

doi : 10. 16473/j. cnki. xblykx1972. 2019. 01. 004

# 球孢白僵菌发酵液抗人体致病细菌活性研究\*

李娟<sup>1,2</sup>, 虞泓<sup>1</sup>, 王毅<sup>2</sup>

(1. 云南大学, 云南 昆明 650091; 2. 云南省林业科学院 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室, 国家林业局云南珍稀濒危森林植物保护和繁育重点实验室, 云南 昆明 650201)

**摘要:** 为了探究球孢白僵菌 YFCCFQ001 发酵液的抗菌活性以及不同培养基对其抗菌效果的影响, 用乙酸乙酯萃取球孢白僵菌 YFCCFQ001 发酵液, 旋干后得到提取物, 采用抑菌圈法测定其对 6 种耐药性人体致病细菌以及 8 种普通人体致病细菌的抗菌活性, 并通过单菌多产物策略, 改变培养基碳氮源, 检测抗菌效果的变化。结果表明: 球孢白僵菌 YFCCFQ001 提取物对 4 种耐药性致病细菌 (溶血性葡萄球菌、大肠埃希菌、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌) 和 8 种普通致病细菌均有抗菌活性 (其中关于球孢白僵菌对副溶血性弧菌、短小芽孢杆菌、无乳链球菌、福氏志贺氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌的抗菌活性未见文献报道)。不同氮源对其抗菌活性影响显著, 其中胰蛋白胨抗菌效果最好, 对 3 种耐药性致病细菌和 6 种普通致病细菌均有活性。研究发现了球孢白僵菌对耐药性致病细菌的抗菌活性, 以及不同培养基对球孢白僵菌发酵液抗菌活性的影响, 为真菌中新型抗菌天然产物的寻找和利用提供新的思路。

**关键词:** 球孢白僵菌; OSMAC 策略; 抗菌活性; 耐药性致病细菌; 人体致病细菌

**中图分类号:** Q 939.9    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1672-8246 (2019) 01-0018-06

## Antimicrobial Studies on *Beauveria bassiana* against Human Pathogenic Bacteria

LI Juan<sup>1,2</sup>, YU Hong<sup>1</sup>, WANG Yi<sup>2</sup>

(1. Yunnan University, Kunming Yunnan 650091, P. R. China; 2. The Key Laboratory of Forest Plants Cultivation and Utilization, The Key Laboratory of Rare and Endangered Forest Plants of State Forestry Administration, Yunnan Academy of Forestry, Kunming Yunnan 650201, P. R. China)

**Abstract:** In order to explore the antibacterial activity of extracts of *Beauveria bassiana* (YFCCFQ001) and effect of different medium on antibacterial activity, inoculating inhibition zone was used to evaluate the antimicrobial activity of ethyl acetate extracts of *B. bassiana* against 6 resistant pathogenic bacteria and 8 common human pathogenic bacteria, and one strain-many compounds (OSMAC) strategy was adopted to evaluate the effect of different carbon sources, nitrogen sources and inoculation on antibacterial activity. The results showed that the extracts of *B. bassiana* had significant antibacterial activity against 4 resistant pathogenic bacteria (*Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*) and 8 common pathogenic bacteria (*Beauveria bassiana* against *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus pumilus*, *Streptococcus agalactiae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi* were the firstly reported). Different nitrogen sources had significant effects on antibacterial activity, and the extracts from tryptone had the best antibacterial effect that against 3 resistant pathogenic bacteria and 6 common pathogenic bacteria. The antibacterial activity of *B. bassiana* against resistant pathogenic bacteria and the

\* 收稿日期: 2018-11-20

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31860177), 云南省面上基金 (2016FB055), 云南省林业科学院创新基金项目 (QN2018-01), 中央引导地方科技发展专项资金项目 (KC1610530), 国家自然科学基金地区项目 (31760011)。

**第一作者简介:** 李娟 (1992-), 女, 硕士研究生, 主要从事真菌的次生代谢产物方面的研究。E-mail:1015503493@qq.com

**通讯作者简介:** 王毅 (1981-), 男, 副研究员, 博士, 主要从事分子生物学研究。E-mail:22825818@qq.com

虞泓 (1962-), 男, 教授, 博士, 主要从事虫草资源开发及利用研究。E-mail:herbfish@163.com

effect of different medium on antibacterial activity was found, and it is beneficial to the development of novel antimicrobial compounds against human pathogenic bacteria.

**Key words:** *Beauveria bassiana*; OSMAC strategy; antibacterial activity; resistant pathogenic bacteria; human pathogenic bacteria

人类多种疾病产生的重要因素之一是细菌感染,目前临床上主要通过使用抗生素来治疗细菌感染。但细菌多次与抗生素接触后,会进化出抗生素耐药性机制,导致致病菌耐药性逐渐增强。根据 2016 年中国 CHINET 细菌耐药性监测,凝固酶阴性葡萄球菌甲氧西林耐药株 (MRCNS) 的检出率平均达到 77.1%; 鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别达到 68.6% 和 71.4%; 部分链球菌属对红霉素和克林霉素耐药率甚至可达 90% 以上<sup>[1]</sup>。可见细菌耐药性已成为威胁人类健康的一大难题。解决这一难题的方法之一是加快对新型抗生素的寻找和研发。

真菌具有生长迅速,易于培养,可产生多种新化合物的特点,具有巨大的开发潜能。如从黄杨内生真菌 (*Colletotrichum* sp.) BS4 代谢产物中得到的新化合物,对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和铜绿假单胞菌 (又称绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*) 有较好的抑菌效果<sup>[2]</sup>。虫生真菌贵州绿僵菌 (*Metarhizium guizhouense*) 对蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus* Frankland)、缓慢芽孢杆菌 (*Bacillus lentus*)、溶血性葡萄球菌 (*Staphylococcus haemolyticus*) 等 13 种人体致病细菌均有较好的抑菌活性<sup>[3]</sup>。球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 是一种昆虫病原真菌,长期被用于生物防治,近来发现,其次生代谢产物具有抗癌<sup>[4-6]</sup>、抗白血病<sup>[7]</sup>、抗艾滋病毒 HIV-1<sup>[8]</sup>、抗菌<sup>[9-13]</sup>等多种生物学活性。虽然球孢白僵菌抗菌活性已有报道,但其对耐药性人体致病细菌的抗菌活性以及不同培养条件对其抗菌活性的影响方面还未见报道。

单菌多产物策略 (one strain-many compounds, OSMAC) 主要是通过改变培养条件、培养方法等手段,激活微生物中沉默基因,以产生大量具有活性的代谢产物,为新型药物的研发提供先导化合物<sup>[14]</sup>。为了深入探究球孢白僵菌的抗菌活性,本次实验选取了 6 种耐药性人体致病细菌和 8 种普通人体致病细菌作为供试细菌,采用 OSMAC 策略,探究不同碳源、氮源、接种量对球孢白僵菌次生代

谢产物抗菌活性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌丝体

实验菌株采自贵州福泉,采用 ITS,  $\beta$ -tubulin 基因片段, elongation factor 1 $\alpha$  基因片段对菌种进行比对鉴定,最终确定所获菌株为球孢白僵菌,菌种保存于云南大学中草药生物资源研究所云百草实验室,菌株编号为 YFCCFQ001。

#### 1.1.2 抗菌实验所用人体致病细菌

6 种耐药性人体致病细菌 鲍曼不动杆菌、绿脓杆菌、溶血性葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*)。购于广东省细菌耐药性监测和质量控制中心。

8 种普通人体致病细菌 蜡样芽孢杆菌、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、乙型副伤寒沙门氏菌 (*Salmonella paratyphi*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*)、金黄色葡萄球菌。由昆明市食品药品检验所赠送。

#### 1.1.3 不同液体培养基成分

OMAM 培养基 蔗糖 (20g/L) 与葡萄糖 (20g/L) 为碳源,酵母粉 (1g/L) 和大豆蛋白胨 (20g/L) 为氮源。

不同氮源的培养基 蔗糖 (20g/L) 与葡萄糖 (20g/L) 为碳源,编号分别为 S 与 G,分别以 40g/L 的麦芽浸粉 (M1)、番茄浸粉 (T)、马铃薯浸粉 (P)、胰蛋白胨 (Y1)、牛肉浸粉 (B)、酪蛋白胨 (L) 和香蕉粉 (B1) 为氮源,配制成碳源相同氮源不同的液体培养基,编号分别为 SGM1、SGT、SGP、SGY1、SGB、SGL、SGB1。

不同碳源的培养基 大豆蛋白胨 (20g/L) 与酵母粉 (1g/L) 为氮源,分别以 40g/L 的甘露醇、麦芽糖、山梨醇、蔗糖、乳糖、葡萄糖、肌醇、果糖、可溶性淀粉为碳源,配制成氮源相同碳源不同的液体培养基,编号分别为 man、mal、sor、suc、

luc、glu、ino、fru、sta。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 球孢白僵菌液体发酵培养

不同接种量 无菌条件下，取 20mg、40mg、60mg、80mg、100mg 的 YFCCFQ001 菌丝体各 3 份研碎，分别接种于在 OMAM 液体培养基中，28℃，150r/min 摇床培养 10d。

不同培养基 取 YFCCFQ001 菌丝体 60mg 研碎后，分别接种到不同碳源和不同氮源的液体培养基中，每种培养基接种 3 瓶，于 28℃，150r/min 摇床培养 10d。

#### 1.2.2 发酵液的萃取浓缩

将 YFCCFQ001 发酵液过滤后，加入等量的乙酸乙酯振荡混匀，超声 60min。倒入分液漏斗静置 8h，取上层乙酸乙酯相旋蒸浓缩致干，称重后，加入二甲亚砜 (DMSO) 配制成 100.00mg/mL 的提取物溶液，备用。

#### 1.2.3 致病细菌悬浮液的制备

分别取活化后的 14 种致病菌于离心管中，加入无菌生理盐水混匀。调节菌悬液的浓度至  $1.0 \times 10^6 - 6.0 \times 10^6$  cfu/mL。

#### 1.2.4 抗菌活性实验

分别吸取 300μL 的相应供试菌悬液滴加到 Luria-Bertani 固体培养基上，均匀涂布于培养基表面，制成含菌平板<sup>[15]</sup>。抗菌活性实验采用纸片法<sup>[16]</sup>，将直径 6.0mm 的滤纸圆片灭菌后干燥。分别滴加 15.0μL 球孢白僵菌提取物的 DMSO 溶液、空白培养基提取物的 DMSO 溶液于滤纸圆片上，风干后分别作为试验样片，阴性对照样片。将 2 种样片贴放于含菌平板表面，盖好培养皿，于 37.2℃ 恒温培养 10h 后取出，测量抑菌圈直径，记录数据。实验重复 3 次。

#### 1.2.5 最小抑菌活性 (MIC) 的测定

采用二倍稀释法对球孢白僵菌发酵提取物进行稀释<sup>[17]</sup>，将不同稀释倍数的提取物滴加于滤纸圆片上，测定发酵提取物对 14 种致病菌的 MIC 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 最低抑菌浓度

检测球孢白僵菌对 14 种致病细菌的 MIC，结果显示，100mg/mL 的球孢白僵菌提取物对鲍曼不动杆菌、绿脓杆菌没有抗性，对其他 4 种耐药细菌均有一定的抗菌活性，MIC 值均为 100mg/mL。对

8 种普通致病细菌的最低抑菌浓度检测结果见表 1。提取物对副溶血性弧菌抑制效果较好，MIC 达到 6.25mg/mL，对福氏志贺氏菌和金黄色葡萄球菌抑菌效果较弱，MIC 值为 50mg/mL。

表 1 球孢白僵菌 YFCCFQ001 提取物对 8 种普通致病细菌的 MIC

Tab. 1 The minimum inhibitory concentration of YFCCFQ001 extracts to MIC of 8 pathogenic bacteria

菌种	最小抑菌活性 (MIC)/ mg · mL <sup>-1</sup>
蜡样芽孢杆菌	12.50
副溶血性弧菌	6.25
乙型副伤寒沙门氏菌	25.00
无乳链球菌	12.50
短小芽孢杆菌	25.00
福氏志贺氏菌	50.00
枯草芽孢杆菌	25.00
金黄色葡萄球菌	50.00

### 2.2 接种量对球孢白僵菌抗菌活性的影响

按照不同接种量培养球孢白僵菌 10d，收获提取物进行抗菌活性测定，结果显示，不同接种量对抗菌活性没有显著影响。但接种量对提取物的收获量有一定影响 (图 1)，随着接种量的增加，球孢白僵菌次生代谢产物的提取量逐渐增加，当接种量为 60mg 时收获的提取物最多，为 47.4mg/100mL，之后又呈下降趋势。

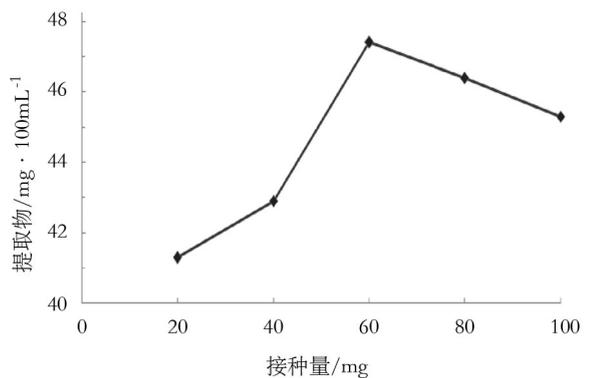


图 1 接种量对 YFCCFQ001 次生代谢产物提取量的影响  
Fig. 1 Effect of inoculation quantity on the extraction of extracts from YFCCFQ001

### 2.3 不同培养基对球孢白僵菌次生代谢产物抑菌效果的影响

#### 2.3.1 不同碳源对球孢白僵菌提取物抑菌效果的影响

不同碳源提取物对 6 种耐药性致病细菌抗菌效

果见表 2。9 种碳源提取物在 50mg/mL 浓度下对鲍曼不动杆菌和绿脓杆菌没有抑菌效果。man 提取物抗菌效果较好，对 MRSA 抑菌圈达到 8.8mm，glu

次之。ino 提取物对 6 种细菌均无抗性。总体来说该浓度下的不同碳源发酵提取物对 6 种耐药性致病细菌抑菌效果都较弱。

表 2 不同碳源发酵 YFCCFQ001 提取物对 6 种耐药性致病细菌抑菌效果

Tab. 2 Antibacterial activity of YFCCFQ001 extracts to 6 resistance pathogenic bacteria from different carbon sources

碳源	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	鲍曼不动杆菌	粪肠球菌	溶血性葡萄球菌	绿脓杆菌
ino	-	-	-	-	-	-
luc	-	-	-	-	7.2±0.12	-
man	8.2±0.09	8.8±0.16	-	8.3±0.05	8.0±0.07	-
mal	7.8±0.18	8.0±0.20	-	8.2±0.15	7.3±0.10	-
sor	-	7.1±0.04	-	7.0±0.07	7.2±0.11	-
fru	7.6±0.13	7.0±0.19	-	7.1±0.08	7.7±0.17	-
suc	7.5±0.05	8.1±0.06	-	8.0±0.22	7.6±0.13	-
sta	7.0±0.04	-	-	-	7.5±0.03	-
glu	8.3±0.07	8.0±0.14	-	8.4±0.21	7.3±0.04	-



图 2 不同碳源发酵 YFCCFQ001 提取物对无乳链球菌抑菌效果

注：11 为 ino，12 为 luc，13 为 man，14. mal，15 为 sor，16 为 fru，17 为 suc，18 为 sta，19 为 glu

Fig. 2 Antibacterial activity of YFCCFQ001 extracts to *Streptococcus agalactiae* from different carbon sources

不同碳源培养球孢白僵菌所获得提取物在 50mg/mL 对 8 种普通人体致病细菌均有抑菌效果，ino、luc、sor 3 种碳源提取物抗菌活性略弱（抑菌圈直径 11.5mm 左右），其他 6 种碳源所得提取物抗菌活性差异不显著（抑菌圈直径均 15mm 左右）（图 2）。

### 2.3.2 不同氮源对球孢白僵菌提取物抑菌活性的影响

不同氮源提取物对球孢白僵菌抗菌活性影响显著。对 6 种耐药性致病细菌的抗性结果见表 3。胰蛋白胨（SGY1）发酵提取物对耐药性致病细菌大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌有抑菌活性。酪蛋白胨（SGL）提取物对耐药性致病细菌绿脓杆菌有抑菌活性。其余 4 种氮源提取物对 6 种耐药性致病细菌均无活性。

表 3 不同氮源培养 YFCCFQ001 提取物对 6 种耐药性致病细菌抑菌效果

Tab. 3 Antibacterial activity of YFCCFQ001 extracts to 6 resistance pathogenic bacteria in different nitrogen sources

	SGT	SGP	SGY1	SGB	SGL	SGB1	SGM1
大肠埃希菌	-	-	7.0±0.21	-	-	-	-
金黄色葡萄球菌	-	-	8.0±0.16	-	-	-	-
鲍曼不动杆菌	-	-	-	-	-	-	-
粪肠球菌	-	-	7.5±0.14	-	-	-	-
溶血性葡萄球菌	-	-	-	-	-	-	-
绿脓杆菌	-	-	-	-	8.0±0.20	-	-

对 8 种普通致病细菌的抗菌结果显示：6 种氮源中，胰蛋白胨（SGY1）抗菌效果最好，除对短小芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌没有抗性外，对其余 6 种致病细菌均有明显的抗菌活性，且对副溶血性

弧菌效果最好，抑菌圈达到 16.0mm。香蕉粉（SGB1）和麦芽浸粉（SGM1）对 8 种细菌均无抗菌活性（图 3）。

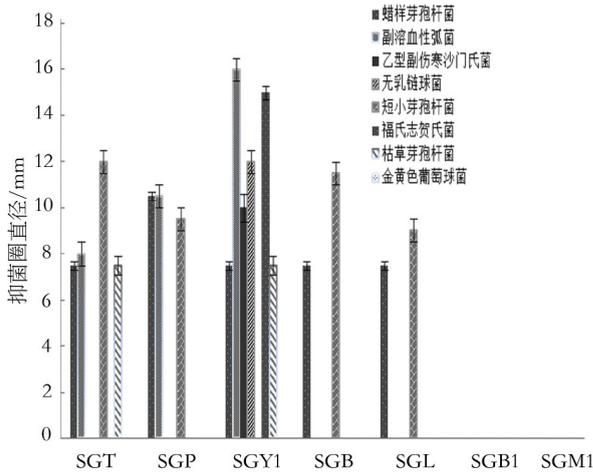


图3 YFCCFQ001不同氮源提取物对8种普通致病细菌抗菌活性影响

Fig. 3 Antibacterial activity of YFCCFQ001 extracts to 8 pathogenic bacteria in different nitrogen sources

### 3 结论与讨论

球孢白僵菌作为常见的生防真菌，其抗菌活性已有报道，球孢白僵菌中抗菌成分主要为白僵菌素。白僵菌素对大肠杆菌、粪肠球菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、溶血性葡萄球菌等多种细菌具有抗菌活性<sup>[11-13]</sup>。但对耐药性致病细菌的抗菌活性还未见报道。本研究首次发现了球孢白僵菌对5种耐药性致病细菌（绿脓杆菌、溶血性葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、大肠埃希菌）具有抗菌活性，其次对普通副溶血性弧菌、短小芽孢杆菌、无乳链球菌、福氏志贺氏菌以及乙型副伤寒沙门氏菌也具有良好的抗菌活性，显示出球孢白僵菌成为新型广谱抗生素的巨大潜能。为深入研究球孢白僵菌的抗菌活性，本研究还采用OSMAC策略，探究不同碳氮源对其抗菌活性的影响。

OSMAC策略强调通过改变培养基成分、培养条件及添加酶抑制剂等方法，尽可能挖掘微生物合成次级代谢产物的能力，从而获得更多结构类型的次级代谢产物。该策略的提出，为深入开发微生物天然产物这一资源提供了便捷有效的手段<sup>[18]</sup>。研究表明，不同碳氮源对球孢白僵菌抗菌活性确实有影响，尤其是氮源对球孢白僵菌YFCCFQ001的抗菌活性影响十分显著。香蕉粉和麦芽浸粉发酵粗提物对所有供试细菌均无活性。胰蛋白胨作为氮源所收获的提取物对多种致病细菌有较好的抑菌效果，但对短小芽孢杆菌没有抑菌作用，马铃薯粉、

牛肉浸粉在内的4种氮源发酵提取物虽总体抗菌效果不如胰蛋白胨，但对短小芽孢杆菌具有抗菌活性。因此可推测，不同氮源培养的球孢白僵菌YFCCFQ001产生的抗菌活性成分可能不是同一种，所以导致粗提物对几种供试细菌的抗菌活性有所差异。类似的情况已有报道，如林淑婷等<sup>[19]</sup>发现，不同发酵条件下，海南粗榧中一种内生真菌的代谢产物种类和产量均有明显差异。但本研究中所使用样品仅为球孢白僵菌YFCCFQ001的发酵液粗提物，对于起抗菌作用的成分还有待确定。下一步，将用大量发酵球孢白僵菌YFCCFQ001，对提取物进行分离纯化鉴定等工作，确定提取物中抗菌活性成分。同时采用分子手段，探究不同氮源下球孢白僵菌YFCCFQ001基因表达的差异，以期明确抗菌化合物的合成途径，大量获得抗菌化合物，为球孢白僵菌中天然抗菌产物的开发和利用提供理论依据，也为其他真菌中天然产物的寻找和利用提供思路。

### 参考文献:

- [1] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2016年中国CHINET细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(5): 481-491.
- [2] Wang W X, Kusari S, Laatsch H, et al. Antibacterial Azaphilones from an Endophytic Fungus, *Colletotrichum* sp. BS4 [J]. Journal of Natural Products, 2016, 79(4): 704-710.
- [3] 华梅, 王垚, 肖支叶, 等. 贵州绿僵菌液体培养提取物抑菌活性研究[J]. 西南林业大学学报(自然科学版), 2018, 38(2): 134-140.
- [4] 刘鑫, 侯若琳, 刘建兵, 等. 球孢白僵菌深层发酵液抗乳腺癌活性部位筛选及成分分析[J]. 菌物学报, 2017(12): 1659-1666.
- [5] Lin H I, Lee Y J, Chen B F, et al. Involvement of Bcl-2 family, cytochrome c, and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in human non-small cell lung cancer cells [J]. Cancer Letters, 2005, 230(2): 248-259.
- [6] Zhan J, Burns A M, Liu M X, et al. Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: Beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum* [J]. Journal of Natural Products, 2007, 70(2): 227-232.
- [7] Jow G M, Chou C J, Chen B F, et al. Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome c, release, caspase 3 activation; the causative role of calcium [J]. Cancer Letters, 2004, 216(2): 165-173.