

# 海洋细菌 *Bacillus coagulans* spp. *heishijiaosis* 发酵液抗真菌活性及其机制<sup>△\*</sup>

刘全永<sup>1,2</sup>, 崔保伟<sup>1</sup>, 胡江春<sup>2</sup>, 薛德林<sup>2</sup>, 王书锦<sup>2</sup>

(1. 商丘职业技术学院, 河南商丘, 476000; 2. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁沈阳, 110016)

**摘要:**目的 对凝结芽胞杆菌黑石礁新亚种 LU-B02 产生的抗白色念珠菌活性物质的作用靶位及抑菌谱进行了研究。方法 采用山梨醇保护形态变异法结合扫描电镜超微结构观察研究了活性物质的作用靶位, 最小抑菌浓度(MIC)法比较了该菌发酵液对不同真菌的抑菌活性。结果 该活性物质抑制白色念珠菌细胞壁中的主要组分——葡聚糖的合成而造成其细胞壁残缺。该活性物质具有抗真菌专一性, 对革兰氏阳性代表菌金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性代表菌大肠杆菌等细菌均无抑制效果, 而对人体病原真菌抑菌效果较为明显, 尤其是对白色念珠菌的抑制效果较好。MIC测定表明白色念珠菌对 LU-B02 活性物质高度敏感, 相当于斯皮仁诺 8~16 μg, 抑菌效价每毫升相当于 3 500 U 制霉菌素或洁尔阴活性的 4 倍。发酵液在酸性条件下加入 0.2% 冰片时, 室温下存放 6 个月仍可保持良好的抗白色念珠菌活性。结论 凝结芽胞杆菌黑石礁新亚种 (*Bacillus coagulans* spp. *heishijiaosis*) 产生的活性物质在控制以白色念珠菌为主的真菌感染方面具有良好应用前景。

**关键词:**海洋细菌; 凝结芽胞杆菌; 生物活性物质; 抗真菌活性

中图分类号: Q938.2 文献标志码: A 文章编号: 1002-3461(2015)03-065-06

## Antifungal activity and mechanism of the bioactive substance derived from marine bacteria *Bacillus coagulans* spp. *heishijiaosis* fermentation broth

LIU Quan-yong<sup>1,2</sup>, CUI Bao-wei<sup>1</sup>, HU Jiang-chun<sup>2</sup>, XUE De-lin<sup>2</sup>, WANG Shu-jin<sup>2</sup>

(1. Shangqiu Vocational and Technical Institute, Shangqiu, 476000, China;

2. Shenyang Institute of Applied Ecology, CAS, Shenyang, 110016, China)

**Abstract: Objective** To study the antimicrobial targets and spectrum of the bioactive substance from *Bacillus coagulans* spp. *heishijiaosis* fermentation broth. **Methods** The antimicrobial targets and activity were determined by sorbitol protection morphological variation combined with scanning electron microscope and the minimum inhibitory concentration (MIC), respectively. **Results** The bioactive substance exhibited strong antifungal activity, especially *Candida albicans*, and the target maybe owing to the inhibition dextran synthesis resulting in incomplete cell wall. However, the bioactive substance had no effect on Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*). The MIC value was equivalent to 8-16 μg Sporanox. The antifungal effect was 3500 U nystatin or 4 times of Jieryin (an antifungal Chinese medicine), respectively. The bioactive substance added 0.2% borneol showed good activity against *C. albicans* after six month storage. **Conclusion** The bioactive substance from *B. coagulans* fermentation broth showed good prospects in controlling *C. albicans* infections.

**Key words:** marine bacteria; *Bacillus coagulans*; anti-fungal; bioactive substances

\* △基金项目: 国家高技术研究发展计划(2011AA09070404); 国家科技支撑计划项目(2011BAE06B04-03)资助

作者简介: 刘全永(1970-), 男, 副教授。E-mail: liuqy710@sina.com

收稿日期: 2014-12-10

研究 1 种新型抗真菌活性物质的作用机制对于评价该物质在临床上的应用前景有着重要的意义<sup>[1-3]</sup>。抗真菌活性物质的作用机制比较复杂,包括干扰细胞质膜、影响 DNA 或 RNA 合成、影响细胞壁合成等,临床上广泛使用的抗真菌药物如多烯类或唑类药物主要干扰真菌细胞质膜,前者与真菌细胞膜上的麦角甾醇相结合,在膜上形成水孔,损伤膜的通透性,使菌体内氨基酸、电解质等重要物质渗出而死亡<sup>[4]</sup>;后者通过抑制 C<sub>14</sub>-去甲基酶影响真菌细胞膜麦角甾醇的合成<sup>[5]</sup>。多烯类抗真菌药物具有较强的肾毒性,而唑类药物产生抗药性的现象日益突出,因而它们均非临床上理想的抗真菌药物<sup>[6]</sup>。由于真菌细胞壁是真菌细胞所独有的,所以以真菌细胞壁的多糖如葡聚糖、几丁质、甘露聚糖为作用靶位的抗真菌药物具有高效低毒的特点,能够满足临床要求。因此筛选抑制真菌细胞壁合成的天然产物仍是当今和以后抗真菌药物研究工作的重点之一<sup>[7]</sup>。前期的试验已经证实,凝结芽孢杆菌黑石礁亚种(*Bacillus coagulans* spp. *heishijiaosis*) LU-B02 菌株产生的抗白色念珠菌活性物质为碱性水溶性脂肽类化合物,从性质上明显不同于已发现的抗真菌天然产物,研究确定了该活性物质的初步分离方法<sup>[8-10]</sup>。该活性物质是否能够抑制真菌细胞壁合成成为研究者关心的主要问题。

临床上病原真菌感染迅速上升的原因之一在于广谱抗生素的不合理使用导致抗真菌药物在作用病原真菌的同时也杀灭了对人体有益的正常细菌菌群,造成“菌群失调”,从而破坏了人体的微生态平衡,使得机体免疫力下降,条件性病原真菌快速繁殖而引起真菌性疾病。另外,长期使用皮质类固醇激素及免疫抑制剂,可招致局部(黏膜或皮肤)或系统性(内脏)念珠菌病,原因在于激素虽然有抗炎作用,同时也能增强念珠菌活性,可降低病人的免疫力,促进扩散感染,抑制抗体产生,并对真菌毒素有增强作用<sup>[11-12]</sup>,因而抑菌谱、MIC 以及时间稳定性也是考察 1 种活性物质是否适于开发为药物的标志。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试菌株

凝结芽孢杆菌黑石礁亚种(*Bacillus coagulans* spp. *heishijiaosis*) LU-B02 从海水中分离得

到,实验室保存。抑菌谱指示菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、高里氏假丝酵母(*Candida guilliermondii*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、付克柔假丝酵母(*Candida krusei*)、近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoforms*)、石膏样毛癣菌(*Trichophyton mentagrophytes*)为实验室保存菌株。靶子菌为抗白色念珠菌。

#### 1.1.2 培养基

凝结芽孢杆菌黑石礁亚种 LU-B02 活性物质发酵培养基为抗白色念珠菌 2 号培养基(配方为葡萄糖 2 g,蛋白胨 0.3 g,酵母膏 0.8 g,水 100 mL,0.8 P 灭菌 20 min)。形态变异试验培养基为沙氏培养基(0.5%葡萄糖)+0.8 mol/L 山梨醇,供试菌培养基为沙氏培养基。

#### 1.2.3 供试药物

待测药物为 LU-B02 发酵粗提液,对照药物为制霉菌素(Nystatin)、斯皮仁诺(伊曲康唑胶囊)、洁尔阴。

## 1.2 方法

### 1.2.1 发酵提取液的体外抑菌谱

杯碟法测定凝结芽孢杆菌 LU-B02 发酵粗提液对各指示菌株的体外抑菌效果。

### 1.2.2 发酵提取液的最小抑菌浓度测定

采用平皿稀释法,点种各指示菌株,以无菌生长所含抗生素的最小浓度即为最小抑菌浓度(Minimum Inhibition Concentration, MIC)。酵母及新生隐球菌 37 °C 培养 6~7 d 观察结果,癣菌 26 °C 培养 1~2 周观察结果,其他 28 °C 下培养 2~7 d 观察结果。

### 1.2.3 形态变异试验

培养后的白色念珠菌分别接种于不含和含有山梨醇的形态变异培养基中(同 MIC 中方法),根据已测定的 MIC 按亚 MIC 浓度加入活性物质(1/50,体积分数),28 °C 下培养 7 d,分别取样品中的白色念珠菌经路哥氏碘液染色后,观察记录形态变异情况。

### 1.2.4 超微结构测定

采用扫描电镜法。凝结芽孢杆菌 LU-B02 发酵液经处理后,以杯碟法作用于白色念珠菌(同时

以未作用的白色念珠菌作对照), 28 °C 恒温培养, 待抑菌圈边缘由清晰变模糊后, 取抑菌圈边缘内侧的白色念珠菌及对照菌在扫描电镜下观察对比菌体细胞发生的超微结构变化。

### 1.2.6 凝结芽孢杆菌 LU-B02 发酵液活性物质的时间稳定性

由于凝结芽孢杆菌 LU-B02 在酸性条件下稳定性较强, 设计如表 1 各处理, 以白色念珠菌为指示菌, 考查各处理抑菌活性随时间的稳定性。

表 1 凝结芽孢杆菌 LU-B02 活性物质时间稳定性处理方案  
Table 1 The design of time stability of bioactive substance produced by *B. coagulans* LU-B02

处理号	处理方法
处理 1	发酵液调 pH3~4, 离心, 添加 0.2 % 冰片
处理 2	LU-B02 离子交换洗脱液
处理 3	发酵液调 pH3~4, 离心, 添加 0.2 % 冰片, 室温存放 5 个月
处理 4	LU-B02 离子交换洗脱液, 室温存放 5 个月
处理 5	处理 1 稀释 20 倍
处理 6	处理 2 稀释 20 倍
处理 7	处理 3 稀释 20 倍
处理 8	处理 4 稀释 20 倍

## 2 结果与分析

凝结芽孢杆菌 LU-B02 发酵液活性物质的体外抑菌谱

表 2 凝结芽孢杆菌 LU-B02 活性物质的抑菌谱

Table 2 Antimicrobial spectrum of bioactive substance produced by *B. coagulans* LU-B02

指示菌	抑菌圈直径/mm
大肠杆菌	0
金黄色葡萄球菌	0
枯草芽孢杆菌	0
白色念珠菌	36.2
新型(生)隐球菌	31.2
石膏样毛癣菌	20.2

从表 2 可以看出, 凝结芽孢杆菌黑石礁亚种 (*B. coagulans* spp. *heishijiaosis*) LU-B02 发酵产生的活性物质对革兰氏阳性代表菌金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性代表菌大肠杆菌等细菌均无显著抑制效果, 而对病原性真菌抑菌效果较为明显, 尤其是对病原性酵母菌如白色念珠菌和新型隐球菌的抑制效果较好。说明该活性物质具有抗真菌专一性。

### 2.2 凝结芽孢杆菌 LU-B02 发酵液活性物质的最小抑菌浓度

最小抑菌浓度反映了该药物对病原微生物的抑菌效果, 即病原微生物对该药物的敏感程度。根据 MIC 可将病原微生物对药物的敏感程度分为 4 级, 即高度敏感 (MIC < 50 μg/mL)、中度敏感 (MIC = 50 ~ 100 μg/mL)、敏感 (MIC = 100 ~ 300 μg/mL)、不敏感 (MIC > 300 μg/mL)。

表 3 凝结芽孢杆菌 LU-B02 活性物质和斯皮仁诺的最小抑菌浓度

Table 3 MIC value of Sporanox and the bioactive substance produced by *B. coagulans* LU-B02

指示菌		药物	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC 范围
菌名	株数				
高里氏假丝酵母	5	LU-B02(%, 体积分数)	>20	>20	>20
		斯皮仁诺(μg/mL)	8	16	4~16
热带假丝酵母	5	LU-B02(%, 体积分数)	>20	>20	>20
		斯皮仁诺(μg/mL)	16	32	16~32
付克柔假丝酵母	6	LU-B02(%, 体积分数)	>20	>20	20~>20
		斯皮仁诺(μg/mL)	8	16	4~16
近平滑假丝酵母	6	LU-B02(%, 体积分数)	>20	>20	20~>20
		斯皮仁诺(μg/mL)	4	16	4~16
白色念珠菌	13	LU-B02(%, 体积分数)	10	20	5~20
		斯皮仁诺(μg/mL)	16	16	8~16
酿酒酵母	5	LU-B02(%, 体积分数)	>20	>20	>20
		斯皮仁诺(μg/mL)	32	>32	32~>32
新型隐球菌	13	LU-B02(%, 体积分数)	20	>20	10~>20
		斯皮仁诺(μg/mL)	8	16	8~16
表皮癣菌	5	LU-B02(%, 体积分数)	>20	>20	>20
		斯皮仁诺(μg/ml)	16	32	8~32

斯皮仁诺虽然水溶性差,但它是目前临床上治疗真菌感染的主要药物之一。在体外抑菌谱的基础上,以斯皮仁诺为阳性对照,对 LU-B02 活性物质作用于真菌的体外 MIC 进行了测定。从表 3 结果可以看出,LU-B02 活性物质对白色念珠菌和新型隐球菌有较好的抑菌作用,特别是对白色念珠菌的抑菌效果, MIC 相当于斯皮仁诺 8~16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,说明白色念珠菌对 LU-B02 活性物质高度敏感。

### 2.3 凝结芽孢杆菌 LU-B02 活性物质对白色念珠菌造成的形态变异

白色念珠菌细胞壁的结构组分较为复杂,由葡聚糖、几丁质、甘露聚糖及少量蛋白质组成,其中主要成分为葡聚糖。葡聚糖是真菌细胞壁特有的物质,包括  $\beta$ -1,3 葡聚糖和  $\beta$ -1,6 葡聚糖 2 种成分。可以通过 SPAM 法 (Sorbitol Protection and Morphology assay,山梨醇保护形态变异法) 测试活性物质对白色念珠菌细胞壁的作用靶位<sup>[8]</sup>。当真菌细胞处于特殊的渗透压保护状态下,去除细

胞壁后的原生质体部分可以使细胞保持潜在的存活能力,经渗透压保护剂稳定的原生质体已成为研究真菌细胞壁结构的重要工具。此外,渗透压稳定性还用来研究抗真菌抗生素对白色念珠菌 (*C. albicans*) 等真菌的作用方式。如果抗真菌剂作用于真菌细胞壁的主要组份,在培养基中无渗透压保护剂存在的情况下,真菌细胞就会发生裂解;反之,当培养基中存在有适当的渗透压保护剂时,真菌细胞会继续生长。细胞壁是维持细胞特定形态的结构部分,经干扰真菌细胞壁生物合成的抗真菌活性物质处理后,真菌细胞会发生明显的形态变化。不同作用靶位的活性物质作用后,真菌表现的形态变异有差别,差别的结果可以表明活性物质的作用靶位或作用方式。例如,葡聚糖合成酶抑制剂如 papulacandin B、Echinocandin 常使白色念珠菌菌体细胞膨大;而经几丁质合成酶抑制剂如 nikkomycin 处理后白色念珠菌因形成隔膜及菌体分裂困难而形成细胞链,见表 4。

表 4 凝结芽孢杆菌 LU-B02 活性物质对白色念珠菌形态变异的影响

Table 4 Effects of bioactive substance produced by *B. coagulans* LU-B02 on *C. albicans* morphology

作用后白色念珠菌形态变异	作用靶位	示例
细胞膨大或形成多细胞聚合体 球形细胞链	$\beta$ -1,3 葡聚糖合成; $\beta$ -1,6 葡聚糖合成; 几丁质合成	PapulacandinEchinocandin 等 NikkomycinPlayoxin 等

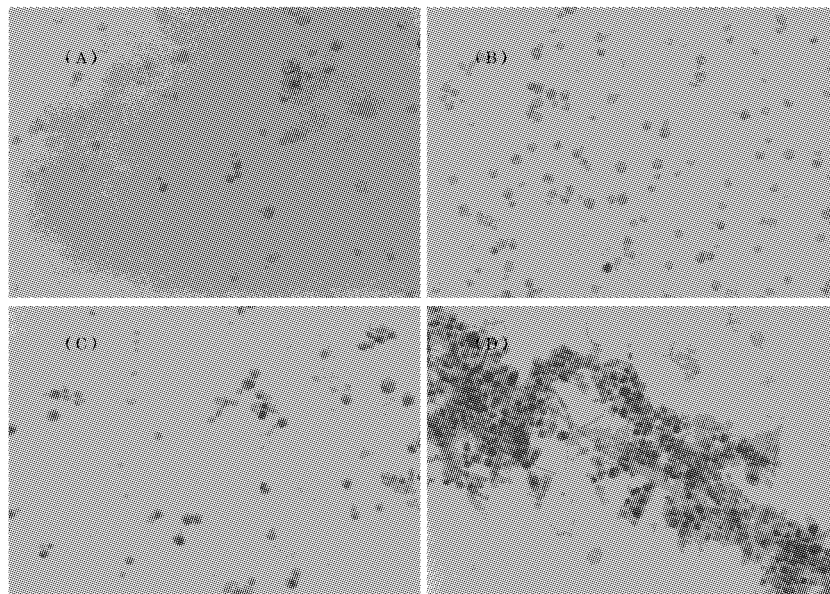


图 1 凝结芽孢杆菌 LU-B02 活性物质对白色念珠菌形态变异的影响

Fig. 1 Effects of bioactive substance produced by *B. coagulans* LU-B02 on *C. albicans* morphology

A: 对照,无山梨醇保护; B: 对照,有山梨醇保护; C: 活性物质处理,无山梨醇保护; D: 活性物质处理,有山梨醇保护  
A: Control, without sorbitol protection; B: Control, with sorbitol protection; C: Bioactive substance treatment, without sorbitol protection; D: Bioactive substance treatment, with sorbitol protection.

试验表明,未经 LU-B02 活性物质作用的白色念珠菌在有无山梨醇保护的情况下,形态无明显差异(见图 1A)。在浓度小于 MIC,白色念珠菌菌体形态经 LU-B02 活性物质作用后发生显著变化,形成明显的多细胞聚合体,其中伴有少数细胞膨大(见图 1D)。这一现象表明,LU-B02 抗真菌活性物质的作用靶位为白色念珠菌细胞壁中的主要组分——葡聚糖的合成。

#### 2.4 凝结芽孢杆菌 LU-B02 活性物质对白色念

珠菌超微结构的影响

扫描电子显微镜下观察白色念珠菌在 LU-B02 产生的抗真菌活性物质作用前后发生的菌体变化发现,LU-B02 产生的活性物质作用白色念珠菌后,可明显造成后者菌体细胞壁残缺(见图 2)。这说明该活性物质是 1 种作用于白色念珠菌细胞壁的抗真菌天然产物,而作用于真菌细胞壁的活性物质以其显著的差异毒力一直是抗真菌药物筛选工作的重点对象。

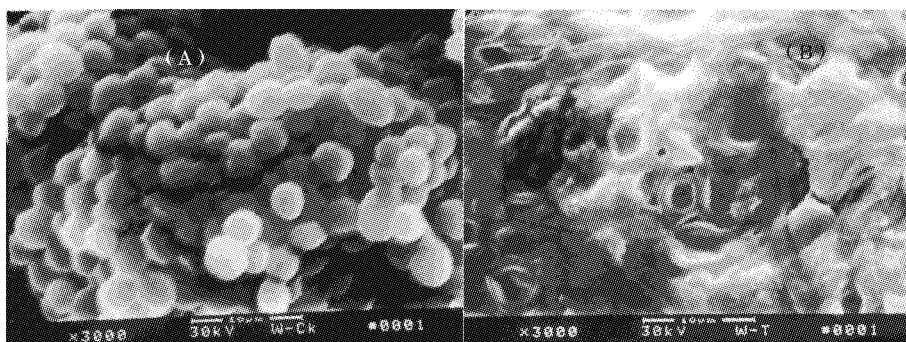


图 2 凝结芽孢杆菌 LU-B02 活性物质对白色念珠菌形态的影响(A 为作用前,B 图作用后)

Fig. 2 Effects of bioactive substance produced by *B. coagulans* LU-B02 on *C. albicans* morphology

#### 2.5 凝结芽孢杆菌 LU-B02 发酵液活性物质抗真菌活性

制霉菌素是典型的多烯类抗真菌药物,洁尔阴是 1 种中药复方抗真菌药物。试验表明,LU-B02 发酵产生抗白色念珠菌活性物质的效价每毫

升相当于 3 500 U 制霉菌素(见图 3),LU-B02 活性物质提取液抗白色念珠菌活性物质的活性相当于洁尔阴 4 倍(见图 4)。以上结果说明 LU-B02 活性物质的抗白色念珠菌活性较强。

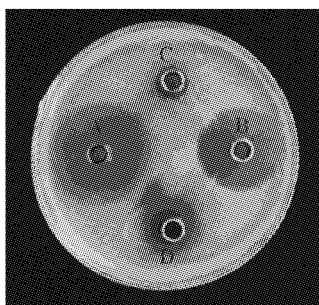


图 3 凝结芽孢杆菌 LU-B02 活性物质抗白色念珠菌活性(I)

Fig. 3 The activity of the bioactive substance produced by *B. coagulans* LU-B02 against *C. albicans* (I)

A 为 LU-B02 发酵液原液;B 为 LU-B02 发酵液原液 2 倍稀释液;C 为 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  制霉菌素;D 为 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  制霉菌素

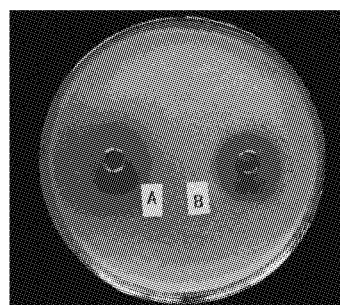


图 4 凝结芽孢杆菌 LU-B02 活性物质抗白色念珠菌活性(II)

Fig. 4 The activity of the bioactive substance produced by *B. coagulans* LU-B02 against *C. albicans* (II)

A 为洁尔阴 5 倍稀释液;B 为 LU-B02 发酵液 20 倍稀释液

#### 2.6 凝结芽孢杆菌 LU-B02 活性物质的时间稳定性

从图 5 可以看出,LU-B02 发酵液若不经离子

交换,在室温下存放 15 d,活性即明显丧失,且溶液变混浊,这可能是由于发酵液中其它营养物质使某些细菌繁殖而破坏了 LU-B02 活性物质;经

离子交换后,室温下存放 6 个月仍可保持良好的抗白色念珠菌活性。试验还发现,加入 0.2 % 的冰片也可延长 LU-B02 活性物质的活性至 6 个月而无明显损失。有资料报道冰片具有抗真菌活性,但本研究组用 0.2 % 的冰片进行对照试验证

明,该浓度下冰片对白色念珠菌并无抑菌作用,因而推测冰片只是抑制了其它微生物对活性物质的失活作用。以上结果表明,LU-B02 活性物质经分离提取后或发酵液在酸性条件下加入 0.2 % 冰片时,活性物质具有较强的时间稳定性。

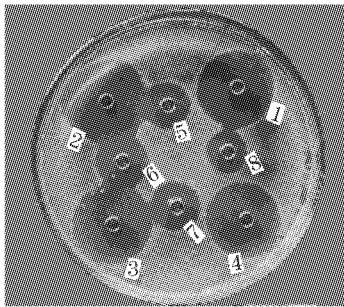


图 5 凝胶芽孢杆菌 LU-B02 活性物质的时间稳定性

Fig. 5 The time stability of the bioactive substance produced by

*B. coagulans* LU-B02

图片中的 1-8 分别代表处理 1-处理 8.

The numbers 1-8 in the figure mean the treatment 1-8.

### 3 讨论

理想的抗真菌药物应用是差异毒力大,对真菌专一性强。凝结芽孢杆菌是国际上公认的安全菌,目前用于微生态制剂,本研究筛选到的海洋细菌 *B. coagulans* spp. *heishijiaosis* (LU-B02) 抗真菌活性物质对细菌没有抑制效果,而对专一性抑制真菌,特别是抑制白色念珠菌细胞壁合成,相对于多烯类或唑类药物,开发为体内用药将对人体的毒副作用较小,且该物质碱性水溶性的特点使其进入机体内更易于被吸收利用,发挥抗真菌效果。由于白色念珠菌是目前真菌感染中最常见、危害最严重的 1 种致病菌,鉴于 LU-B02 活性物质的上述优点,若研制成抗真菌药物或制成微生态制剂,则对于人体微生态平衡的破坏较小,以其研制开发为控制白色念珠菌等真菌感染的药物具有良好应用前景。

### 参考文献

- [1] Fromtling R A. L-733560 and related compounds: novel pneumocandin antifungal agents[J]. *Drug Future*, 2008, 10: 933-938.
- [2] Tafi A, Anastassopoulou J, Theophanides T, et al. Molecular modeling of azole antifungal agents bioactive against candida albicans. A comparative molecular field analysis study[J]. *J Med Chem*, 2011, 6:1227-1233.
- [3] Yoshida M, Ezaki M, Hsshimoto M, et al. A novel antifungal antibiotics, FR-900848[J]. *J Antibiotics*, 2009, 7:

748-754.

- [4] Lampen J O, Arnow P M, Safferman R S. Mechanism of protection by sterol against polyene antibiotics[J]. *J Bacteriol*, 2008, 80:200-205.
- [5] Naito T, Hata K, Tsuruoda A. ER-30346 triazole antifungal[J]. *Drug Future*, 2011,1: 20-24.
- [6] Rex J H, Rinaldi M G, Pfaller M A. Resistance of candida species to fluconazole[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 1:1-8.
- [7] Walsh T J, Lee J W, Kelley P, et al. The antifungal effects of the nonlinear pharmacokinetics of cilofungin, a 1,3  $\beta$ -glucan synthetase inhibitor, during continuous and intermittent intravenous infusions cilofungin in treatment of experimental disseminated candidiasis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 35:1321-1327.
- [8] 刘全永,杨铭,王书锦. 海洋分离的抗白念菌芽孢杆菌及其系统鉴定[J]. *微生物学杂志*, 2014, 6:53-58.
- [9] 刘全永,胡江春,薛德林,等. 海洋微生物生物活性物质研究[J]. *应用生态学报*, 2002, 13(7): 901-905.
- [10] 刘全永,胡江春,薛德林,等. 海洋细菌 LU-B02 生物活性物质发酵条件及理化性质研究[J]. *微生物学杂志*, 2001, 1: 10-13.
- [11] Ghannoum M A, Rice L B. Antifungal Agents; Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance[J]. *Clin Microbiol*, 2008, 4: 501-511.
- [12] Pfaller M A, Wenzel P. The impact of changing epidemiology of fungi infections in the 2000s[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 11: 287-293.