

【生命与健康 / Life and Health】

一株红树林来源放线菌的抗菌活性物质

张骏梁, 史蔷, 吴昊, 张萌, 徐颖

深圳大学生命与海洋科学学院, 深圳市海洋生物资源与生态环境重点实验室, 深圳市海洋藻类生物开发与应用工程实验室,
广东深圳 518071

摘要: 红树林沉积物微生物资源丰富, 是新型天然产物以及药物先导化合物的重要来源之一. 为获得具有新颖结构的微生物次级代谢产物, 以活性为导向对红树林来源菌株进行筛选, 对表现出抗细菌、生物膜和真菌活性的 GP3T5 (*Streptomyces* sp.) 菌株的次级代谢产物进行研究. 通过萃取、C18 反相硅胶柱层析、Sephadex LH20 凝胶柱层析和制备高效液相色谱, 从菌株发酵液中分离出 3 种化合物, 分别记为化合物 1、2 和 3. 利用高分辨电喷雾质谱、核磁共振波谱和紫外光谱等技术, 鉴定化合物 1、2 和 3 依次为 pyrisulfoxin A、collismycin A 和 echinomycin A. 对化合物 1、2 和 3 进行活性评价, 结果表明, 3 种化合物均有不同程度的抗菌和抗生物膜活性. 其中, 化合物 3 的抗菌活性最好, 对食源性病原菌有很好的抗菌活性, 对单增李斯特菌和无乳链球菌的最小抑菌质量浓度均为 0.06 $\mu\text{g/mL}$. 化合物 1、2 和 3 对鲍曼不动杆菌的最小生物膜抑制质量浓度分别为 32、16 和 1 $\mu\text{g/mL}$. 化合物 2 和 3 具有良好的抗植物病原真菌活性, 化合物 2 的半数抑制质量浓度 $\text{IC}_{50} \leq 10 \mu\text{g/mL}$, 化合物 3 的 $\text{IC}_{50} \leq 1 \mu\text{g/mL}$. 以上红树林来源菌株 GP3T5 的研究结果可为深入挖掘红树林土壤微生物生物活性物质提供参考.

关键词: 天然产物; 红树林放线菌; 链霉菌; 次级代谢产物; 抗菌; 抗生物膜; 抗食源性细菌; 抗植物致病真菌

中图分类号: Q939.9

文献标志码: A

DOI: 10.3724/SP.J.1249.2024.03358

Antimicrobial compounds of an actinomycete derived from mangrove sediments

ZHANG Junliang, SHI Qiang, WU Hao, ZHANG Meng, and XU Ying

College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen Key Laboratory of Marine Bioresource and Eco-Environmental Science, Shenzhen Engineering Laboratory for Marine Algal Biotechnology, Shenzhen University, Shenzhen 518071, Guangdong Province, P. R. China

Abstract: Mangrove-derived microorganism is a promising and important resource of novel natural products and lead compounds for drug discovery. This study aimed to find microbial secondary metabolites with novel structures. Based on the bioactive-guided screening of mangrove-derived actinomycetes, *Streptomyces* sp. GP3T5 was studied owing to its antibacterial, antibiofilm and anti-fungi activities. Three compounds (1-3) were isolated from the fermentation broth by organic solvent extraction, reversed-phase chromatography, Sephadex LH20 gel chromatography, and preparative high-performance liquid chromatography. Their structures were identified as pyrisulfoxin A (compound 1), collismycin A (compound 2), and echinomycin A (compound 3), respectively, via high resolution electrospray ionization mass spectroscopy (HRESIMS), nuclear magnetic resonance (NMR), ultraviolet

Received: 2023-04-25; **Accepted:** 2023-09-27; **Online (CNKI):** 2023-11-27

Foundation: National Key Research and Development Project of China (2018YFA0902500); Shenzhen Basic Research Foundation (JCYJ20210324093409025)

Corresponding author: Professor XU Ying (boxuying@szu.edu.cn)

Citation: ZHANG Junliang, SHI Qiang, WU Hao, et al. Antimicrobial compounds of an actinomycete derived from mangrove sediments [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2024, 41(3): 358-366. (in Chinese)



(UV) spectroscopy. The activity evaluation of compounds 1-3 revealed that all three compounds showed antibacterial and antibiofilm activities. Compound 3 showed potent antibacterial activity against foodborne pathogens with minimum inhibitory concentrations (ρ_{MIC}) of 0.06 $\mu\text{g/mL}$ for *Listeria monocytogenes* and *Streptococcus agalactiae*. The minimum biofilm inhibitory concentrations (ρ_{MBIC}) of compounds 1-3 against *Acinetobacter baumannii* were 32 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, and 1 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Compounds 2 and 3 showed good antifungal activity against plant pathogenic fungi, with half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) ≤ 10 $\mu\text{g/mL}$ and ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$, respectively. In conclusion, these results on strain GP3T5 derived from mangroves provide valuable insights for further exploration of bioactive compounds from mangrove soil microorganisms.

Key words: natural products; mangrove derived actinomycetes; *Streptomyces*; secondary metabolites; antibacterial; antibiofilm; anti-foodborne pathogens; anti-plant pathogenic fungi

红树林湿地通常分布于亚热带和热带的海岸边缘, 红树林植物生长于其中泥泞及松软的土壤上, 由于长期受到周期性海水浸润, 具有沼泽化、盐渍化的红树林土壤有较强的酸性, 其pH值通常介于3~7^[1-2]. 正因如此, 红树林土壤集中了海洋和陆地间丰富多样的微生物, 在红树林微生物群落中, 细菌和真菌占91%, 远高于藻类(7%)和原生动物(2%)^[3]. 红树林微生物群落已经成为天然产物分离提取、探究其生物合成途径的宝地. 据统计, 截至2021年, 已从红树林沉积物来源微生物中分离出500多种天然产物和活性物质, 其中200多种来自细菌, 300多种来自真菌^[4]. 在红树林沉积物来源的细菌中, 放线菌尤其是链霉菌属是天然产物的主要来源^[4].

本课题组一直从事红树林微生物来源天然产物的研究, 建立了丰富多样的红树林来源菌种库, 如强效抗污损化合物butenolide^[5], 广谱抗革兰氏阴性菌生物膜的化合物maipomycin A^[6]. 课题组以生物活性为导向, 对多株菌株进行活性筛选, 发现了1株来源于红树林植物根系沉积物的GP3T5(*Streptomyces* sp.)菌株, 该菌株的发酵粗提物具有抗细菌、抗生物膜和抗真菌活性. 本研究将对该GP3T5菌株的次级代谢产物进行深入研究, 分离并鉴定次级代谢产物结构, 评价相关化合物的抗菌和抗生物膜活性.

1 材料与方法

1.1 实验设备和材料

实验所用仪器主要有: 高效液相色谱仪 Waters e2695 和制备级液相色谱仪 2545 均购自美国沃特世公司; 配备分析型色谱柱 Luna C18(内径4.6 mm, 长度250 mm, 填料粒径5 μm)、制备型色谱柱

Luna C18(内径21.2 mm, 长度250 mm, 填料粒径5 μm) 均购自美国Phenomenex公司; 液相串联高分辨质谱仪 Triple TOF 6600 购自 AB SCIEX; 600 M 超低温核磁共振谱仪 AVANCE III 购自德国 Bruker 公司; 落地式高速冷冻离心机 Lynx4000 购自 Thermo Fisher 公司; 旋转蒸发仪 Hei-VAP Precision ML/HB/G3 购自 Heidolph; Sephadex LH-20 购自瑞典 Pharmacia Biotech 公司; 十八烷基硅烷键合硅胶填料(C18反相硅胶)购自广州菲罗门公司; 色谱甲醇和乙腈购自上海麦克林公司, 实验中其他试剂均为分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 菌株发酵

① 将红树林沉积物来源的菌株 GP3T5 采用 MS 培养基(黄豆粉20 g/L, D-甘露醇20 g/L, 碳酸钙3 g/L)平板活化, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养3 d后接种到甘露醇-黄豆粉(mannitol soya, MS)孢子斜面培养基(黄豆粉20 g/L, D-甘露醇20 g/L, 碳酸钙3 g/L)上; ② 接种后于28 $^{\circ}\text{C}$ 培养3 d, 将长满菌株的孢子斜面接种于改良的S1种子培养基中(葡萄糖10 g/L, 玉米淀粉10 g/L, 黄豆粉10 g/L, 硫酸铵2 g/L, 玉米浆干粉5 g/L), 在摇床(28 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min)中培养1 d; ③ 将种子培养基以5%(体积分数)接种量接于改良的SGTYP培养基(可溶性淀粉5 g/L, 葡萄糖5 g/L, 微生物蛋白胨1 g/L, 胰蛋白胨1 g/L, 酵母提取物1 g/L, 人工海盐17 g/L, L-色氨酸0.1 g/L, L-缬氨酸0.1 g/L)中, 摇床(28 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min)中培养8 d.

1.2.2 化合物的分离和纯化

取培养好的菌株 GP3T5 发酵液约10 L 离心(8×10^3 r/min, 10 min)得上清液, 经等体积乙酸乙酯萃取3遍, 使用旋转蒸发仪浓缩后得到约1.1 g粗提物. 另外, 使用乙醇对菌体提取3次, 合并提取液浓缩得到约2.5 g粗提物. 将两部分粗提

物合并,干法上样至 C18 反相硅胶柱,用体积分数为 20%~100% 的乙醇水溶液洗脱,分别将乙醇体积分数为 30%、50% 和 80% 的流份单独浓缩,将 3 个流份分别用 Sephadex LH-20 凝胶柱层析进一步纯化(流份 1 和 2 用甲醇洗脱,流份 3 用氯仿洗脱),最后用制备高效液相色谱分离纯化,得到的纯化合物分别记作化合物 1(保留时间为 12.1 min, 4.8 mg)、化合物 2(保留时间为 18.5 min, 4.8 mg) 和化合物 3(保留时间为 27.3 min, 62.9 mg)。

制备液相色谱使用色谱柱 Luna C18,流动相为水和乙腈。梯度洗脱步骤如下:0~15 min,乙腈体积分数为 10%~30%;15~40 min,乙腈体积分数为 30%~100%;40~45 min,乙腈体积分数为 100%;45~46 min,乙腈体积分数为 100%~10%;46~50 min,乙腈体积分数为 10%。

1.2.3 化合物生物活性测试

抗菌活性测定:参照临床和实验室标准协会(clinical and laboratory standards institute, CLSI)的药敏试验执行标准 M07-A9 和 M45-A,采用微量稀释法,用 96 微孔板测定化合物的最小抑菌质量浓度(minimum inhibitory concentration, MIC; 记作 ρ_{MIC}),同时参照文献[7]的方法测定最小杀菌质量浓度(minimum bactericidal concentration, MBC; 记作 ρ_{MBC})。革兰氏阳性菌使用万古霉素(vancomycin, Van)为阳性对照,革兰氏阴性菌使用多黏菌素 E(polymyxin E, PE)为阳性对照。

抗细菌生物膜活性测定:参照文献[5]的方法,使用 24 孔板测试化合物抑制生物膜形成或清除成熟生物膜活性,最小生物膜抑制质量浓度(minimum biofilm inhibitory concentration, MBIC)定义为抑制生物膜形成量占比超过 75% 时化合物的最小质量浓度,记作 ρ_{MBIC} 。使用结晶紫(crystal violet, CV)染色法测定生物膜形成量,用噻唑蓝(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT)染色法测定生物膜中细胞的活力,最小生物膜清除质量浓度(minimum biofilm eradication concentration, MBEC)定义为化合物清除成熟生物膜生物量占比超过 50% 时化合物的最小质量浓度,记作 ρ_{MBEC} 。

抗植物致病真菌活性测定:参照文献[8]的方法,用粗提物经过分段分离的流份进行初筛,流份浓缩后用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)定容至 50 mg/mL。初筛时使用打孔法测定抑制率,左

右孔加入待测样品,上下孔加入溶剂,对照组的孔内均加入溶剂。抑制率 I 为

$$I = \left(1 - \frac{d_1 - r}{d_0 - r}\right) \times 100\% \quad (1)$$

其中, d_1 为实验组左右两孔间菌落直径,单位: mm; d_0 为对照组左右两孔间菌落直径,单位: mm; $r = 5$ mm, 为平板中央放置的霉菌菌丝块直径。将初筛活性较好的流份进一步分离纯化,得到纯化合物,制备含化合物的平板(直径 6 cm)测定抑制率。

活性测试用的致病细菌:金黄色葡萄球菌(Methicillin-sensitive *Staphylococcus Aureus*, MSSA) ATCC 25923、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) ATCC 29212、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*) ATCC 35667、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) ATCC 43300、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) ATCC 12228、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) ATCC 13813、单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) ATCC 19115、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 27853、大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) ATCC 25922、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*) CMCC 50335、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*) ATCC 19606、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) ATCC 13813、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*) CMCC 31002、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*) ATCC 13883 和副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC 17802。植物病原真菌:炭疽病菌(*Colletotrichum fructicola*)、灰霉病菌(*Botrytis cinerea* Pers)和稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)。

2 结果与讨论

本研究从红树林来源放线菌 GP3T5 发酵产物中分离出 3 种化合物,经鉴定分别为 pyrisulfoxin A(化合物 1)、collismycin A(化合物 2)、echinomycin A(化合物 3),对应结构如图 1 所示。抗菌活性筛选发现化合物 1、2 和 3 抗菌活性多样,具有抗致病细菌、真菌和细菌生物膜形成活性。其中,化合物 3 为首次报道具有抗食源性病原菌活性;化合物 2 和 3 为首次报道具有抗植物病原真菌活性。

2.1 结构鉴定

化合物 1(4.8 mg)为白色粉末,基于 HRESIMS

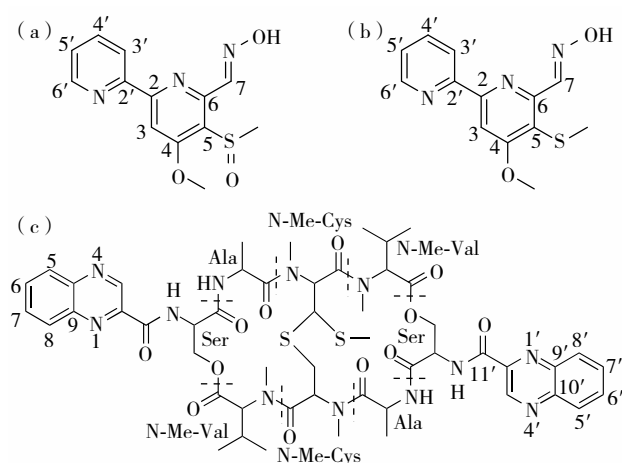


图1 分离到的化合物结构式 (a)化合物1(pyrisulfoxin A);(b)化合物2(collismycin A);(c)化合物3(echinomycin A)

Fig. 1 The chemical structures of isolated compounds. (a) Compound 1 (pyrisulfoxin A), (b) compound 2 (collismycin A), and (c) compound 3 (echinomycin A).

数据, 分子式为 $C_{13}H_{13}N_3O_3S([M+H]^+)$, 质荷比 (mass-to-charge ratio, m/z) = 292. 075 7, $C_{13}H_{14}N_3O_3S$ 理论相对分子质量为 292. 075 6), 不饱和度为 9. 紫外光谱分析显示, 化合物 1 在波长为 199、240 和 282 nm 处有最大吸收值, 其紫外吸收与已知化合物 caerulomycin A 相似^[9]. 化合物 1 的核磁共振氢谱 (hydrogen nuclear magnetic resonance, ^1H NMR), DMSO- d_6 , 600 MHz, 化学位移 δ_H 分别为 11. 94 (1H, s, N-OH)、8. 82 (1H, s, H-7)、8. 74 (1H, ddd, 耦合常数 J 分别为 4. 8、1. 8 和 0. 9 Hz, H-6')、8. 41 (1H, ddd, J 分别为 7. 9、1. 1 和 1. 1 Hz, H-3')、8. 08 (1H, s, H-3)、8. 00 (1H, ddd, J 分别为 7. 8、7. 7 和 1. 8 Hz, H-4')、7. 54 (1H, ddd, J 分别为 7. 5、4. 8 和 1. 2 Hz, H-5')、4. 07 (3H, s, O-CH₃)、3. 02 (3H, s, S-CH₃); 化合物 1 的核磁共振碳谱 (carbon nuclear magnetic resonance, ^{13}C NMR), DMSO- d_6 , 150 MHz, δ_C 分别为 164. 9 (C, C-4)、158. 4 (C, C-2)、153. 9 (C, C-2')、150. 6 (C, C-6)、149. 4 (CH, C-6')、145. 9 (C, C-7)、137. 6 (CH, C-4')、127. 8 (C, C-5)、125. 2 (CH, C-5')、121. 2 (CH, C-3')、103. 6 (CH, C-3)、56. 7 (O-CH₃) 和 39. 4 (S-CH₃). 经过 Scifinder 数据库 (<http://scifinder.cas.org>) 查询和参考文献 [10], 可判断化合物 1 为已知化合物 pyrisulfoxin A.

化合物 2 (4. 8 mg) 为白色粉末, 基于高分辨电喷雾电离质谱 (high resolution electrospray ionization mass spectroscopy, HRESIMS) 数据, 分子式为

$C_{13}H_{13}N_3O_2S([M+H]^+)$, m/z = 276. 080 2, $C_{13}H_{14}N_3O_2S$ 理论相对分子质量为 276. 080 7), 不饱和度为 9, 紫外光谱分析显示, 化合物 2 在 247、240 和 262 nm 有最大吸收值, 其紫外吸收与已知化合物 caerulomycin A^[9] 相似. 化合物 2 的 ^1H NMR 数据 (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_H 分别为 11. 75 (1H, s, N-OH), 8. 73 (1H, s, H-7), 8. 72 (1H, ddd, J = 4. 8, 2. 0, 1. 2 Hz, H-6'), 8. 41 (1H, ddd, J = 8. 0, 1. 1, 1. 1 Hz, H-3'), 8. 03 (1H, s, H-3), 7. 99 (1H, ddd, J = 7. 8, 7. 7, 1. 8 Hz, H-4'), 7. 51 (1H, ddd, J = 7. 5, 4. 8, 1. 2 Hz, H-5'), 4. 07 (3H, s, O-CH₃), 2. 35 (3H, s, S-CH₃). 化合物 2 的 ^{13}C NMR 数据 (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_C 分别为 166. 9 (C, C-4)、155. 7 (C, C-2)、154. 3 (C, C-2')、152. 6 (C, C-6)、149. 1 (C, C-6')、146. 7 (C, C-7)、137. 6 (C, C-4')、124. 8 (C, C-5')、121. 2 (C, C-5)、120. 9 (C, C-3')、103. 0 (C, C-3)、56. 4 (O-CH₃) 和 17. 8 (S-CH₃). 与化合物 1 相比, 化合物 2 结构上 5 号碳由亚砷基变成甲硫基, 少了 1 个氧原子. 经 Scifinder 数据库 (<http://scifinder.cas.org>) 和参考文献 [11] 查询排重, 可以判断化合物 2 为已知化合物 collismycin A.

化合物 3 (62 mg) 为白色粉末, 基于 HRESIMS 数据, 分子式为 $C_{51}H_{64}N_{12}O_{12}S_2([M+H]^+)$, m/z = 1 101. 431 7, $C_{51}H_{65}N_{12}O_{12}S_2$ 理论相对分子质量为 1 101. 428 6), 不饱和度为 26, 紫外光谱分析显示, 化合物 3 在 243 nm 和 322 nm 有最大吸收值. 化合物 3 的 ^1H NMR 数据 (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_H 分别为 9. 55 (1H, s, H-3/3')、9. 54 (1H, s, H-3/3')、8. 76 (1H, d, J = 6. 4 Hz, Ser-NH)、8. 53 (1H, d, J = 7. 9 Hz, Ser-NH)、8. 16 (1H, d, J = 8. 4 Hz, H-7/7')、8. 11 (1H, d, J = 8. 4 Hz, H-7/7')、7. 77 ~ 7. 55 (6H, m, H-5/6/8 和 H-5'/6'/8')、7. 06 (1H, d, J = 7. 3 Hz, Ala-NH)、6. 98 (1H, d, J = 7. 4 Hz, Ala-NH)、6. 48 (1H, d, J = 8. 6 Hz, N-Me-Cys- α -CH)、6. 11 (1H, d, J = 10. 7 Hz, N-Me-Cys- α -CH)、5. 17 (1H, d, J = 10. 2 Hz, N-Me-Val- α -CH)、5. 12 (1H, d, J = 10. 0 Hz, N-Me-Val- α -CH)、5. 00 ~ 4. 89 (3H, m, Ser- α -CH/ Ala- α -CH/ N-Me-Cys-SCH₃)、4. 85 ~ 4. 79 (2H, m, Ser- α -CH/ Ala- α -CH)、4. 75 ~ 4. 61 (4H, m, Ser- β -CH₂)、3. 42 (1H, dd, J = 16. 2, 2. 1 Hz, SCH₂)、3. 18 (3H, s, N-Me-Val-N-CH₃)、3. 11 (3H, s, N-Me-Val-N-CH₃)、3. 00 (3H, s, N-Me-Cys-N-CH₃)、2. 98 (3H, s, N-Me-Cys-N-CH₃)、2. 86

(1H, dd, $J = 16.1, 11.0$ Hz, N-Me-Cys-SCH₂)、2.35 ~ 2.29 (1H, m, N-Me-Val-βCH)、2.26 (1H, m, N-Me-Val-βCH)、2.07 (3H, s, N-Me-Cys-SCH₃)、1.41 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, Ala-β-CH₃)、1.38 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, Ala-β-CH₃)、1.06 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, N-Me-Val-γCH₃)、1.05 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, N-Me-Val-γCH₃)和0.89 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, N-Me-Val-γCH₃)和0.86 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, N-Me-Val-γCH₃)。化合物3的¹³CNMR数据(DMSO-*d*₆, 150 MHz)δ_c分别为144.0和143.9(C-2/2'), 143.5和143.5(C-3/3'), 132.0和131.9(C-5/5'), 129.6和129.6(C-6/6'), 129.2和129.1(C-7/7'), 130.9和130.8(C-8/8'), 139.9和139.8(C-9/9'), 142.3和142.2(C-10/10'), 163.9和163.8(C-11/11'); 53.4和52.2(Ser-αCH), 64.9和64.6(Ser-βCH₂), 167.6和167.3(Ser-CO); 46.6和46.2(Ala-αCH), 18.1和16.9(Ala-β-CH₃), 173.5和173.3(Ala-CO); 59.9和53.5(N-Me-Cys-α-CH), 27.2(N-Me-Cys-SCH₂), 51.7(N-Me-Cys-SCH₃), 15.2(N-Me-Cys-S-CH₃), 171.1和168.9(N-Me-Cys-CO); 62.7和61.9(N-Me-Val-αCH), 27.8和27.7(N-Me-Val-βCH), 20.4、20.4、19.1和18.8(N-Me-Val-γCH₃), 31.6和31.0(N-Me-Val-N-CH₃), 170.9和

170.2(N-Me-Val-N-CO)。

经过数据库和参考文献[12-13]查询、排重,可以判断化合物3为已知化合物echinomycin A,该化合物为对称的环肽结构,通过喹啉、丝氨酸(Ser)、丙氨酸(Ala)、N-甲基半胱氨酸(N-Me-Cys)和N-甲基缬氨酸(N-Me-Val)缩合呈链状,最终形成环肽。

2.2 抗菌活性评价

对化合物1、2和3进行最小质量浓度抑菌活性测试,供试菌为2株革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 和 43300)和3株革兰氏阴性菌(大肠杆菌、铜绿假单胞菌以及鲍曼不动杆菌)。结果显示,化合物1仅对金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)具有一定的抗菌活性,ρ_{MIC} = 64.00 μg/mL,对测试的3株革兰氏阴性菌没有抗菌活性;化合物2对金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 和鲍曼不动杆菌(ATCC 19606)的ρ_{MIC}均为32.00 μg/mL,对金黄色葡萄球菌 ATCC 43300 的ρ_{MIC} = 64.00 μg/mL;化合物3不仅对金黄色葡萄球菌有很强的抗菌活性(ρ_{MIC} = 0.06 μg/mL,远低于多黏菌素),还对大肠杆菌和鲍曼不动杆菌具有较好的抗菌活性,ρ_{MIC}分别为2.00 μg/mL和4.00 μg/mL(表1)。

表1 化合物1、2和3最小抑菌质量浓度的测定
Table 1 Minimum inhibitory concentration of compound 1-3

测试菌株	化合物1	化合物2	化合物3	Van	PE
MSSA ATCC 25923	64.00	32.00	0.06	1.00	
MRSA ATCC 43300	> 128.00	64.00	0.06	1.00	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 128.00	> 128.00	2.00		0.25
铜绿假单胞菌 ATCC 27853	> 128.00	> 128.00	> 128.00		0.50
鲍曼不动杆菌 ATCC 19606	> 128.00	32.00	4.00		1.00

对化合物3进行多菌株MIC测试结果显示,化合物3对革兰氏阳性菌具有很强的抗菌活性,对MSSA ATCC 25923、MRSA ATCC 43300、粪肠球菌 ATCC 29212、单增李斯特菌 ATCC 19115、无乳链球菌 ATCC 13813 的ρ_{MIC}均为0.06 μg/mL;对屎肠球菌 ATCC 35667 ρ_{MIC} = 0.50 μg/mL;对表皮葡萄球菌 ATCC 12228 ρ_{MIC} = 0.25 μg/mL;对肺炎链球菌 CMCC 31002 ρ_{MIC} = 0.13 μg/mL;对大肠杆菌 ATCC 25922 和鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 的ρ_{MIC}均为2.00 μg/mL;对副溶血性弧菌 ATCC 17802 的ρ_{MIC} = 4.00 μg/mL;对肺炎克雷伯菌

ATCC 13883 和肠炎沙门氏菌 CMCC 50335 的ρ_{MIC}均为8.00 μg/mL。值得注意的是,化合物3对测试的四株食源性病原菌同样具备良好的抗菌活性,尤其是对单增李斯特菌 ATCC 19115 和无乳链球菌 ATCC 13813 的抗菌活性,ρ_{MIC}均达到了0.06 μg/mL,远小于万古霉素(表2),在作为食品天然来源抗菌剂上具有很大的应用潜力。

根据MIC结果,对化合物3进行最小杀菌质量浓度测试。表2结果显示,化合物3对革兰氏阳性菌的杀菌活性较好,对表皮葡萄球菌 ATCC 12228、屎肠球菌 ATCC 35667 和鲍曼不动杆菌 ATCC 19606

的 ρ_{MBC} 均为2.00 $\mu\text{g/mL}$;尤其对食源性病原菌单增李斯特菌 ATCC 19115 和无乳链球菌 ATCC 13813 的杀菌活性较强, ρ_{MBC} 分别为1.00 $\mu\text{g/mL}$ 和0.06 $\mu\text{g/mL}$;对肺炎克雷伯菌 ATCC 13883 和肠炎沙门氏菌 CMCC 50335 不具有杀菌活性.

表2 化合物3最小抑菌和杀菌质量浓度的测定
Table2 Minimum inhibitory and bactericidal concentration of compound 3

测试菌株	ρ_{MIC}			ρ_{MBC}
	化合物3	Van	PE	化合物3
MSSA ATCC 25923	0.06	1.00		4.00
MRSA ATCC 43300	0.06	1.00		4.00
表皮葡萄球菌 ATCC 12228	0.25	1.00		2.00
粪肠球菌 ATCC 29212	0.06	2.00		1.00
屎肠球菌 ATCC 35667	0.50	0.50		2.00
肺炎链球菌 CMCC 31002	0.13	1.00		> 4.00
单增李斯特菌 ATCC 13818	0.06	1.00		1.00
无乳链球菌 ATCC 12228	0.06	0.25		0.06
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2.00		0.25	8.00
鲍曼不动杆菌 ATCC 19606	2.00		0.25	2.00
肺炎克雷伯菌 ATCC 13883	8.00		8.00	> 128.00
肠炎沙门氏菌 CMCC 50335	8.00		0.50	> 128.00
副溶血性弧菌 ATCC 17802	4.00		1.00	8.00

化合物3对铜绿假单胞菌 ATCC 27853 不具有抗菌活性, $\rho_{\text{MIC}} > 1\,024\,\mu\text{g/mL}$ (表3),而当化合物3与质量浓度为32 $\mu\text{g/mL}$ 的苯丙氨酸-精氨酸- β -萘胺(Phe-Arg- β -naphthylamide, PA β N)外排泵抑制剂^[14]

联用时,能够增效化合物3抗铜绿假单胞菌 ATCC 27853 的活性,使得 ρ_{MIC} 和 ρ_{MBC} 值分为8 $\mu\text{g/mL}$ 和32 $\mu\text{g/mL}$, 分级抑制浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI) $F = 0.039$, 具有很强的增效作用(表3). 说明化合物3对铜绿假单胞菌的抗菌活性较弱,可能是铜绿假单胞菌的外排泵机制导致的耐药.

FICI是评价两种化合物联用测定 ρ_{MIC} 时相互作用的指标. $F < 0.5$ 时为协同作用; F 值为0.5 ~ 1.0 时为相加作用; F 值为1.0 ~ 2.0 时为无关作用; $F > 2.0$ 时为拮抗作用. 化合物A与B联用时 F 为

$$F = \frac{\rho_{\text{MICA}}(\text{联})}{\rho_{\text{MICA}}(\text{单})} + \frac{\rho_{\text{MICB}}(\text{联})}{\rho_{\text{MICB}}(\text{单})}$$
 (2)

表3 PA β N增效化合物3抗铜绿假单胞菌 ATCC 27853
Table 3 PA β N increased the efficacies against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 of compound 3

化合物种类	$\rho_{\text{MIC}}(\text{单}) / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\rho_{\text{MIC}}(\text{联}) / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\rho_{\text{MBC}}(\text{联}) / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	F
化合物3	> 1 024	8	32	0.039
PA β N	1 024	32	32	

2.3 抗生物膜活性评价

对化合物1、2和3进行生物膜活性测试,图2结果显示,化合物3对鲍曼不动杆菌生物膜的形成有较强的抑制作用, $\rho_{\text{MBC}} = 1\,\mu\text{g/mL}$; 化合物1和化合物2的 ρ_{MBC} 分别为32 $\mu\text{g/mL}$ 和16 $\mu\text{g/mL}$.

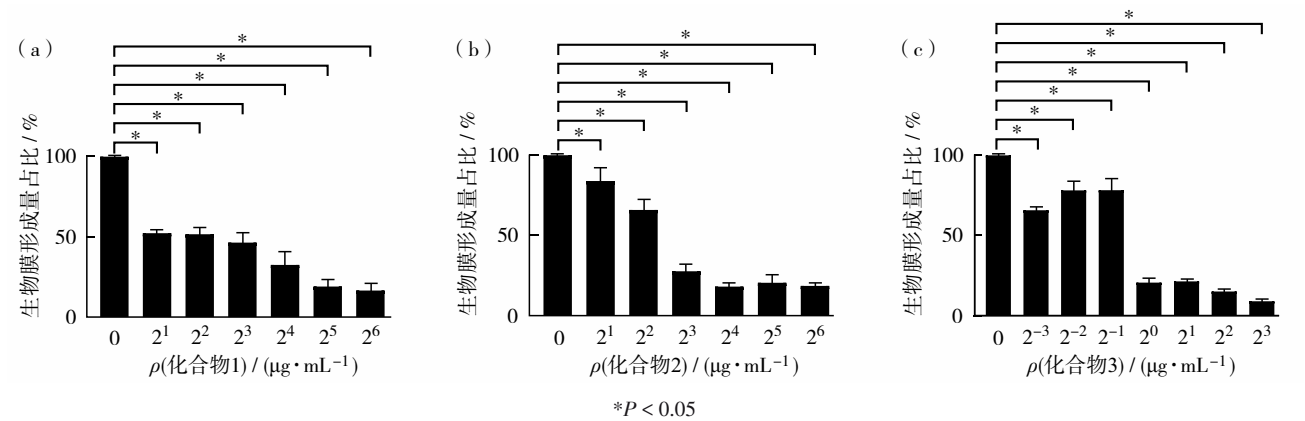


图2 化合物对鲍曼不动杆菌生物膜形成的抑制 (a)化合物1;(b)化合物2;(c)化合物3
Fig. 2 Inhibitory activity of the compounds on *A. baumannii* biofilm formation. (a) Compound 1, (b) compound 2, and (c) compound 3.

2.4 清除细菌生物膜活性试验

对化合物3进行清除生物膜活性实验,结果显示化合物3对MRSA具有活性, ρ_{MBEC} 为1 $\mu\text{g/mL}$ (图

3(a)), 但需要较高质量浓度(4 $\mu\text{g/mL}$)才能抑制生物膜中细胞的活力(图3(b)). 化合物3虽然对鲍曼不动杆菌(ATCC 19606)具有较好的抗菌和杀菌活

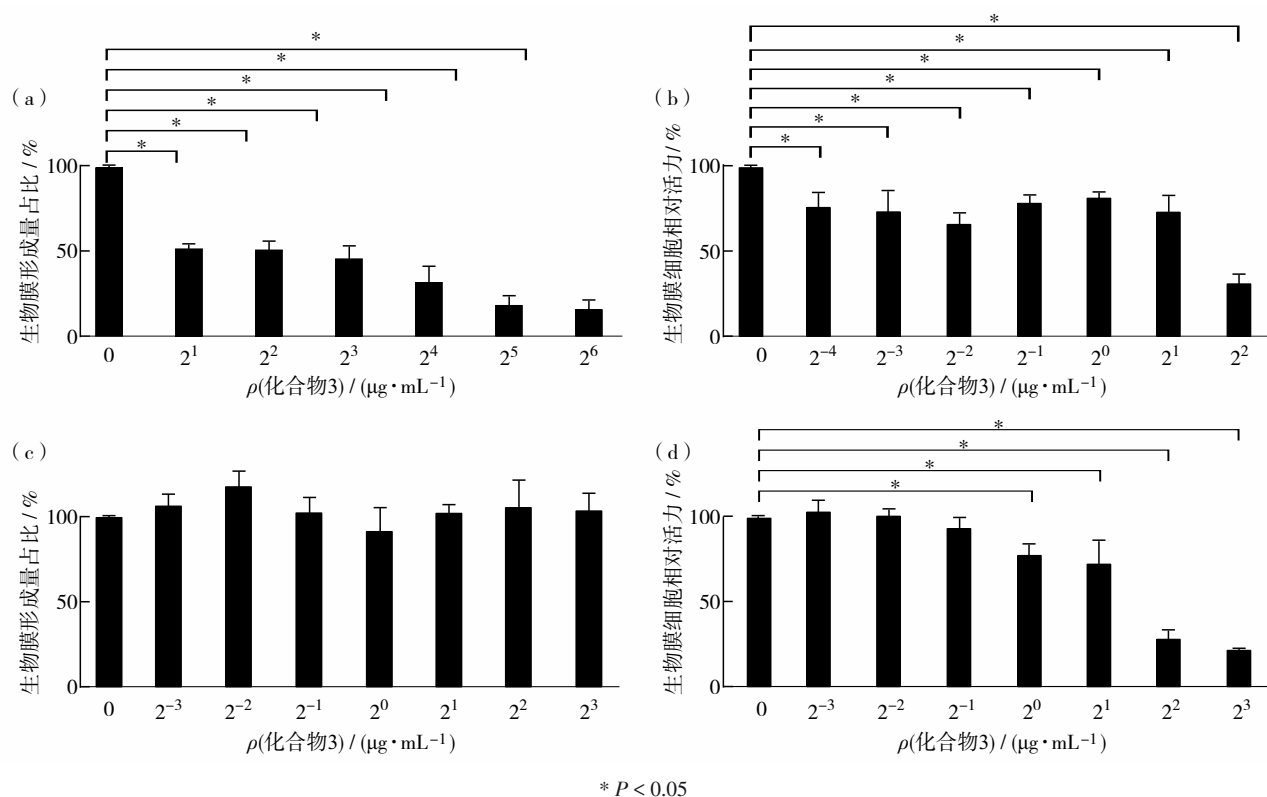


图3 化合物3对MRSA和鲍曼不动杆菌生物膜的清除作用 (a)使用CV染色测试化合物3清除MRSA成熟生物膜; (b)使用MTT染色测试化合物3清除MRSA成熟生; (c)使用CV染色测试化合物3清除鲍曼不动杆菌成熟生物膜; (d)使用MTT染色测试化合物3清除鲍曼不动杆菌成熟生物膜

Fig. 3 Biofilm eradication activity of compound 3 on MRSA and *A. baumannii*. (a) and (b) represent the CV and MTT stain results of compound 3 on eradicating MRSA biofilm with a series of concentrations. (c) and (d) represent the CV and MTT stain results of compound 3 on eradicating MRSA biofilm with a series of concentrations.

性, 但不具有清除鲍曼不动杆菌生物膜活性(图3(c)). 通过MTT染色法发现, 当化合物3质量浓度为 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 鲍曼不动杆菌生物膜中的细胞活力已经降低至30%以下(图3(d)). 说明尽管化合物3不能清除成熟的鲍曼不动杆菌生物膜, 使其生物膜形成量降低, 但可能通过杀死生物膜中的部分细菌, 导致生物膜的细胞活力下降.

2.5 抑制植物病原真菌活性试验

在活性初筛时, 使用经过初步分离、主成分分别为3个化合物的流份进行活性试验, 结果显示, 含有化合物2和3的流份均对炭疽病菌、灰霉病菌和稻瘟病菌有一定的抑制作用(图4). 各流份对炭疽病菌抑制率分别约6%、64%和63%, 对灰霉病菌抑制率分别约6%、50%和52%, 对稻瘟病菌抑制率分别约1%、81%和54%.

设置质量浓度梯度对化合物2和3进行活性复筛. 结果显示, 化合物2对炭疽病菌、灰霉病菌和稻瘟病菌的半数抑制质量浓度(median inhibition concentration) IC_{50} 分别为 < 30 、 < 40 和 $< 30 \mu\text{g}/\text{mL}$;

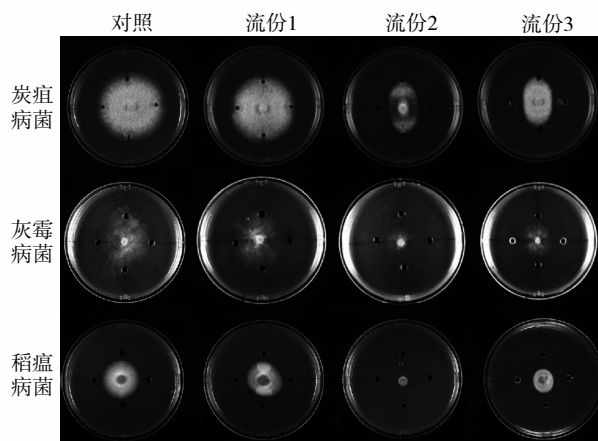


图4 以化合物1、2和3为主成分的流份1~3抗植物病原真菌的抗菌活性

Fig. 4 The anti-plant pathogenic fungi activity of the predominant components 1-3 in fractions 1-3.

化合物3对植物病原真菌的活性较好, 对炭疽病菌、灰霉病菌和稻瘟病菌的 IC_{50} 均为 $< 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ (图5). 其中, 化合物2对炭疽病菌和灰霉病菌的抗菌活性随着化合物质量浓度升高而提高, 而当化合物

质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时,对稻瘟病菌的抗菌活性达到峰值,随后抗菌活性下降;化合物 3 对灰霉病菌和稻瘟病菌的抗菌活性随着化合物质量浓度升高而逐渐提高,对炭疽病菌的抗菌活性较为稳定(图 5)。

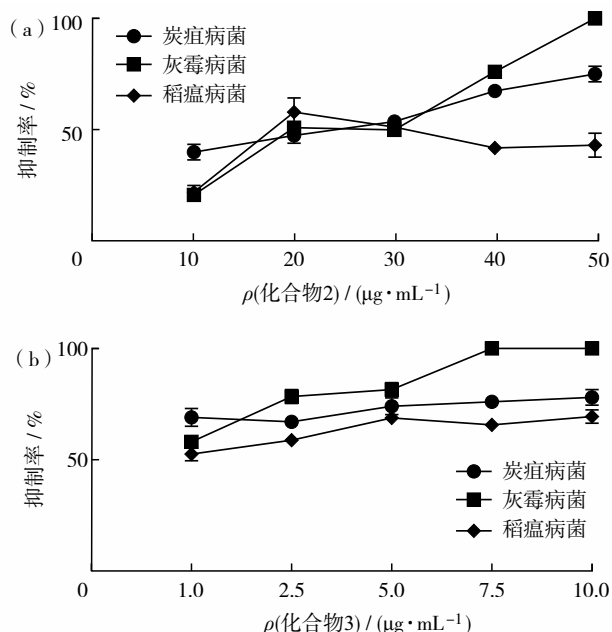


图5 化合物抗病原真菌的活性 (a)化合物2对3种病原真菌抑制;(b)化合物3对3种病原真菌抑制

Fig. 5 The anti-plant pathogenic fungi activity of compounds.

(a) and (b) represent the inhibition of the compound 2 and 3 on three kinds of anti-plant pathogenic fungi with a series of concentrations. Circle line indicates *Colletotrichum fructicola*, square line indicates *Botrytis cinerea* Pers., and diamond line indicates *Magnaporthe oryzae*.

3 结 论

中国红树林环境独特,其中微生物丰富且多样,是挖掘新型天然产物活性物质的重要宝库^[15]。放线菌是最为常见的药用微生物资源,是天然产物药物先导化合物的重要来源^[16-18]。本研究对红树林来源放线菌(*Streptomyces* sp.)GP3T5进行次级代谢产物的研究,利用多种分离纯化方法,从该菌株代谢产物中分离出3个单体化合物(分别记作化合物1、化合物2和化合物3),经过高分辨质谱分析、NMR结构鉴定以及数据库检索,确定该3个化合物分别为pyrisulfoxin A(化合物1)、collismycin A(化合物2)和echinomycin A(化合物3),对应结构如图1。化合物1、2和3活性多样,文献报道具有抗菌、

抗肿瘤和免疫调节等活性^[19-22]。本研究对分离纯化的3个化合物进行深入的抗菌活性筛选发现,化合物3抗菌活性最好,尤其发现对食源性病原菌单增李斯特菌、无乳链球菌、肠炎沙门氏菌和副溶血弧菌也有很好的抗菌活性,扩展了化合物3的抗菌谱。研究还发现,化合物1、2和3具有抑制鲍曼不动杆菌生物膜形成活性,化合物3还可能较好地抑制鲍曼不动杆菌成熟生物膜中细胞的活力。另外,化合物2和3均为首次报道具有抗植物病原真菌活性,化合物3对炭疽病菌、灰霉病菌和稻瘟病菌的 IC_{50} 均 $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ 。综上,从红树林来源链霉菌(*Streptomyces* sp.)GP3T5的抗菌活性化合物,在天然来源食品防腐剂、天然来源植物抗菌剂上具有潜在的应用前景。

基金项目:国家重点研发计划资助项目(2019YFA0902500);深圳市基础研究计划资助项目(JCYJ20210324093409025)

作者简介:张骏梁(junliang_zhang90@hotmail.com),深圳大学副研究员、博士。研究方向:微生物药理学。

引 文:张骏梁,史蕾,吴昊,等.一株红树林来源放线菌的抗菌活性物质[J].深圳大学学报理工版,2024,41(3):358-366.

参考文献 / References:

- [1] KALASUBA K, MIRANTI M, RAHAYUNINGSIH S R, et al. Red Mangrove (*Rhizophora stylosa* Griff.): a review of its botany, phytochemistry, pharmacological activities, and prospects [J]. Plants, 2023, 12(11): 2196.
- [2] LI Ruili, YU Lingyun, CHAI Minwei, et al. The distribution, characteristics and ecological risks of microplastics in the mangroves of Southern China [J]. Science of the Total Environment, 2020, 708: 135025.
- [3] WAINWRIGHT B J, MILLAR T, BOWEN L, et al. The core mangrove microbiome reveals shared taxa potentially involved in nutrient cycling and promoting host survival [J]. Environmental Microbiome, 2023, 18(1): 47.
- [4] LI Kunlong, CHEN Siqiang, PANG Xiaoyan, et al. Natural products from mangrove sediments-derived microbes: structural diversity, bioactivities, biosynthesis, and total synthesis [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2022, 230: 114117.
- [5] XU Ying, HE Hongping, SCHULZ S, et al. Potent antifouling compounds produced by marine *Streptomyces* [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(4): 1331-1336.
- [6] ZHANG Junliang, LIANG Xiaoyan, ZHANG Shiling, et al. Maipomycin a, a novel natural compound with

- promising anti-biofilm activity against gram-negative pathogenic bacteria [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 11: 598024.
- [7] MARCHBANKS C R, YOST R L, WHITE R L. Cefotaxime stability during in vitro microbiological testing [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1987, 31(9): 1375-1378.
- [8] 王钰. 米埔红树林根系土壤微生物次级代谢产物对植物致病真菌活性的研究[D]. 深圳: 深圳大学, 2019.
- WANG Yu. Study on secondary metabolites of antifungal bacteria from mangrove rhizosphere, Mai Po, Hong Kong [D]. Shenzhen: Shenzhen University, 2019. (in Chinese)
- [9] FU Peng, WANG Shuxia, HONG Kui, et al. Cytotoxic bipyridines from the marine-derived actinomycete *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6 [J]. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(8): 1751-1756.
- [10] TSUGE N, FURIHATA K, SHIN-YA K, et al. Novel antibiotics pyrisulfoxin A and B produced by *Streptomyces californicus* [J]. *The Journal of Antibiotics*, 1999, 52(5): 505-507.
- [11] TRÉCOURT F, GERVAIS B, MONGIN O, et al. First syntheses of caerulomycin E and collismycins A and C. A new synthesis of caerulomycin A [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1998, 63(9): 2892-2897.
- [12] 匡岩巍. 放线菌 2215 ~ # 活性代谢产物的分离纯化鉴定及制备[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2006.
- KUANG Yanwei. Isolation, purification, identification and preparation of active metabolites from actinomycetes 2215~# [D]. Beijing: The Chinese People's Liberation Army Academy of Military Medical Sciences, 2006. (in Chinese)
- [13] SOCHA A M, LAPLANTE K L, RUSSELL D J, et al. Structure-activity studies of echinomycin antibiotics against drug-resistant and biofilm-forming *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19(5): 1504-1507.
- [14] SHIELDS R K, STELLFOX M E, KLINE E G, et al. Evolution of imipenem-relebactam resistance following treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2022, 75(4): 710-714.
- [15] 孙承航, 李飞娜, 蔡铮, 等. 1986—2016 年国家自然科学基金红树林及其药物研究领域资助概况[J]. *中国抗生素杂志*, 2017, 42(4): 269-276.
- SUN Chenghang, LI Feina, CAI Zheng, et al. Brief introduction of mangrove researches including drug discovery granted by National Natural Science Foundation of China from 1986 to 2016 [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2017, 42(4): 269-276. (in Chinese)
- [16] CHEN Senhua, CAI Runlin, LIU Zhaoming, et al. Secondary metabolites from mangrove-associated fungi: source, chemistry and bioactivities [J]. *Natural Product Reports*, 2022, 39(3): 560-595.
- [17] NGAMCHARUNGCHIT C, CHAIMUSIK N, PANBANG-RED W, et al. Bioactive metabolites from terrestrial and marine actinomycetes [J]. *Molecules*, 2023, 28(15): 5915.
- [18] 陈必婷, 吴炜城, 周董董, 等. 两株海南红树植物内生真菌的生物活性成分[J]. *深圳大学学报理工版*, 2022, 39(3): 245-252.
- CHEN Biting, WU Weicheng, ZHOU Dongdong, et al. Bioactive components of endophytic fungi from two Hainan mangrove plants [J]. *Journal of Shenzhen University Science and Engineering*, 2022, 39(3): 245-252. (in Chinese)
- [19] 梅显贵, 蓝萌萌, 金言正, 等. 天然来源的浅蓝霉素类化合物[J]. *中国海洋药物*, 2017, 36(5): 83-92.
- MEI Xiangui, LAN Mengmeng, JIN Yanzheng, et al. Natural caerulomycins and the analogues [J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2017, 36(5): 83-92. (in Chinese)
- [20] DU Yuqi, WANG Chen, CUI Guodong, et al. Cytotoxic and optically active pyrisulfoxins from the endophytic *Streptomyces albolongus* EA12432 [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2020, 8: 248.
- [21] TONG Lingying, SUN Weichao, WU Shiyong, et al. Characterization of caerulomycin A as a dual-targeting anticancer agent [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2022, 922: 174914.
- [22] CHEN Jungang, LIN Zhen, SONG Jiao, et al. Echinomycin as a promising therapeutic agent against KSHV-related malignancies [J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2023, 16(1): 48.

【中文责编: 晨兮; 英文责编: 艾琳】