

研究报告

枯草芽孢杆菌中 bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌的抑菌机理

唐海峰¹, 戴昀峰¹, 扶洋帆¹, 邹一明¹, 高占¹, 盘赛昆^{1,2}, 王文彬^{1,2},
杨杰^{*1,2}, 卞小莹^{*3}

1 江苏海洋大学江苏省海洋生物资源与环境重点实验室 江苏省海洋生物技术重点实验室,
江苏 连云港 222005

2 江苏海洋大学江苏海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222005

3 山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266237

唐海峰, 戴昀峰, 扶洋帆, 邹一明, 高占, 盘赛昆, 王文彬, 杨杰, 卞小莹. 枯草芽孢杆菌中 bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌的抑菌机理[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 419-432.

TANG Haifeng, DAI Yunfeng, FU Yangfan, ZOU Yiming, GAO Zhan, PAN Saikun, WANG Wenbin, YANG Jie, BIAN Xiaoying. Inhibitory mechanism of bacilosarcin B from *Bacillus subtilis* against *Photobacterium damsela*[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 419-432.

摘要:【背景】美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)是一种海洋条件致病菌, 能够引起多种海洋生物和人类疾病。因此, 探究美人鱼发光杆菌的生物防治技术具有重要意义。【目的】探究枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中 bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌的抑菌活性及其可能的抑菌机理。【方法】利用高效液相色谱法从枯草芽孢杆菌 fmb60 发酵液中制备 bacilosarcin B, 采用分光光度法测定 bacilosarcin B 对多种致病菌的最小抑菌浓度及其对美人鱼发光杆菌的时间-抑菌曲线。测定 bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌生物被膜、胞外核酸、蛋白质和胞内碱性磷酸酶含量的影响, 结合荧光显微镜、扫描电镜和透射电镜检测美人鱼发光杆菌细胞膜通透性和细胞壁完整性, 并研究 bacilosarcin B 对细菌运动能力和胞内 DNA 的作用。【结果】Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌最小抑菌浓度为 8 µg/mL。抑菌机理研究表明 bacilosarcin B 通过破坏细菌细胞壁和细胞膜的完整性使细胞膜通透性增强, 造成细胞内成分渗出。此外, bacilosarcin B 还可与胞内 DNA 结合, 且结合方式与溴化乙锭(ethidium bromide, EB)插入 DNA 结构类似。【结论】Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌具有显著的抑菌效果, 具有研发成新型抑菌剂的潜力, 对海洋养殖业的健康发展具有一定的意义。

关键词: bacilosarcin B; 美人鱼发光杆菌; 细胞膜; 抑菌机理

资助项目: 国家自然科学基金青年项目(32100037); 中国博士后科学基金面上项目(2019M661767); 江苏省高等学校自然科学基金面上项目(20KJB550008); 2023 年江苏高校“青蓝工程”资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China Youth Project (32100037), the China Postdoctoral Science Foundation (2019M661767), the Natural Science Research General Project of Jiangsu Province Higher Education Institutions (20KJB550008), and the Jiangsu Provincial University “Blue Project”.

*Corresponding authors. E-mail: YANG Jie, yangjie@jou.edu.cn; BIAN Xiaoying, bianxiaoying@sdu.edu.cn

Received: 2023-09-11; Accepted: 2023-10-11; Published online: 2023-11-02

Inhibitory mechanism of bacilosarcin B from *Bacillus subtilis* against *Photobacterium damsela*

TANG Haifeng¹, DAI Yunfeng¹, FU Yangfan¹, ZOU Yiming¹, GAO Zhan¹, PAN Saikun^{1,2}, WANG Wenbin^{1,2}, YANG Jie^{*1,2}, BIAN Xiaoying^{*3}

1 Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu, China

2 Jiangsu Marine Biological Industry Technology Collaborative Innovation Centre, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu, China

3 State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China

Abstract: [Background] The marine pathogenic bacterium, *Photobacterium damsela*, causes various diseases in marine organisms and humans. Therefore, it is of great significance to investigate the approaches for the biocontrol of *P. damsela*. [Objective] To investigate the activity and mechanism of bacilosarcin B from *Bacillus subtilis* in inhibiting *P. damsela*. [Methods] Bacilosarcin B was prepared from the fermentation broth of *B. subtilis* fmb60 by high-performance liquid chromatography. The minimum inhibitory concentration of bacilosarcin B against various pathogenic bacteria and the time-kill curve against *P. damsela* were determined using a spectrophotometer. The impacts of bacilosarcin B on the biofilm, extracellular nucleic acids, proteins, and intracellular alkaline phosphatase content of *P. damsela* were assessed. Fluorescence microscope, scanning electron microscope, and transmission electron microscope were employed to examine the cell membrane permeability and cell wall integrity of *P. damsela*. Finally, the effects of bacilosarcin B on bacterial motility and intracellular DNA were studied. [Results] The minimum inhibitory concentration of bacilosarcin B against *P. damsela* was 8 µg/mL. Bacilosarcin B disrupted the integrity of bacterial cell walls and cell membranes and increased membrane permeability to cause the leakage of cellular components. Additionally, it bound to intracellular DNA by the manner similar to the insertion of ethidium bromide into DNA. [Conclusion] Bacilosarcin B exhibits a significant inhibitory effect on *P. damsela* and has the potential to be developed as a novel antibacterial agent, which is of significance for the healthy development of marine aquaculture.

Keywords: bacilosarcin B; *Photobacterium damsela*; cell membrane; antibacterial mechanism

美人鱼发光杆菌作为一种致病性海洋弧菌, 在银鲳^[1]、舌鳎^[2]和脊尾白对虾^[3]等海洋生物中陆续被报道。该菌可引起鱼类表皮溃疡, 还可导致细菌性败血症^[4]。2017年5月, 浙江省三门县一养殖场发生拟穴青蟹感染美人鱼发光杆菌的大规模死亡事件, 给养殖厂带来了严重的经济损失^[5]。此外, 美人鱼发光杆菌还可在人体中引起

机会性感染, 如果受伤的皮肤暴露于海水或海岸环境中感染该细菌后就会造成坏死性筋膜炎, 严重者甚至死亡^[6-7]。因此, 对美人鱼发光杆菌的防治显得尤为重要。

枯草芽孢杆菌是一般公认安全的微生物 (generally recognized as safe, GRAS)^[8]。在漫长的进化过程中, 枯草芽孢杆菌为了应对各种环境胁

迫形成了丰富的遗传多样性,其基因组上 4%–5% 的基因被预测与天然活性物质的合成相关^[9],能够产生多种抗菌物质,在水产养殖领域中应用广泛^[10–11]。其中, bacilosarcin B 是 2008 年 Azumi 等^[12]从枯草芽孢杆菌 TP-B0611 发现的一种 amicoumacins 类抗生素,其结构中含有天然产物中罕见的 2-羟基吗啉环。Bacilosarcin B 对金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌和荧光假单胞菌具有良好的抑制作用,尤其对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)为 3.13 $\mu\text{g/mL}$ ^[13]。然而有关 bacilosarcin B 在水产养殖病害菌的防治和抑菌机理的研究鲜见相关报道,这限制了 bacilosarcin B 的深入研究和应用。

Yang 等从枯草芽孢杆菌 fmb60 发酵液中分离鉴定出 bacilosarcin B^[14]。本研究以海洋病原菌美人鱼发光杆菌为抑制对象,测试 bacilosarcin B 对其生长的影响,并探究 bacilosarcin B 对其细胞膜通透性、细胞壁完整性,以及菌体细胞形态、运动能力和对 DNA 的作用等指标,初步探讨 bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌的作用机理,以期 bacilosarcin B 在海洋病害菌的防治奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

枯草芽孢杆菌 fmb60、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) CICC 23656、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) CICC 23828、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) CICC 21618、美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*) MCCC 1A00223、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*) MCCC 1A00232、坎氏弧菌

(*Vibrio campbellii*) MCCC 1A02605、腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*) ATCC 49138 和大肠杆菌(*Escherichia coli*) CICC 10003 均保藏于江苏海洋大学海洋食品与生物工程学院实验室。

1.1.2 培养基和主要试剂、仪器

TSB 培养基、BPY 培养基、MHB 培养基、PBS 和碘化丙啶,北京索莱宝科技有限公司;Landy 培养基,北京酷来搏科技有限公司;色谱级甲醇、色谱级乙腈, Sigma-Aldrich 公司; C18 柱填料,北京元宝山色谱科技有限公司;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)试剂盒和细菌 DNA 抽提试剂盒,南京建成生物工程研究所;溴化乙锭(ethidium bromide, EB)和 swimming 培养基,生工生物工程(上海)股份有限公司;环氧树脂、醋酸铀和柠檬酸铅,上海麦克林生化科技股份有限公司。

全波长酶标仪、多功能酶标仪、高效液相色谱仪、扫描电镜、透射电镜和超微量分光光度计, Thermo Fisher Scientific 公司; 色谱柱 HC-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、色谱柱 EC-C18 (Poroshell 120, 2.1 mm×50 mm, 2.7 μm)、液相色谱-G6500 系列四极杆-飞行时间质谱联用仪和半制备型高效液相色谱, Agilent 公司; 高速冷冻型微量离心机, Labgic 公司; 荧光显微镜, Olympus 公司; 超声破碎仪, 无锡罡正科技有限公司; 离子溅射仪, 广州竞赢化工科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Bacilosarcin B 的制备

Bacilosarcin B 的制备方法参照 Yang 等^[14]的方法并略加改进。挑取一环枯草芽孢杆菌 fmb60 单菌落转入 BPY 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 8 h 作为种子液, 以 3% 的接种量转接至 10 L 的 Landy 培养基中, 33 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 发酵 72 h, 8 000 r/min 离心 15 min, 上清液用盐酸调节至

pH 2.0, 在 4 °C 静置过夜后 8 000 r/min 离心 15 min 去除沉淀物。用氢氧化钠将上清液调至 pH 7.0 后, 用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次。然后, 收集有机相并在 45 °C 真空浓缩至干, 获得棕黄色粗品溶解于 10 mL 甲醇中, 用 0.22 μ m 滤膜过滤后, 采用 C18 反相层析技术, 上样量 2 mL, 用 30% 甲醇-水溶液 200 mL 和 60% 甲醇-水溶液 300 mL 进行分级洗脱。收集 60% 甲醇-水洗脱液, 用液相色谱仪进行检测, 分析条件为: 色谱柱: HC-C18; 进样量: 20 μ L; 检测波长: 201、247 和 314 nm; 流速: 0.8 mL/min; 流动相: A 相为超纯水, B 相为色谱级乙腈; 流动相变化梯度: 0–60 min, B 相: 10%–90%。

将收集到的 amicoumacins 类抗生素浓缩至 2 mL, 利用液相色谱-G6500 系列四极杆-飞行时间质谱联用仪进行鉴定, 分析条件为: 色谱柱: EC-C18 (Poroshell 120); 进样量: 10 μ L; 检测波长: 210 nm; 流速: 0.8 mL/min; 流动相: A 相为超纯水, B 相为色谱级乙腈; 流动相变化梯度: 0–60 min, B 相: 10%–90%; 离子源: 电喷雾电离(electrospray ionization, ESI); 扫描方式: 正离子扫描; Q-TOF 参数: 自动调谐; 碰撞电压: 275 V; 干燥器: 12 L/min 氮气; 雾化温度: 300 °C; 雾化器压力: 50 psi。确定化合物 bacilosarcin B 用半制备型高效液相色谱进行纯化。

1.2.2 Bacilosarcin B 对 8 种病原菌活性评价

将上述方法制备的 bacilosarcin B 溶解于 0.01 mmol/L 的 PBS 缓冲液, 配制成 1 024 μ g/mL 的标准母液, 在 96 孔细胞培养板中对 bacilosarcin B 母液进行二倍倍比稀释^[15], 使其加入菌液后终浓度分别为 128、64、32、16、8、4、2 和 1 μ g/mL。28 °C 恒温培养 24 h 后用酶标仪在波长 600 nm 处测量各组吸光值, 以菌液浓度不变的微孔中 bacilosarcin B 的最低浓度为对该指示菌的最小抑菌浓度。

1.2.3 Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌生长的影响

Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌生长影响的测定参照黄运红等^[16]方法并略加改进。将美人鱼发光杆菌菌悬液浓度调至 OD_{600} 为 0.4, 分别加入终浓度为 0、1/2×MIC、1×MIC 和 2×MIC 的 bacilosarcin B。置于全波长酶标仪中 28 °C 恒温培养 30 h, 每隔 1 h 测定菌悬液在波长为 600 nm 的吸光值。

1.2.4 Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌成熟生物被膜的影响

Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌成熟生物被膜影响的测定参照周青青等^[17]方法并略加改进。取稀释至 OD_{600} 为 0.4 的美人鱼发光杆菌菌悬液添加到 96 孔细胞培养板中, 于 28 °C 恒温培养 24 h 形成成熟的生物膜, 用 PBS 清洗除去孔里游离的菌体。分别加入终浓度为 1/2×MIC、1×MIC 和 2×MIC 的 bacilosarcin B, 以等体积的 PBS 作为阳性对照。将培养板于 28 °C 孵育 24 h 后用 PBS 除去多余的 bacilosarcin B。经甲醇固定 15 min 弃去甲醇。生物被膜用 0.1% 的结晶紫染色 20 min 后洗去多余的结晶紫, 晾干后添加 33% 的冰醋酸溶解残留的染液, 通过全波长酶标仪测定波长为 600 nm 的吸光值。根据公式 $Y(\%) = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$ 计算清除率, 其中 A_0 和 A_s 分别为对照组和处理组的吸光值。

1.2.5 Bacilosarcin B 类抗生素对美人鱼发光杆菌核酸和蛋白泄漏的测定

美人鱼发光杆菌菌体用 PBS 配制成 OD_{600} 为 0.4 的菌悬液, 分别加入终浓度为 0、1/2×MIC、1×MIC 和 2×MIC 的 bacilosarcin B, 28 °C 恒温孵育 2 h 后 6 000 r/min 离心 5 min 取上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤。采用紫外分光光度计测定核酸(OD_{260})和蛋白质(OD_{280})的含量^[18]。

1.2.6 Bacilosarcin B 对胞内碱性磷酸酶含量的影响

Bacilosarcin B 对胞内碱性磷酸酶(alkaline

phosphatase, AKP)含量测定参照 Sun 等^[19]方法并略加改进,在 PBS 重悬的菌液中分别加入终浓度为 0、1/2×MIC、1×MIC 和 2×MIC 的 bacilosarcin B。28 °C 恒温孵育 6 h 后于 6 000 r/min 离心 5 min 弃上清收集菌体,用 PBS 洗涤 3 次。菌悬液用超声破碎仪在冰水浴中破碎菌体(功率为 400 W,每次超声时间为 3 s,间隔 8 s,破碎时间共为 2 min)。采用分光光度计测定经超声破碎后菌悬液中的 AKP 活力。

1.2.7 荧光显微镜观察细胞膜的破坏程度

荧光显微镜观察细胞膜破坏程度的方法参考 Mei 等^[20]的方法并略加改进。在 PBS 重悬的菌液中分别加入终浓度为 0、1/2×MIC、1×MIC 和 2×MIC 的 bacilosarcin B。置于 28 °C 分别孵育 1 h 和 3 h 后,加入终浓度为 5 µg/mL 的碘化丙啶,28 °C 避光孵育 20 min,用 PBS 去除菌悬液中多余的染料。在避光条件下取 10 µL 菌悬液均匀涂至干净的载玻片并晾干,在荧光显微镜下观察碘化丙啶的嵌入情况。

1.2.8 Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌形态的影响

在 PBS 重悬的菌液中加入终浓度为 2×MIC 的 bacilosarcin B,对照组加入等体积的 PBS 缓冲液,置于 28 °C 恒温孵育 2 h 后用 PBS 除去剩余的 bacilosarcin B。在 2.5%戊二醛的电镜固定液中 4 °C 固定过夜。

扫描电镜观察:用 PBS 清洗 3 次后,用 30%→50%→70%→80%→90%→100%→100% 的乙醇梯度脱水,用叔丁醇置换 3 次,待样品干燥后用离子溅射仪给样品镀金处理,通过扫描电镜观察细胞的形态。

透射电镜观察:用 PBS 清洗 3 次后加入 1% 的四氧化锇固定,再用乙醇梯度脱水,每梯度处理 20 min。然后进行环氧树脂渗透后包埋,超薄切片,用醋酸铀和柠檬酸铅双染色,通过透射电镜观察细胞形态。

1.2.9 软琼脂平板法测定美人鱼发光杆菌运动能力

美人鱼发光杆菌运动能力测定参照霍卫萍等^[21]的方法加以改进。将 swimming 培养基冷却至 45 °C 后添加不同浓度的 bacilosarcin B,使培养基内的 bacilosarcin B 终浓度分别为 0、1/2×MIC、1×MIC 和 2×MIC。滴加 2 µL 美人鱼发光杆菌菌液至冷却后的 swimming 平板上,分别于 28 °C 静置培养 12 h 后测量菌落直径。

1.2.10 Bacilosarcin B 与美人鱼发光杆菌双/单链 DNA 相互作用的荧光光谱分析

采用细菌 DNA 抽提试剂盒提取美人鱼发光杆菌双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA),随后将双链 DNA 溶液置于 95 °C 水浴孵育 15 min 迅速冷却得到单链 DNA (single-strand DNA, ssDNA)溶液^[22]。采用超微量分光光度计将双/单链 DNA 浓度稀释至 200 µg/mL。同时配制浓度为 200 µg/mL 的 EB 溶液。在 96 孔细胞培养板中加入 50 µL 的 DNA,然后分别加入 40、50、100、150 和 200 µL 的 EB 溶液,37 °C 避光孵育 10 min 后,用多功能酶标仪测定样品在激发波长 535 nm 和发射波长 550–800 nm 范围内的荧光光谱,确定 DNA 和 EB 结合的浓度^[23]。

Bacilosarcin B 与 EB 竞争结合 DNA:在 96 孔细胞培养板中加入 50 µL 的 DNA 溶液和 150 µL 的 EB 溶液,混匀后置于 37 °C 避光孵育 10 min。处理组中分别添加终浓度为 0、1/2×MIC、1×MIC 和 2×MIC 的 bacilosarcin B,对照组加入等体积缓冲液,混匀之后置于 37 °C 避光孵育 30 min。测定样品在激发波长 535 nm 及发射波长 550–800 nm 范围内的荧光光谱^[24]。

1.2.11 数据统计与分析

每组试验均重复 3 次,采用 IBM SPSS Statistics 27.0.1 和 Origin 2022 软件对数据分别进行显著性分析和图表的制作。

2 结果与分析

2.1 Bacilosarcin B 的制备结果

Amicoumacins 类抗生素液相分析、bacilosarcin B 正离子质谱和 bacilosarcin B 结构如图 1 所示, 枯草芽孢杆菌 fmb60 的发酵液经过 C18 反相层析技术纯化后, 用高效液相色谱检测 amicoumacins 类抗生素的保留时间主要集中在 22–35 min 时间段内, 各个峰的样品经液相色谱-G6500 系列四极杆-飞行时间质谱联用仪检

测分析得到一个质荷比为 494.249 8 的 $[M+H]^+$ 离子峰, 相对应的离子式准确元素组成为 $C_{24}H_{36}N_3O_8$, 经与文献[13]比对, 发现与化合物 bacilosarcin B 结构一致。随后利用半制备高效液相色谱对 bacilosarcin B 进行纯化。

2.2 Bacilosarcin B 对 8 种病原菌的最小抑菌浓度测定结果

Bacilosarcin B 对 8 种病原菌的最小抑菌浓度试验结果如表 1 所示, bacilosarcin B 对 *B.*

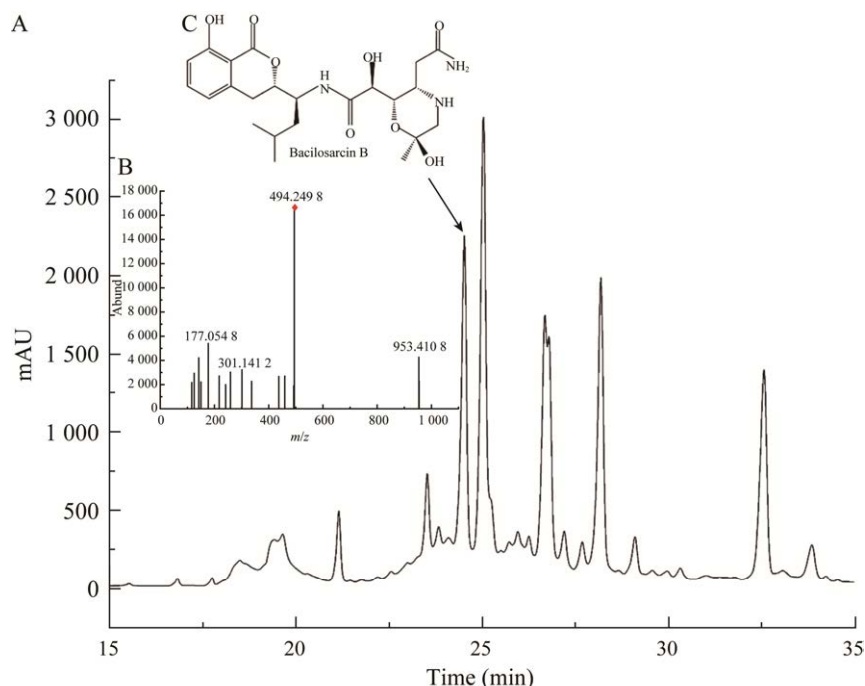


图 1 Amicoumacins 类抗生素液相分析图(A)、bacilosarcin B 正离子质谱图(B)和 bacilosarcin B 结构图(C)
Figure 1 Liquid phase analysis of amicoumacins antibiotics (A), bacilosarcin B positive ion mass spectrometry (B) and bacilosarcin B structure (C).

表 1 Bacilosarcin B 对 8 种病原菌的抑菌效果

Table 1 Inhibitory effect of bacilosarcin B on eight pathogenic bacteria.

Strains	Strain No.	Minimum inhibitory concentrations MICs ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CICC 21618	32
<i>Vibrio harveyi</i>	MCCC 1A00232	>128
<i>Vibrio campbellii</i>	MCCC 1A02605	>128
<i>Shewanella putrefaciens</i>	ATCC 49138	32
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	MCCC 1A00223	8
<i>Escherichia coli</i>	CICC 10003	>128
<i>Bacillus cereus</i>	CICC 23828	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	CICC 23656	2

cereus CICC 23828、*S. aureus* CICC 23656 均有较好的抑菌效果,而对 *V. harveyi* MCCC 1A00232、*V. campbellii* MCCC 1A02605 和 *E. coli* CICC 10003 无明显的抑菌效果。另外, bacilosarcin B 对 *P. damsela* MCCC 1A00223 的最小抑菌浓度为 $8\ \mu\text{g/mL}$,具有显著的抑制活性,表明 bacilosarcin B 在美人鱼发光杆菌防治方面具有良好的应用前景。

2.3 Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌生长的影响

Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌生长的影响如图 2 所示,结果表明加入终浓度为 0 的 bacilosarcin B 中美人鱼发光杆菌生长 1 h 后进入对数生长期,16 h 后开始进入稳定期;而浓度分别为 $1\times\text{MIC}$ 、 $2\times\text{MIC}$ 的 bacilosarcin B 可以完全抑制菌体生长,浓度为 $1/2\times\text{MIC}$ 的 bacilosarcin B 使菌体在前 8 h 生长受到完全抑制,从而导致对数生长期和稳定期延后,最终到达稳定期时,菌体浓度明显低于未加 bacilosarcin B 的菌体浓度,说明 bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌生长具有显著的抑制作用。

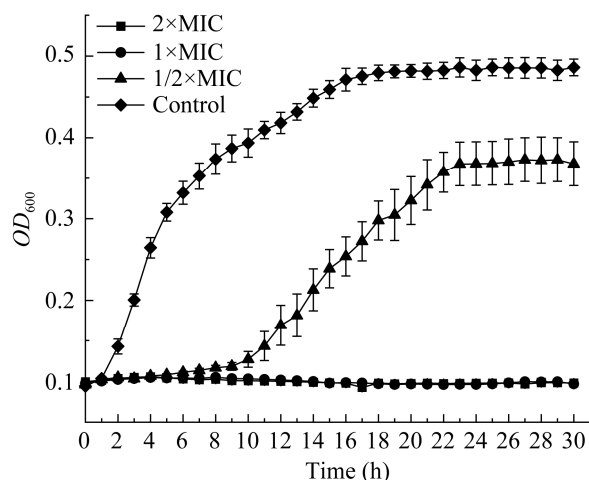


图 2 Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌生长曲线的影响

Figure 2 Effect of bacilosarcin B on the growth curve of *Photobacterium damsela*.

2.4 Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌成熟生物被膜的影响

结晶紫染色是检测生物被膜的经典方法,因此采用结晶紫染色法评估 bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌成熟生物被膜的清除作用。结果如图 3 所示,经 $1/2\times\text{MIC}$ 、 $1\times\text{MIC}$ 和 $2\times\text{MIC}$ 的 bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌成熟的生物被膜作用 24 h 后,清除率分别为 32.49%、47.88% 和 66.17%。结果表明 bacilosarcin B 具有清除成熟生物被膜的能力。

2.5 Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌核酸和蛋白泄漏的测定

通过测定细胞外上清液中核酸和蛋白质含量能反映出细菌细胞膜的完整性。结果如图 4 所示,经 $1/2\times\text{MIC}$ 、 $1\times\text{MIC}$ 和 $2\times\text{MIC}$ 的 bacilosarcin B 与美人鱼发光杆菌作用 2 h 后,

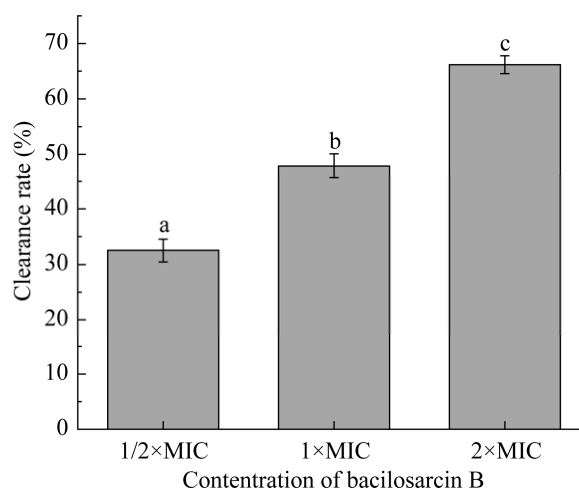


图 3 Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌成熟生物被膜的清除作用 不同小写字母表示不同浓度的 bacilosarcin B 处理美人鱼发光杆菌差异显著, $P<0.05$ 。下同

Figure 3 Scavenging effect of bacilosarcin B on mature biofilms of *Photobacterium damsela*. Different lowercase letters indicate significant differences between different concentrations of bacilosarcin B treatment of *Photobacterium damsela* ($P<0.05$). The same below.

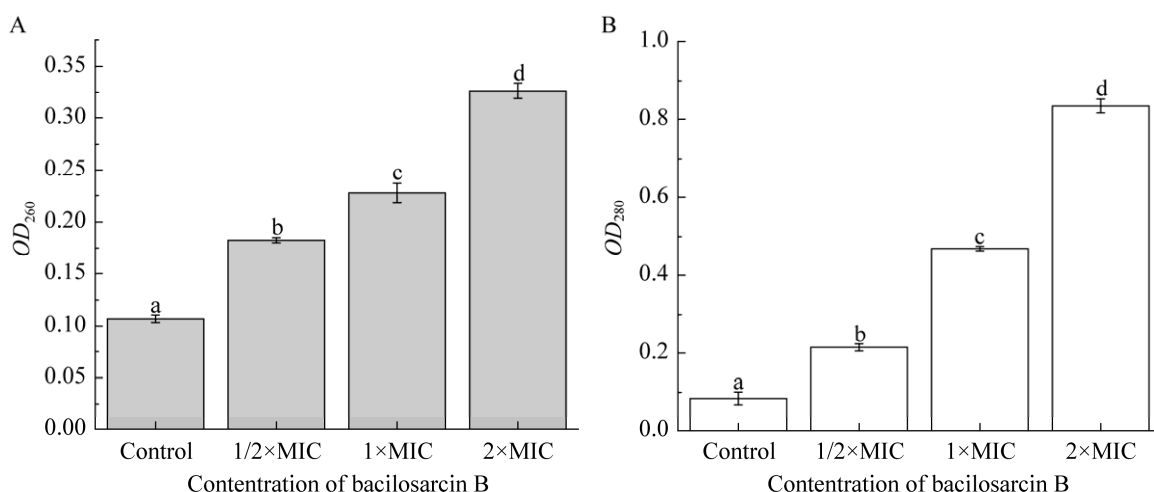


图4 Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌的核酸(A)和蛋白质泄漏(B)的影响

Figure 4 Effect of bacilosarcin B on nucleic acids (A) and protein leakage (B) of *Photobacterium damsela*.

其胞外蛋白和核酸含量较对照组显著增加,且与浓度呈正相关。结果表明 bacilosarcin B 作用于美人鱼发光杆菌可以引起生物大分子的外泄。

2.6 Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌细胞壁的影响

通过测定细胞内 AKP 含量的变化来反映细胞壁的受损程度。结果如图 5 所示,经 6 h 培养后,对照组 AKP 的含量有所增加,可能与美人鱼发光杆菌少量增殖有关。在 1/2×MIC、1×MIC 和 2×MIC 的 bacilosarcin B 处理 6 h 后胞外 AKP 含量明显降低,且 bacilosarcin B 的浓度与细胞内 AKP 含量呈负相关性。结果表明,Bacilosarcin B 能有效破坏美人鱼发光杆菌细胞壁,使细胞内 AKP 泄漏到细胞外。

2.7 荧光显微镜观察细胞膜的破坏程度

碘化丙啶能够嵌入双链 DNA 并释放红色荧光,因此可用碘化丙啶检测细胞膜的完整性。结果如图 6 所示,经过 1 h 和 3 h 培养后,对照组中美人鱼发光杆菌未发出明显的红色荧光,说明细菌细胞膜完好;而经 bacilosarcin B 处理后红色荧光的面积随 bacilosarcin B 含量的增加而明显增加,而且随时间增加,红色荧光面积逐渐增

多,表明 bacilosarcin B 能够使美人鱼发光杆菌细胞膜破损,并且这种破坏呈剂量依赖性。

2.8 Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌形态的影响

Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌形态的影响如图 7 所示,结果表明,未经处理的美人鱼发

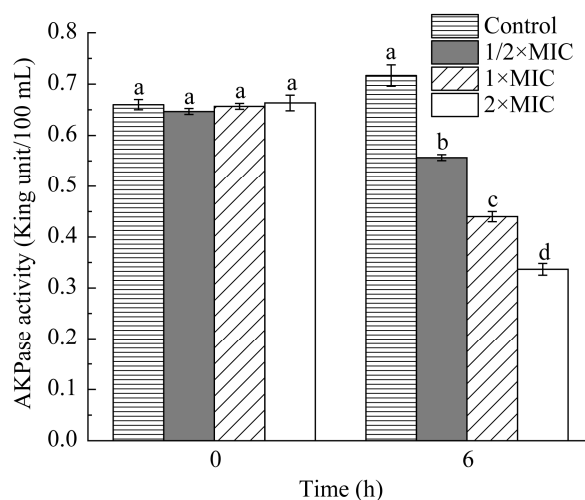


图5 Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌 AKP 泄漏的影响

Figure 5 Effect of bacilosarcin B on AKP leakage from *Photobacterium damsela*.

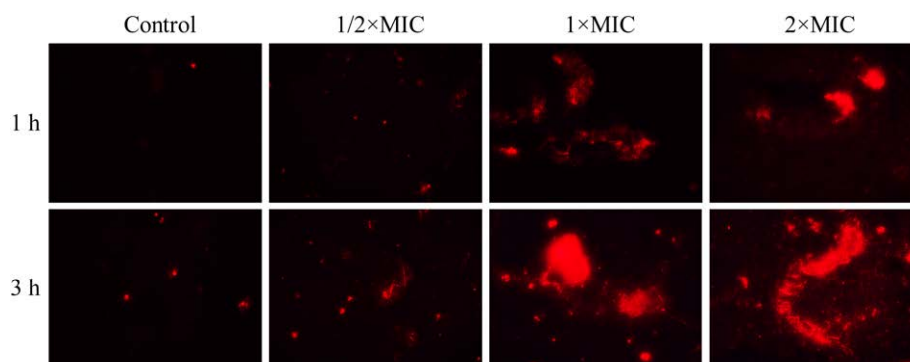


图 6 荧光显微镜观察 **bacilosarcin B** 对美人鱼发光杆菌细胞膜完整性的影响(40×)

Figure 6 Fluorescence microscopic observation of the effect of bacilosarcin B on the cell membrane integrity of *Photobacterium damsela* cells (40×).

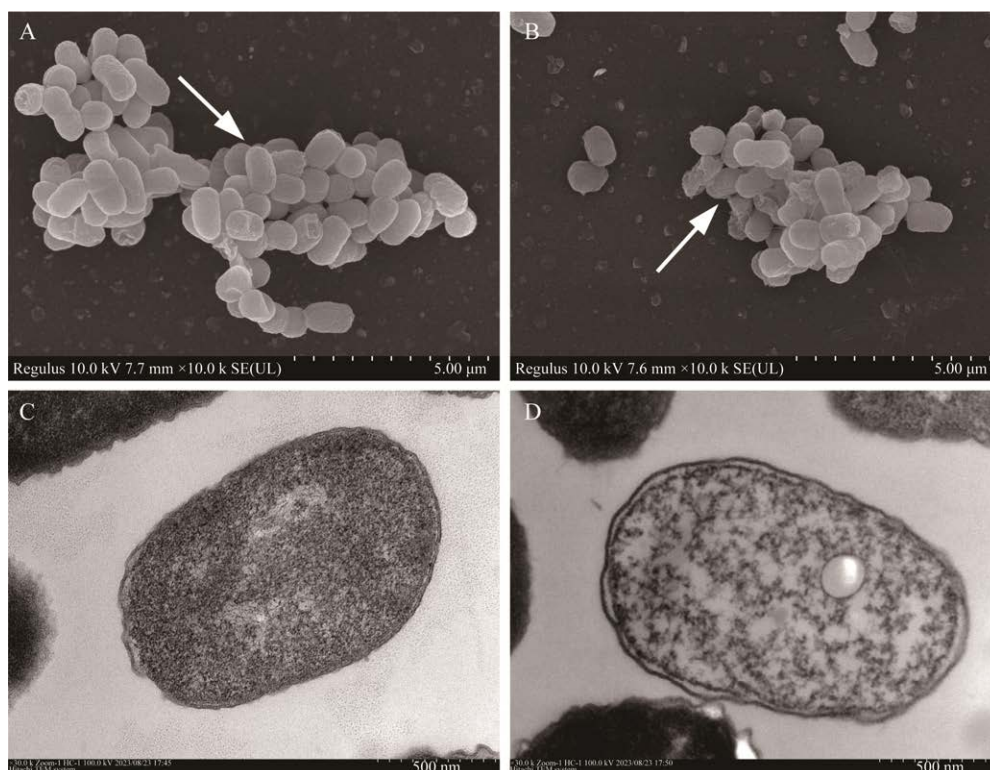


图 7 在扫描电镜和透射电镜下 **bacilosarcin B** 对美人鱼发光杆菌的细胞形态变化 A、B 分别为用 PBS、2×MIC 的 **bacilosarcin B** 处理 2 h 后美人鱼发光杆菌的扫描电镜图(箭头处为该条件下典型的细菌形态)。C、D 分别为用 PBS、2×MIC 的 **bacilosarcin B** 处理 2 h 后美人鱼发光杆菌的透射电镜图

Figure 7 Changes in cellular morphology of bacilosarcin B on *Photobacterium damsela* under scanning and transmission electron microscopes. A and B are scanning electron micrographs of *Photobacterium damsela* after 2 h treatment with PBS and 2×MIC of bacilosarcin B, respectively (typical bacterial morphology under these conditions is indicated by arrows). C and D are transmission electron micrographs of *Photobacterium damsela* after 2 h treatment with PBS and 2×MIC of bacilosarcin B, respectively.

光杆菌菌体饱满呈现典型的短杆状,细胞形态完整,内部组织致密;当用 $2\times\text{MIC}$ 的 bacilosarcin B 处理 2 h 后,许多菌体明显形变,表面破裂崩塌并出现不规则皱缩,失去细菌形态,同时菌体细胞质疏松,出现质壁分离的现象,细胞失去了基本结构。以上结果表明, bacilosarcin B 能够破坏美人鱼发光杆菌细胞的完整性,从而导致细菌死亡。这与上述细胞膜、细胞壁的完整性试验结果一致。

2.9 Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌运动能力的影响

菌体的运动能力受细菌鞭毛的介导,鞭毛运动在菌体初期黏附和生物被膜形成过程中发挥着重要作用^[25]。结果如图 8 所示,与对照组相比, $1/2\times\text{MIC}$ 、 $1\times\text{MIC}$ 和 $2\times\text{MIC}$ 浓度的 bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌在 swimming 培养基中的运动能力分别降低 24.15%、57.22%和 97.61%。表明随着 bacilosarcin B 浓度的增加,抑制美人鱼发光杆菌的运动能力越强。

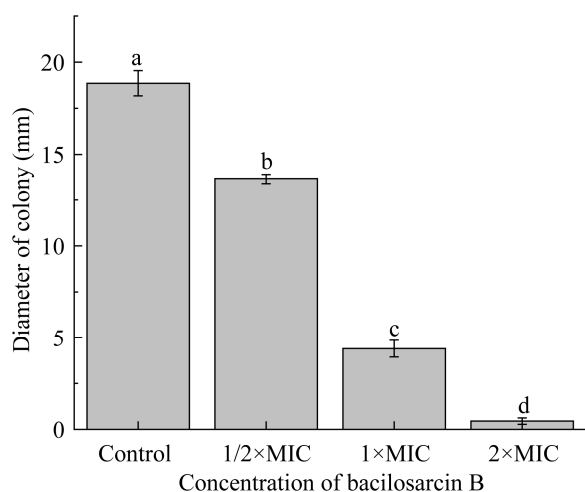


图 8 Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌运动能力的影响

Figure 8 Effect of bacilosarcin B on the motility of *Photobacterium damsela*.

2.10 Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌 DNA 的作用

DNA 是生物体内主要遗传物质,当抑菌物质通过细胞膜进入菌体内部后可能会与其进一步作用从而影响细菌生存^[26]。因此,美人鱼发光杆菌的 DNA 可能是 bacilosarcin B 作用靶点之一。

通过与 EB 竞争结合试验,探索 bacilosarcin B 是否能与美人鱼发光杆菌双/单链 DNA 的相互作用。如图 9A、9B 所示,EB 与双/单链 DNA 结合后荧光信号变强,且随着 EB 量的增加,信号强度逐渐变大。当 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的 EB 为 $150\text{ }\mu\text{L}$ 时,荧光强度不再增加,说明 EB 与双/单链 DNA 的结合已达到饱和。因此,选择 $150\text{ }\mu\text{L}$ 的 EB 与 bacilosarcin B 进行竞争结合美人鱼发光杆菌双/单链 DNA 的试验。如图 9C 所示,当 dsDNA 中加入 $1/2\times\text{MIC}$ 的 bacilosarcin B 后,荧光强度相较于对照组未发生明显变化,而当 bacilosarcin B 浓度达 $1\times\text{MIC}$ 和 $2\times\text{MIC}$ 时,荧光强度开始下降,这可能与 bacilosarcin B 嵌入到 DNA 分子沟槽有关。进一步向 ssDNA 溶液中加入不同浓度的 bacilosarcin B,结果如图 9D 所示,随着 bacilosarcin B 浓度的增加,荧光强度逐渐下降。表明 bacilosarcin B 取代了 EB-ssDNA 体系中的 EB,验证了 bacilosarcin B 能与其 DNA 结合,且结合方式与 EB 插入 DNA 结构类似^[27]。

3 讨论与结论

美人鱼发光杆菌是一种能够引发人畜共患病的病原体,特别在水产养殖领域已经导致欧洲、亚洲和北美洲等多种海水鱼类发生严重的败血病,造成了严重的经济损失^[28]。因此,探索新型抑菌剂应用于美人鱼发光杆菌防治具有一定的现实意义。目前对 bacilosarcin B 抑菌活性研究发现其对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、

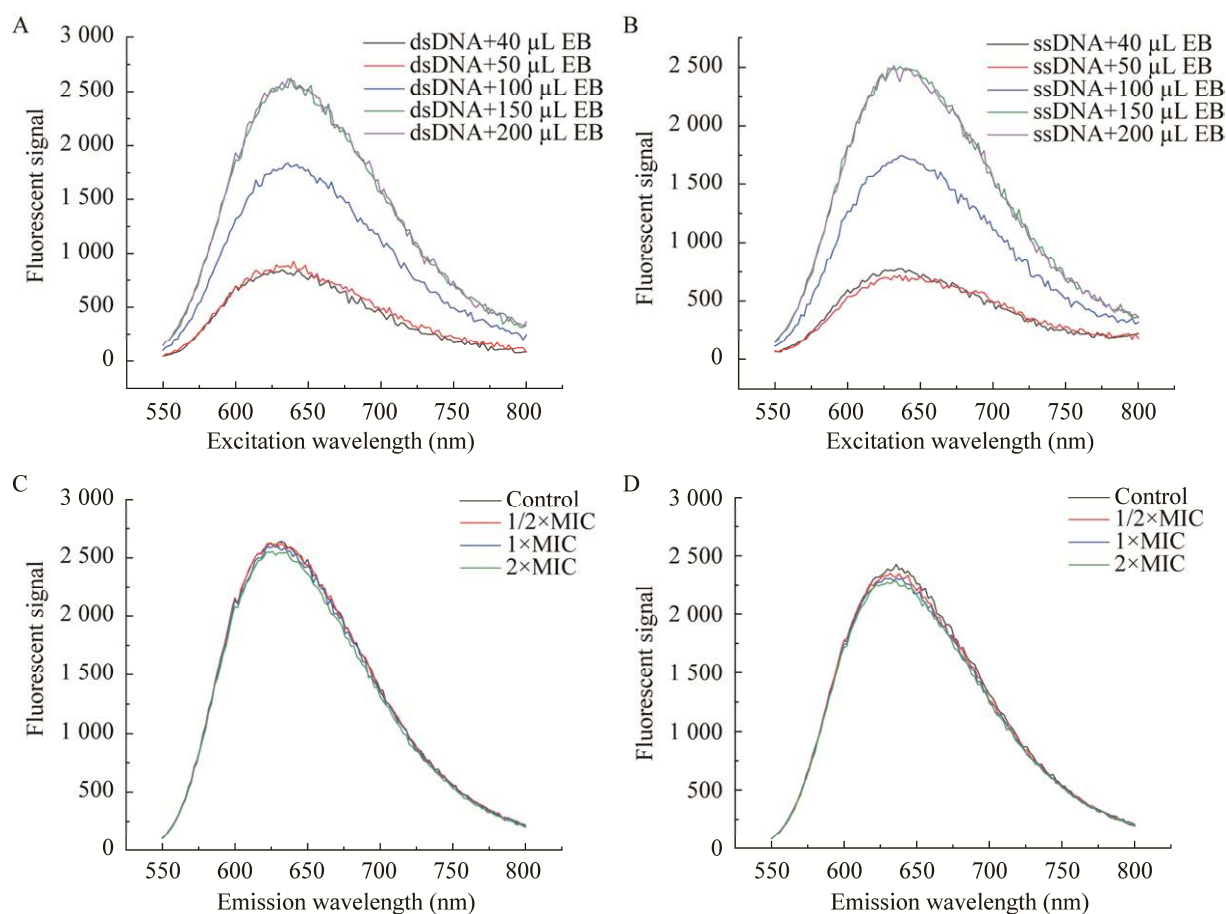


图9 不同浓度 *bacilosarcin B* 与 EB-双/单链 DNA 的荧光光谱 A、B 分别为双/单链 DNA 与 EB 结合。C、D 分别为 *bacilosarcin B* 与 EB 竞争性结合双/单链 DNA

Figure 9 Fluorescence spectra of different concentrations of *bacilosarcin B* with EB-single/double-stranded DNA. A and B are double/single-stranded DNA bound to EB, respectively. C and D are *bacilosarcin B* competing with EB for binding double/single-stranded DNA, respectively.

香港洛克氏菌、藤黄微球菌、单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌和荧光假单胞菌具有较好的抑菌效果^[29,13]。本研究发现, *bacilosarcin B* 对美人鱼发光杆菌也具有较好的抑菌效果, 最小抑菌浓度为 8 $\mu\text{g/mL}$, 表明其在水产养殖、食品加工等领域可能具有更广泛的适用场景。

Bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌的抑菌机理研究表明, *bacilosarcin B* 能损坏美人鱼发光杆菌的生物被膜和细胞壁, 导致细胞内核酸、蛋白质和碱性磷酸酶等大分子物质泄漏; 进一步通过

荧光显微镜、扫描和透射电镜更直观地发现 *bacilosarcin B* 能够破坏美人鱼发光杆菌细胞的完整性, 从而导致细胞死亡。细菌表面结构在细菌的生长过程中起着重要的作用, 是细胞与外界环境进行物质交换和信号转导的唯一介质, 细胞膜和细胞壁的破坏会导致细菌的细胞内环境的变化, 影响细菌的正常生理和代谢功能^[30-31]。这与 Lama 等^[32]研究 *amicoumacin A* 能引起金黄色葡萄球菌细胞膜的扰动, 从而影响细菌的膜通透性, 使细胞内容物外渗, 进而扰乱细菌的正常

生理和代谢功能的结果一致。

根据生长-抑菌曲线、运动能力和结晶紫染色结果, bacilosarcin B 还能对美人鱼发光杆菌生长和运动能力造成影响。1/2×MIC 的 bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌成熟的生物被膜清除率为 32.49%, 且运动能力降低 24.15%。根据生长曲线的结果, 1/2×MIC 的 bacilosarcin B 导致美人鱼发光杆菌进入对数生长期和稳定期延后, 最终到达稳定期时, 菌悬液的浓度明显低于对照组。这些结果表明, bacilosarcin B 对细菌生长的抑制作用可通过抑制生物被膜而实现。此外, bacilosarcin B 也能插入美人鱼发光杆菌的 DNA, 且结合方式与 EB 插入 DNA 结构类似。这与 amicoumacins 类抗生素中的 amicoumacin A^[33]、hetiamacin E 和 hetiamacin F^[34] 抑菌机理一致, 都是通过干扰遗传信息传递从而影响蛋白质翻译来发挥其抗菌作用。

综上所述, bacilosarcin B 通过破坏细胞壁和细胞膜的完整性使细胞膜通透性增强, 造成细胞内成分渗出, 同时也能与其 DNA 结合影响 DNA 复制, 从而影响美人鱼发光杆菌的生存。该研究从细胞水平上揭示了 bacilosarcin B 对美人鱼发光杆菌的抑菌机制。为更好地寻找美人鱼发光杆菌的生物防治方法、开发利用 bacilosarcin B 在防治海水养殖病害方面提供了一定的理论基础。

REFERENCES

- [1] TAO Z, SHEN C, ZHOU SM, YANG N, WANG GL, WANG YJ, XU SL. An outbreak of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* infection in cultured silver pomfret *Pampus argenteus* in Eastern China[J]. Aquaculture, 2018, 492: 201-205.
- [2] SHAO P, YONG PZ, ZHOU WL, SUN JH, WANG YZ, TANG QP, REN ST, WU Z, ZHAO CY, XU YF, WANG XY. First isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from half-smooth tongue sole suffering from skin-ulceration disease[J]. Aquaculture, 2019, 511: 734208.
- [3] LIU F, LIU G, LI F. Characterization of two pathogenic *Photobacterium* strains isolated from *Exopalaemon carinicauda* causing mortality of shrimp[J]. Aquaculture, 2016, 464: 129-135.
- [4] RIVAS AJ, von HOVEN G, NEUKIRCH C, MEYENBURG M, QIN QQ, FÜSER S, BOLLER K, LEMOS ML, OSORIO CR, HUSMANN M. Phobalysin, a small β -pore-forming toxin of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*[J]. Infection and Immunity, 2015, 83(11): 4335-4348.
- [5] XIE JS, MEI H, JIN S, BU LF, WANG XY, WANG CL, ZHAO QS, MA RR, ZHOU SM. First report of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* infection in the mud crab *Scylla paramamosain* cultured in China[J]. Aquaculture, 2021, 530: 735880.
- [6] 李永杰, 于永翔, 王印庚, 王春元, 刘定远, 张浩, 张正. 高致病性美人鱼发光杆菌美人鱼亚种胞外产物的毒力特性分析[J]. 微生物学报, 2022, 62(8): 2995-3006.
- [7] LI YJ, YU YX, WANG YG, WANG CY, LIU DY, ZHANG H, ZHANG Z. Virulence of the extracellular products of highly pathogenic strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(8): 2995-3006 (in Chinese).
- [7] HUNDENBORN J, THURIG S, KOMMERELL M, HAAG H, NOLTE O. Severe wound infection with *Photobacterium damsela* ssp. *Damsela* and *Vibrio harveyi*, following a laceration injury in marine environment: a case report and review of the literature[J]. Case Reports in Medicine, 2013, 2013: 1-7.
- [8] SU Y, LIU C, FANG H, ZHANG DW. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 173.
- [9] MILTON ME, CAVANAGH J. The biofilm regulatory network from *Bacillus subtilis*: a structure-function analysis[J]. Journal of Molecular Biology, 2023, 435(3): 167923.
- [10] 杨传伦, 车树刚, 张心青, 陈振发, 王建平, 王秀芝. 拮抗霍乱弧菌菌株枯草芽孢杆菌 YB-99 的筛选及在水产养殖中的应用[J]. 贵州农业科学, 2022, 50(3): 68-73.
- [11] YANG CL, CHE SG, ZHANG XQ, CHEN ZF, WANG JP, WANG XZ. Screening of *Bacillus subtilis* YB-99 antagonists for *Vibrio cholerae* and its application in aquaculture[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2022, 50(3): 68-73 (in Chinese).
- [11] 张杨, 王印庚, 于永翔, 张正, 廖梅杰, 王春元, 李彬, 荣小军, 葛建龙. 海水养殖系统中 37 株枯草芽孢杆菌

- 生理代谢、遗传特性及抑菌效果差异分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3300-3313.
- ZHANG Y, WANG YG, YU YX, ZHANG Z, LIAO MJ, WANG CY, LI B, RONG XJ, GE JL. Physiological metabolism, genetic characteristics, and bacteriostatic activity diversity of 37 *Bacillus subtilis* from mariculture system[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3300-3313 (in Chinese).
- [12] AZUMI M, OGAWA KI, FUJITA T, TAKESHITA M, YOSHIDA R, FURUMAI T, IGARASHI Y. Bacilosarcins A and B, novel bioactive isocoumarins with unusual heterocyclic cores from the marine-derived bacterium *Bacillus subtilis*[J]. Tetrahedron, 2008, 64(27): 6420-6425.
- [13] 杨杰. 枯草杆菌 fmb60 的 NRPS 和 I 型 PKS 基因簇代谢产物发掘及其生物活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
- YANG J. Metabolite discovery of NRPS and type I PKS gene cluster metabolites of *Bacillus subtilis* fmb60 and its biological activity[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [14] YANG J, ZHU QZ, XU F, YANG M, DU HC, BIAN XY, LU ZX, LU YJ, LU FX. Genome mining, heterologous expression, antibacterial and antioxidant activities of lipoamides and amicoumarins from compost-associated *Bacillus subtilis* fmb60[J]. Molecules, 2021, 26(7): 1892.
- [15] LIMA WG, de BRITO JCM, CARDOSO, VN, FERNANDES SOA. In-depth characterization of antibacterial activity of melittin against *Staphylococcus aureus* and use in a model of non-surgical MRSA-infected skin wounds[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2021, 156: 105592.
- [16] 黄运红, 任雨涵, 邹龙, 倪海燕, 龙中儿. 炭样小单孢菌产抗生素对水稻细菌性条斑病菌的抗菌作用及其机理[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1052-1061.
- HUANG YH, REN YH, ZOU L, NI HY, LONG ZE. Antimicrobial effects of antibiotic production by *Micromonospora carbonacea* against rice bacterial streak fungus and its mechanism[J]. Microbiology China, 2019, 46(5): 1052-1061 (in Chinese).
- [17] 周青青, 杨清麟, 李月, 李艳红, 杨大成, 吴正理. 新型氟喹诺酮衍生物对水产致病菌及其生物被膜的抑制作用研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3041-3053.
- ZHOU QQ, YANG QL, LI Y, LI YH, YANG DC, WU ZL. Inhibitory effects of novel fluoroquinolone derivatives on aquatic pathogens and their biofilms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3041-3053 (in Chinese).
- [18] SHU C, ZHAO HD, JIAO WX, LIU BD, CAO JK, JIANG WB. Antifungal efficacy of ursolic acid in control of *Alternaria alternata* causing black spot rot on apple fruit and possible mechanisms involved[J]. Scientia Horticulturae, 2019, 256: 108636.
- [19] SUN ZL, ZHANG XX, WU HH, WANG HY, BIAN H, ZHU YZ, XU WM, LIU F, WANG DY, FU LY. Antibacterial activity and action mode of chlorogenic acid against *Salmonella enteritidis*, a foodborne pathogen in chilled fresh chicken[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 36(2): 24-34.
- [20] MEI CC, WANG X, CHEN YC, WANG YD, YAO F, LI ZC, GU Q, SONG DF. Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*[J]. Journal of Food Safety, 2020, 40(4): e12809.
- [21] 霍卫萍, 刘智猛, 陈韦, 贾佳, 王媛媛, 张亚妮, 陈谷奎. 铜绿假单胞菌二鸟苷酸环化酶 SiaD 突变体的功能研究[J]. 微生物学报, 2022, 62(10): 3997-4007.
- HUO WP, LIU ZM, CHEN W, JIA J, WANG YY, ZHANG YN, CHEN GK. Functions of mutants of diguanylate cyclase SiaD from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(10): 3997-4007 (in Chinese).
- [22] CUI FL, JIN JH, NIU XQ, LIU QF, ZHANG GS. Spectroscopic and modelling analysis on the interaction of 3'-azidodaunorubicin semicarbazone with ctDNA[J]. Australian Journal of Chemistry, 2014, 67(2): 234-240.
- [23] COMBRIER E, MÉTÉZEAU P, RNOT X, GACHELIN H, ADOLPHE M. Flow cytometric assessment of cell viability: a multifaceted analysis[J]. Cytotechnology, 1989, 2(1): 27-37.
- [24] LIU YN, LU J, SUN J, LU FX, BIE XM, LU ZX. Membrane disruption and DNA binding of *Fusarium graminearum* cell induced by C16-Fengycin A produced by *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Food Control, 2019, 102: 206-213.
- [25] ZHU WX, GAO JZ, LIU HL, LIU JX, JIN T, QIN NB, REN XM, XIA XD. Antibiofilm effect of sodium butyrate against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food Control, 2022, 131: 108422.
- [26] LIU BM, BAI CL, ZHANG J, LIU Y, DONG BY, ZHANG YT, LIU B. *In vitro* study on the interaction of 4,4-dimethylcurcumin with calf thymus DNA[J]. Journal of Luminescence, 2015, 166: 48-53.
- [27] GAO Y, LI JS, HUANG GX, YAN LJ, DONG Z. Spectroscopic studies on the interaction between anthragallol and DNA using of ethidium bromide as a

- fluorescence probe[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015, 141: 239-243.
- [28] WHITE DM, VALSAMIDIS MA, KOKKORIS GD, BAKOPOULOS V. The effect of temperature and challenge route on *in vitro* hemocyte phagocytosis activation after experimental challenge of common *Octopus*, *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) with either *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* or *Vibrio anguillarum* O1[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2023, 174: 105955.
- [29] LI YX, XU Y, LIU LL, HAN Z, LAI PY, GUO XR, ZHANG XX, LIN WH, QIAN PY. Five new amicoumacins isolated from a marine-derived bacterium *Bacillus subtilis*[J]. *Marine Drugs*, 2012, 10(12): 319-328.
- [30] WANG L, LI AK, FANG J, WANG YW, CHEN LX, QIAO L, WANG WW. Enhanced cell wall and cell membrane activity promotes heat adaptation of *Enterococcus faecium*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(14): 11822.
- [31] XIA TQ, TENG KL, LIU YY, GUO YQ, HUANG FQ, TAHIR M, WANG TW, ZHONG J. A novel two-component bacteriocin, acidicin P, and its key residues for inhibiting *Listeria monocytogenes* by targeting the cell membrane[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(4): e0521022.
- [32] LAMA A, PANÉ-FARRÉ J, CHON T, WIERMSMA AM, SIT CS, VEDERAS JC, HECKER M, NAKANO MM. Response of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to amicoumacin A[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e34037.
- [33] POLIKANOV YS, OSTERMAN IA, SZAL T, TASHLITSKY VN, SEREBRYAKOVA MV, KUSOCHEK P, BULKLEY D, MALANICHEVA IA, EFIMENKO TA, EFREMENKOVA OV, KONEVEGA AL, SHAW KJ, BOGDANOV AA, RODNINA MV, DONTSOVA OA, MANKIN AS, STEITZ TA, SERGIEV PV. Amicoumacin A inhibits translation by stabilizing mRNA interaction with the ribosome[J]. *Molecular Cell*, 2014, 56(4): 531-540.
- [34] WANG T, LU QP, SUN CH, LUKIANOV D, OSTERMAN IA, SERGIEV PV, DONTSOVA OA, HU XX, YOU XF, LIU SW, WU G. Hetiamacin E and F, new amicoumacin antibiotics from *Bacillus subtilis* PJS using MS/MS-based molecular networking[J]. *Molecules*, 2020, 25(19): 4446.