及其机制[J]. 动物营养学报, 2011, 23(4): 546-555.
- [9] Khandelia H, Ipsen J H, Mouritsen O G. The impact of peptides on lipid membranes[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 17(8): 1528-1536.
- [10] 张晓巩, 方超, 白卉, 等. 抗菌肽作用机制的研究进展[J]. 生理科学进展, 2011, 42(1): 11-14.
- [11] 吴静, 李玉峰, 林树乾, 等. 抗菌肽及其临床应用研究进展[J]. 生物技术通报, 2011, 27(3): 33-42.
- [12] 陈武, 彭曙光, 周清明, 等. 侧孢芽孢杆菌 2-Q-9 外泌抗菌肽的纯化与鉴定[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2011, 37(1): 26-30.
- [13] 李凡, 刘晶星, 徐志凯, 等. 医学微生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 98-102.
- [14] 杨舟, 刘盈, 孙娟, 等. 我国社区儿童皮肤感染金黄色葡萄球菌的耐药研究[J]. 微生物与感染, 2012, 7(1): 37-43.
- [15] 徐红云, 刘春林, 袁文丽, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的临床分布及耐药性[J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11(1): 52-54.

责任编辑: 罗慧敏