DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2020.04.002

日照海域分泌肽聚糖水解酶菌株的筛选、初步鉴定及抑菌活性测定*

李　淼　侯灵芝　徐兴浩　王肖肖　郑明灿　刘　昂△
（济宁医学院基础医学院，济宁 272067）

摘　要　目的　筛选能分泌肽聚糖水解酶的菌株并测定其抑菌活性，为研发新型抗菌药物提供素材。**方法**　从日照海域潮间带沉积物中筛选能水解肽聚糖，并且可以在以金黄色葡萄球菌为唯一营养物的液体培养基中生长的菌株，16S rRNA 基因序列测定并同源性比对，确定其分类地位；诱导产酶，离心培养液得到的上清作为粗酶液，观测粗酶液对金黄色葡萄球菌的抑菌活性。**结果**　筛选出 8 株分泌肽聚糖水解酶且能够在以金黄色葡萄球菌为唯一营养物的液体培养基中生长的菌株。16S rRNA 基因序列同源性比对分析表明，这 8 株菌均属于芽孢杆菌属。其粗酶液菌均对金黄色葡萄球菌有明显的抑制作用。与对照组相比，粗酶液处理后菌落形成单位下降比率在(61.9 ±7.7)% ~(95.0 ±2.4)%。显微镜下观察，粗酶液处理后的葡萄球菌轮廓变得不清晰，数量减少。**结论**　海洋潮间带中存在能够分泌肽聚糖水解酶的菌株，本实验筛选的 8 株菌粗酶液均表现出较强的抑制金黄色葡萄球菌的活性，且粗酶液对金黄色葡萄球菌有裂解活性。

关键词　肽聚糖水解酶；溶菌酶；金黄色葡萄球菌；芽孢杆菌
中图分类号：R37　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1000-9760(2020)08-233-05

Screening, preliminary identification of peptidoglycan hydrolase-producing bacteria from Rizhao Sea area and determination of antibacterial activity of the obtained peptidoglycan hydrolase

LI Miao, HOU Lingzhi, XU Xinghao, WANG Xiaoxiao, ZHENG Mingcan, LIU Ang△
(*College of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining* 272067, *China*)

Abstract: ***Objective***　To screen bacteria strains capable of secreting peptidoglycan hydrolase and determine their antibacterial activity, which provide materials for the development of new antibacterial drugs. ***Methods***　The strains were screened capable of hydrolyzing peptidoglycan from the intertidal sediments in Rizhao sea area. The strains were inoculated in a liquid medium with Staphylococcus. aureus as the sole nutrient and those strains that could grow in this medium were selected for the following experiments. First of all, the screened strains were subjected to the 16S rRNA gene sequence determination and homology comparison to determine its taxonomic status. Secondly, the selected strains were inoculated in a liquid medium with S. aureus as the sole nutrient to induce enzyme production, and the supernatant after centrifuging the culture was used as a crude enzyme. The antibacterial activity of crude enzyme against S. aureus was measured and the effect of crude enzyme solution on S. aureus was observed under a microscope. ***Results***　Eight strains that could secret peptidoglycan hydrolase and were able to grow in liquid medium with S. aureus as the sole nutrient were selected. The 16S rRNA gene sequence homology analysis showed that the eight strains belonged to the genus Bacillus. All of the crude enzymes of the selected eight strains had obvious inhibitory effects on S. aureus. Compared with the blank control, the reduction rate of colony forming units after the action of crude

*［基金项目］济宁医学院 2018 年校级大学生创新创业训练计划项目(cx2018040)；济宁医学院 2018 年国家级大学生创新创业训练计划项目(20180443012)
△［通信作者］刘昂，E-mail：liuang08@163.com

enzyme solution was between 61.9 ±7.7% ~95.0 ±2.4% . Observed under a microscope, the outline of cells of S. aureus became unclear and the number decreased. ***Conclusion*** There are strains capable of secreting peptidoglycan hydrolase in the marine intertidal zone. The eight strains capable of secreting peptidoglycan hydrolase in this experiment belong to the genus Bacillus. The crude enzyme solutions of the eight strains screened showed strong activity against S. aureus, and microscopic examination showed that the crude enzyme solution had lytic activity against S. aureus.

Keywords: Peptidoglycan hydrolase; Lysozyme; Staphylococcus aureus; Bacillus

肽聚糖是细菌细胞壁的特有组分,其水解酶作用靶点是细胞壁中肽聚糖成分的酶类物质,也称为溶素(lysin),具有裂菌杀菌能力,是潜在的抗菌武器,受到了较多的关注[1-2]。

金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)是常见的引起人化脓性感染的病原菌。可引起伤口的化脓性感染、肺炎、败血症等,严重者会危及生命[3]。金黄色葡萄球菌极易产生耐药性变异,例如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌现已经成为患者死亡的重要病原菌[4]。开发新型的杀菌药物迫在眉睫。本研究以金黄色葡萄球菌肽聚糖为底物,从海洋沉积物中筛选能够水解胞外肽聚糖的细菌菌株,以金黄色葡萄球菌的菌体为底物对 8 株细菌进行了发酵产酶培养,并检测了粗酶液对金黄色葡萄球菌的抑菌活性。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 沉积物样品 分离菌株所用的沉积物样品是用无菌的 50 mL 离心管采集自日照附近黄海海域的潮间带(35°28′N 119°36′E),低温运输到实验室并于 4℃保存备用。

1.1.2 菌株 金黄色葡萄球菌(ATCC 27217T)购自 Solarbio 公司,在实验室中接种 LB 培养基传代培养。

1.1.3 培养基 LB 培养基[1% 胰蛋白胨(Oxoid 公司),0.5% 酵母浸出物(Oxoid 公司),1.5% 琼脂(Biosharp 公司),蒸馏水,pH 7.5]。

TYS 培养基(0.5% 胰蛋白胨,0.1% 酵母浸出物,1.5% 琼脂,人工海水,pH 7.5)。

肽聚糖水解酶筛选平板(0.5% 胰蛋白胨,0.1% 酵母浸出物,1.5% 琼脂,人工海水,1% 金黄色葡萄球菌肽聚糖,pH 7.5)。

以金黄色葡萄球菌菌体为底物的发酵培养基(2% 金黄色葡萄球菌体,人工海水,pH 8.0)。

1.2 方法

1.2.1 金黄色葡萄球菌肽聚糖提取 将 500ml 金黄色葡萄球菌过夜培养物,8000rpm 离心 2min 收集菌体,蒸馏水重悬,离心洗涤 1 次,倒掉上清液;用 100ml 蒸馏水重悬菌体;将样品煮沸 10min,然后 10000rpm 离心 8min 收集菌体;用预热的 5% (w/v)的 SDS 缓冲液重悬菌体,煮沸 40min,不可溶物通过离心(10000rpm,15min)重新收集;用预热的(60℃)蒸馏水洗涤菌体以去除 SDS,离心洗涤 6 次;利用超声破碎细胞,间隔 5s,破碎 5s,功率 400W,99 次每轮,破碎 4 轮;将样品 4000rpm 离心 10min,去掉未破碎的菌体,保留上清,12000rpm 离心 10min 收集破碎的细胞壁并水洗 2 次即得到肽聚糖。

1.2.2 肽聚糖水解酶分泌菌株的初筛 将 1g 沉积物样品和 9ml 的无菌人工海水悬浮加入三角瓶中,另加入 10 颗直径为 1mm 的无菌小玻璃球,于 25℃、200r/min 震荡 1h。之后取悬浮液梯度稀释后涂布肽聚糖水解酶筛选平板,置于 25℃静置培养 10d,选取周围有透明圈的菌落分离纯化,用于后续实验。

1.2.3 所筛选菌株在发酵培养基中生长情况分析 将筛选到的能在肽聚糖水解酶筛选平板上产生透明圈的菌株接种到以金黄色葡萄球菌菌体为底物的发酵培养基中,培养 3d 后镜检观察生长结果,选取能够在该种发酵培养基中明显生长的菌株用于进一步研究。

1.2.4 所筛选菌株 16S rRNA 基因序列测定和同源比对 将筛选的能分泌肽聚糖水解酶且能够在以金黄色葡萄球菌菌体为底物的发酵培养基中生长的菌株,利用基因组小量提取试剂盒提取其基因组。之后利用细菌 16S rRNA 基因扩增通用引物 27F 和 1492R 扩增其 16S rRNA 基因片段,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,切胶回收后连接到 PMD-19T 克隆质粒中,转化大肠杆菌 DH5α 菌株后寄送

到北京擎科新业生物技术有限公司测序。将得到的序列在 EzBioCloud 网站同源比对,分析其分类学地位。

1.2.5 所筛选菌株粗酶液的制备　将筛选到的 8 株菌株接种以金黄色葡萄球菌菌体为底物的发酵培养基,培养 4d 后,12000rpm 离心 5min 后收集上清液即为粗酶液。

1.2.6 粗酶液抑菌活性测定　平板菌落计数法:1)挑取金黄色葡萄球菌到 LB 液体培养基,于 25℃、200r/min 条件下震荡培养 5h。吸取 1ml 培养物离心收集菌体,之后用 1ml 0.5mM 的 PBS 缓冲液重悬制备菌悬液。2)实验组吸取 200μl 制备好的菌悬液,与 200μl 粗酶液混匀,30℃环境下反应 40min;对照组操作与实验组仅有一处不同,即粗酶液先沸水浴 1min 后再与菌悬液混匀反应。3)反应后,将对照组与实验组反应液进行梯度稀释到 1×10^{-8}、1×10^{-9}、1×10^{-10},稀释液为 LB 液体培养基。之后将稀释后的反应物涂布固体 LB 培养基, 37℃恒温培养箱静置培养 24h 后,计数对照组与实验组的菌落个数。显微镜观察:将平板菌落计数法步骤中第二步粗酶液和菌悬液的反应产物,取 3μl 涂布载玻片,革兰染色后油镜观察并拍照。

2　结果

2.1　分泌肽聚糖水解酶菌株筛选

在肽聚糖筛选平板上经过两周的培养,长出了很多的菌落,但是仅有 15 株细菌菌落周围产生了明显的透明水解圈,表明这 15 株细菌能够分泌肽聚糖水解酶。我们将这 15 株细菌进一步纯化后制作甘油管保种备用。

2.2　所筛选菌株在发酵培养基中生长情况

经过培养检测,发现所筛选到的 15 株能分泌肽聚糖水解酶的菌株中,有 8 株可以在金黄色葡萄球菌菌体为底物的发酵培养基中生长。这 8 株细菌菌株具有较低成本下进一步扩大发酵产酶的可行性,有潜在的应用价值。

2.3　所筛选菌株 16S rRNA 基因序列测定和同源比对结果

为初步确认本实验筛选到的 8 株有潜在应用价值的细菌菌株的分类地位,我们对这些菌株的 16S rRNA 基因序列进行了测定,并将获得的序列进行同源比对。结果表明,这 8 株细菌均属于芽孢杆菌属,物种丰富度较低。见表 1。

表 1　8 株细菌菌株 16S rRNA 基因序列同源比对

菌株	最相似模式菌株	16S rRNA 基因序列相似度/%
S731	Bacillus altitudinis 41KF2b^T	100
S213	Bacillus algicola KMM3737^T	99.52
S223	Bacillus algicola KMM3737^T	99.52
S322	Bacillus algicola KMM3737^T	99.32
S323	Bacillus algicola KMM3737^T	99.32
S324	Bacillus algicola KMM3737^T	99.93
S421	Bacillus algicola KMM3737^T	99.93
S422	Bacillus algicola KMM3737^T	99.73

2.4　粗酶液抑菌活性初步测定

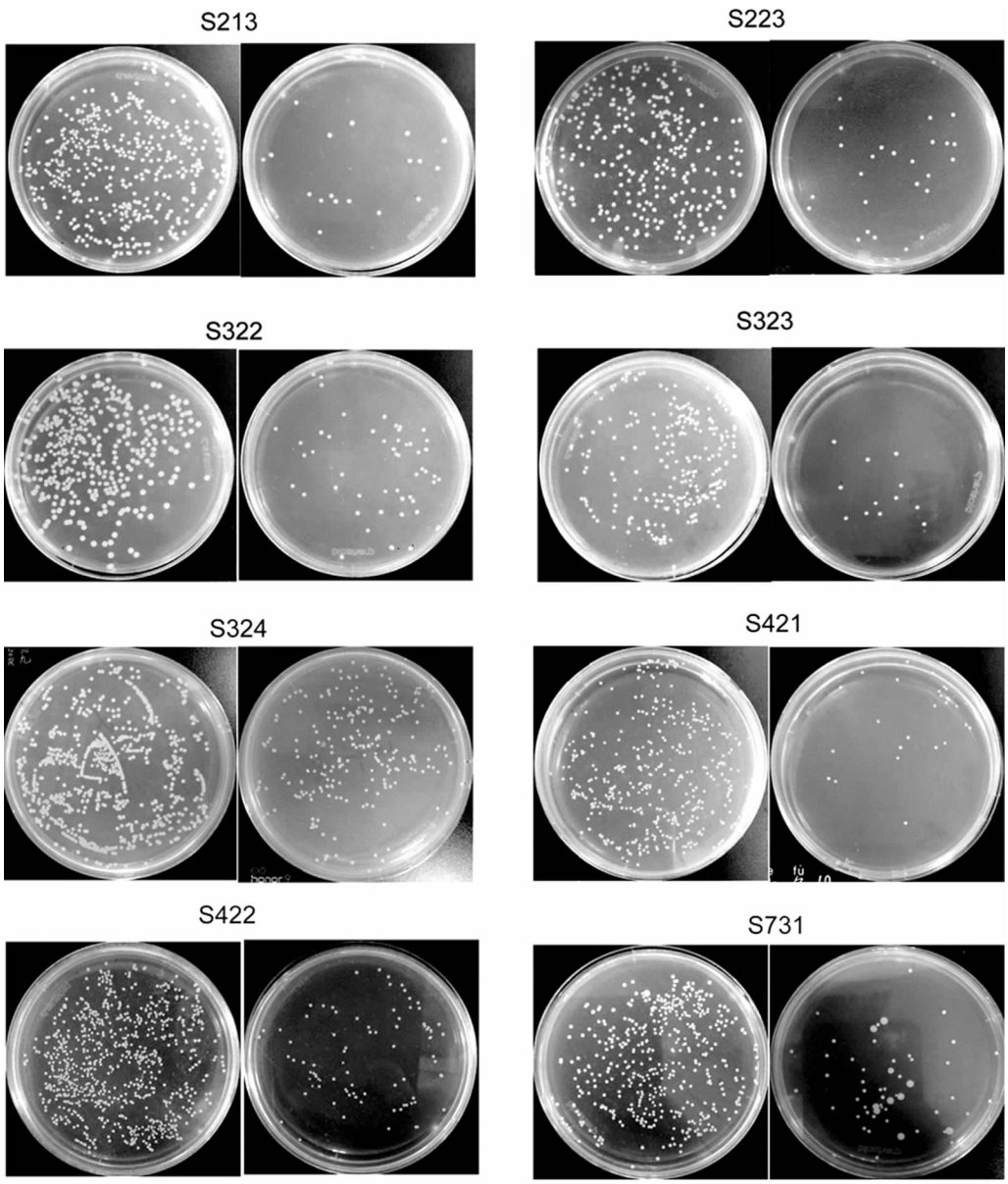
与对照组相比,经过粗酶液处理过的金黄色葡萄球菌的菌落形成单位均大幅下降。对金黄色葡萄球菌抑菌效果最显著的是菌株 S213,实验组的菌落形成单位下降了 95.0%。而对金黄色葡萄球菌抑菌效果相对最差的是菌株 S324,实验组的菌落形成单位下降了 61.9%。其他 6 株细菌粗酶液的实验组菌落形成单位下降了 78.6% ~93.5%,均展示出了良好的抑制金黄色葡萄球菌的能力。见图 1、表 2。

表 2　粗酶液处理过的金黄色葡萄球菌的菌落形成单位下降比例(%, $\bar{x}\pm s$)

菌株	菌落形成单位下降比例
S731	86.5 ±7.2
S213	95.0 ±2.4
S223	89.8 ±8.3
S322	78.6 ±7.7
S323	93.5 ±2.5
S324	61.9 ±1.5
S421	92.2 ±1.5
S422	92.2 ±4.8

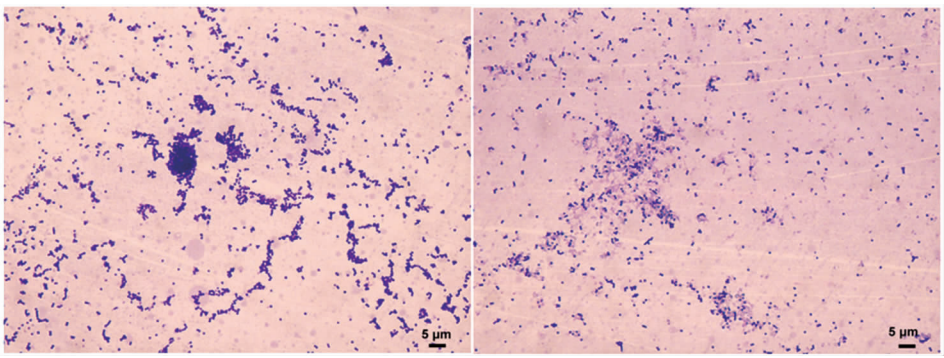
2.5　粗酶液的杀菌能力

与对照组相比,经粗酶液作用后,实验组金黄色葡萄球菌数量明显减少,出现了一些轮廓不清晰的碎片样物质;实验组金黄色葡萄球菌的排列方式也不再是葡萄串状,而是单球、双球或者短链样不规则排列。粗酶液能够裂解金黄色葡萄球菌,大幅度减少其数量并导致其排列方式发生变化。见图 2。



注:每菌株对应两张图片,左边图片为对照组,右边图片为实验组,菌株编号在图片组的上方。

图 1　8 株细菌粗酶液的抑菌效果



注:左边图片为对照组,右边图片为实验组。图中的标尺代表的长度为 5μm。

图 2　粗酶液对金黄色葡萄球菌的杀伤作用

3　讨论

细菌的耐药问题越来越严重,据调查显示,在全世界范围内,有 700000 人因细菌耐药而丧生。如果细菌耐药问题不能解决,到 2050 年将导致与感染有关的死亡超过癌症引起的死亡。肽聚糖水解酶也称为溶素,可根据其来源和功能分为外溶素(exolysin)、内溶素(endolysin)和自溶素(autolysin)[5-7]。具有裂菌功能的主要是肽聚糖水解酶中的外溶素和自溶素[8]。而肽聚糖水解酶与传统抗菌药物不同[9],通过裂解细胞壁肽聚糖从而裂解杀菌,是潜在的抗菌武器,具有良好的应用前景[10-13]。

鉴于细菌分泌肽聚糖水解酶多为诱导型,如若希望通过液体培养基发酵产酶,需要添加肽聚糖作为诱导物诱导产酶。但商品化的肽聚糖价格昂贵,而在实验室提纯过程繁琐,成本高,均不适用于之后的大规模发酵产酶,本实验为解决这一问题,尝试直接将金黄色葡萄球菌菌体作为发酵培养基中的唯一有机物来培养所筛选出的产酶菌株,金黄色葡萄球菌菌体上的肽聚糖即可作为诱导物诱导产酶。

本研究从山东日照海域沉积物样品中,以金黄色葡萄球菌肽聚糖为底物筛选出了 15 株能分泌肽聚糖水解酶的菌株。我们进一步的实验表明其中有 8 株可以在以金黄色葡萄球菌为唯一有机物的培养基中生长并产酶,这 8 株菌具有低成本发酵生产肽聚糖水解酶的应用潜力。通过 16S rRNA 基因序列比对分析,我们选择的 8 株菌均为芽孢杆菌属细菌。芽孢杆菌属菌株是分离肽聚糖水解酶的良好来源。将选取的 8 株芽孢杆菌进行以金黄色葡萄球菌为底物的发酵培养后,制取粗酶液,通过平板菌落计数法测定菌株粗酶提取液的抑菌活性,结果表明 8 株芽孢杆菌属菌株对金黄色葡萄球菌具有较好的抑菌效果,并且通过显微镜观察证实了粗酶液的杀菌能力。本研究所筛选到的菌株及探索出来的低成本发酵产酶方法,为下一步分离纯化肽聚糖水解酶,开发新型抗菌药物奠定了坚实的基础。

参考文献:

[1] Szweda P, Schielmann M, Kotlowski R, et al. Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against Staphylococcus aureus[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 96(5): 1157-1174. DOI: 10.1007/s00253-012-4484-3.

[2] Alcorlo M, Martinez-Caballero S, Molina R, et al. Carbohydrate recognition and lysis by bacterial peptidoglycan hydrolases[J]. Curr Opin Struct Biol, 2017, 44: 87-100. DOI: 10.1016/j.sbi.2017.01.001.

[3] 万东芳,万永山,朱红军,等. 皮肤软组织感染患者金黄色葡萄球菌感染状况研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(1): 32-35.

[4] 范陈良,李小四,吴晓燕. 皮肤及软组织感染中金黄色葡萄球菌临床分布和耐药特性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(5): 413-417. DOI: 10.3969/j.issn.1001-8689.2017.05.018.

[5] Wyckoff TJ, Taylor JA, Salama NR. Beyond growth: novel functions for bacterial cell wall hydrolases[J]. Trends Microbiol, 2012, 20(11): 540-547. DOI: 10.1016/j.tim.2012.08.003.

[6] Shockman GD, Daneo-Moore L, Kariyama R, et al. Bacterial Walls, Peptidoglycan Hydrolases, Autolysins, and Autolysis[J]. Microb Drug Resist, 1996, 2(1): 95-98. DOI: 10.1089/mdr.1996.2.95.

[7] Typas A, Banzhaf M, Gross CA, et al. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology[J]. Nat Rev Microbiol, 2011, 10: 1-1. DOI: 10.1038/nrmicro2677.

[8] Vermassen A, Leroy S, Talon R, et al. Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 331. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00331.

[9] Bayles KW. The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery[J]. Trends Microbiol, 2000, 8(6): 274-278. DOI: 10.1016/S0966-842X(00)01762-5.

[10] Gustine JN, Au MB, Haserick JR, et al. Cell Wall Hydrolytic Enzymes Enhance Antimicrobial Drug Activity Against Mycobacterium[J]. Curr Microbiol, 2019, 76(4): 398-409. DOI: 10.1007/s00284-018-1620-z.

[11] 王艺颖. 产生物活性物质及溶菌酶的海洋微生物筛选及鉴定[D]. 大连:大连工业大学, 2017.

[12] 林东,徐庆,刘忆舟,等. 枯草芽孢杆菌 SO113 分泌蛋白的抑菌作用及抗菌蛋白的分离纯化[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(1): 77-80.

[13] Rangan KJ, Pedicord VA, Wang YC, et al. A secreted bacterial peptidoglycan hydrolase enhances tolerance to enteric pathogens[J]. Science, 2016, 353(6306): 1434-1437. DOI: 10.1126/science.aaf3552.

(收稿日期　2020-06-23)
(本文编辑:石俊强)