

芽孢杆菌脂肽对金黄色葡萄球菌的抑制机理

纪帅奇^{1,2}, 乌日娜^{1,2,3}, 张淘崴^{1,3}, 娄梦雪^{1,2}, 张妍^{1,3}, 武俊瑞^{1,2,3*}

(¹ 沈阳农业大学食品学院 沈阳 110866

² 辽宁省食品发酵技术工程研究中心 沈阳 110161

³ 沈阳市微生物发酵技术创新重点实验室 沈阳 110866)

摘要 为了减少因滥用抗生素而导致的金黄色葡萄球菌耐药性的增长,本研究旨在寻找天然、安全的抑菌物质替代传统抗生素治疗金黄色葡萄球菌感染。研究选取贝莱斯芽孢杆菌 SN-20、解淀粉芽孢杆菌 SN-31、解淀粉芽孢杆菌 SN-34、解淀粉芽孢杆菌 SN-36、枯草芽孢杆菌 SN-43、解淀粉芽孢杆菌 SN-46 共 6 株芽孢杆菌进行薄层分析、脂肽稳定性测试以及脂肽抑菌机制的测定。结果表明:6 株芽孢杆菌可产生表面活性素、芬原素和伊枯草菌素等脂肽,其中贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 和解淀粉芽孢杆菌 SN-46 脂肽粗提物对金黄色葡萄球菌表现出显著的抑制效果,抑菌圈直径均达到 12.5 mm 以上,最小抑菌浓度(MIC)分别为 1.25 mg/mL 和 2.5 mg/mL。2 株芽孢杆菌产生的脂肽分别在 pH 值为 3 和 11、温度 100 °C 以及蛋白酶 K 处理下仍能保持抑菌效果,表明脂肽具有良好且稳定的抑菌特性。进一步分析发现,脂肽通过破坏细胞膜结构、增加细胞膜通透性、抑制蛋白质合成等多种机制对金黄色葡萄球菌产生抑制作用,且这种多机制的作用不易产生耐药性。本研究表明,芽孢杆菌产生的脂肽具有良好的应用前景,有望开发为新的抗金黄色葡萄球菌药物。

关键词 芽孢杆菌; 脂肽; 金黄色葡萄球菌; 抑菌机制

文章编号 1009-7848(2024)08-0197-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.08.019

金黄色葡萄球菌为食品中常见的腐败致病菌,是引起流行性疾病和食物中毒的头号致病菌,生肉及肉制品、蛋制品、牛奶和烘焙等食品均易受金黄色葡萄球菌污染^[1]。目前,杀灭金黄色葡萄球菌的传统方法是使用抗生素,然而,随着抗生素的滥用,金黄色葡萄球菌逐渐出现耐药性,在污染食品的同时还会严重危害人类的健康^[2]。寻找新的抑菌物质替代抗生素,对于保障食品安全和人体健康具有重要意义。随着对益生菌的不断开发,研究者发现脂肽作为芽孢杆菌的次级代谢产物之一,具有良好的抑菌性、耐热性、耐酸碱、安全无毒和稳定性等特点,在食品保鲜、生物制药、生物防治和工业生产等领域广泛应用^[3-6]。此外,脂肽的抗菌机理与抗生素完全不同,不易使微生物产生耐药性,并对耐药微生物仍具有抗性作用,因此脂肽类逐渐代替抗生素,成为新的抗菌药物^[7-8]。

本文研究前期从东北传统豆酱中筛选出具有

脂肽合成基因的 6 株芽孢杆菌,提取它们产生的脂肽并进行稳定性分析。此外,探究脂肽对金黄色葡萄球菌的抑菌机制,为抗金黄色葡萄球菌新药物的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株 贝莱斯芽孢杆菌 SN-20、解淀粉芽孢杆菌 SN-31、解淀粉芽孢杆菌 SN-34、解淀粉芽孢杆菌 SN-36、枯草芽孢杆菌 SN-43、解淀粉芽孢杆菌 SN-46、金黄色葡萄球菌,均出自沈阳农业大学食品学院菌库中,保存于-80 °C 冰箱。

1.1.2 试验所用试剂药品 LB 培养基,上海唯地生物技术有限公司;茚三酮,湖北巨胜科技有限公司;甘油,云南西力生物技术股份有限公司;无水乙醇,兴源化工有限公司。

1.1.3 主要仪器 ZY-40MA 立式灭菌锅,浙江新丰医疗器械有限公司;3-18N 台式高速离心机,湖南恒诺仪器设备有限公司。

1.2 芽孢杆菌生长曲线

将 6 株芽孢杆菌在 LB 培养基中活化,37 °C 培养 24 h,每隔 2 h 分别取菌液 5 mL,测量波长

收稿日期: 2023-08-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32172279);沈阳市科技创新平台项目(21-103-0-14,21-104-0-28)

第一作者: 纪帅奇,男,博士生

通信作者: 武俊瑞 E-mail: junruiwu@126.com

600 nm 处的吸光值,绘制菌株生长曲线^[9]。

1.3 脂肽的提取

1.3.1 粗提物的制备及抑菌试验 芽孢杆菌发酵滤液离心,收集上清液滤液,残留的菌体称重后记录。调解上清液 pH 值至 2.0 于 4 °C 冰箱中过夜,离心收集沉淀,甲醇反复萃取,调节萃取液 pH 值至 7.0,经 0.22 μm 滤膜过滤后,得到脂肽粗提液,旋转蒸发后获得的棕黄色固体物质即为脂肽粗提物^[10]。

1.3.2 薄层层析 将脂肽溶解于少量甲醇中,取两组薄层层析板,分别点样 10 μL 后,以氯仿、甲醇、水混合液 ($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=65:25:4$) 为流动相进行层析。A 组干燥后直接喷含 0.5% 茚三酮溶液显色观察,B 组将干燥后的薄板放入装有 1 mL 浓盐酸的耐高温的密封容器中,烘箱 110 °C 熏蒸 1 h 进行原位酸水解,待盐酸挥发后茚三酮试剂显色,按式(1)计算迁移率 (R_f)^[11]。

$$R_f = \frac{\text{样品斑点中心的移动距离}}{\text{流动相前沿的移动距离}} \quad (1)$$

1.4 脂肽抑菌试验

利用灭菌后的生理盐水将金黄色葡萄球菌制成活菌数为 10^6 CFU/mL 的菌悬液。采用滤纸片法进行脂肽抑菌试验,在滤纸片上分别滴加 20 μL 微孔滤膜过滤后的脂肽粗提物,24 h 后测量抑菌圈大小^[12]。

1.5 脂肽稳定性测定

1.5.1 pH 值对菌株脂肽类化合物的影响 将脂肽粗提物的 pH 值调节至为 3.0,5.0,7.0,9.0,11.0 后,再向滤纸片中加入不同 pH 值的粗提液,培养 24 h,测量抑菌圈直径^[13]。

1.5.2 温度对菌株脂肽类化合物的影响 芽孢杆菌脂肽粗提物分别在 50,80,100 °C 下水浴处理 25 min 后,再分别向滤纸片中加入不同温度下处理过的粗提液,培养 24 h,测量抑菌圈直径。

1.5.3 蛋白酶 K 对菌株脂肽类化合物的影响 向芽孢杆菌脂肽粗提物中加入蛋白酶 K 使溶液终质量浓度达到 20 mg/mL,放置于水浴锅中,50 °C 水浴 30 min,抑菌能力方法与 1.4 节相同,测量抑菌圈直径^[14]。

1.6 脂肽对金黄色葡萄球菌抑菌机制

1.6.1 金黄色葡萄球菌生长抑制曲线 分别向金

黄色葡萄球菌培养基中加入等体积 $0.8 \times \text{MIC}$ 的芽孢杆菌粗脂肽,设置向金黄色葡萄球菌培养基中加入甲醇和无菌水作为空白对照组,培养时取不同时间点的样品检测 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 吸光值,并绘制生长曲线。

1.6.2 脂肽对金黄色葡萄球菌最小抑菌浓度 (MIC) 测定 为探索脂肽的抑菌机制,选用金黄色葡萄球菌作为指示菌。向金黄色葡萄球菌培养基中加入芽孢杆菌脂肽粗提物,使其终质量浓度达到 10,5,2.5,1.25,0.625,0.313,0.156 mg/mL,培养 24 h,观察并记录金黄色葡萄球菌菌体生长状况^[15]。

1.6.3 脂肽对金黄色葡萄球菌细胞膜透性测定 向活化后的金黄色葡萄球菌培养基中加入贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 和解淀粉芽孢杆菌 SN-46 脂肽粗提物,使其终浓度为 $0.8 \times \text{MIC}$,分别在 0,15,30,45,60,75,90,105,120 min 时取 9 mL 菌悬液,测定其在波长 210 nm 处的吸光值^[16]。

1.6.4 脂肽作用下金黄色葡萄球菌蛋白质合成测定 向金黄色葡萄球菌培养基中加入贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 和解淀粉芽孢杆菌 SN-46 脂肽粗提物,使其浓度为 $0.8 \times \text{MIC}$,培养 12 h。离心收集菌体并向沉淀中加入 10 μL 上样缓冲液和 100 μL 无菌水,100 °C 保温 8 min,再次离心,进行 SDS-PAGE 电泳,观察记录电泳条带^[17]。

1.6.5 金黄色葡萄球菌扫描电镜的制备与观察 向金黄色葡萄球菌培养基中加入贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 和解淀粉芽孢杆菌 SN-46 脂肽粗提物,使其终浓度为 $0.8 \times \text{MIC}$,培养 12 h 后离心收集并洗涤菌体,于 4 °C 条件下 2.5% 戊二醛固定过夜,涂片风干,扫描电镜下观察^[18]。

2 结果

2.1 芽孢杆菌生长曲线

6 株芽孢杆菌生长曲线测定的结果如图 1 所示。

由图 1 可观察到,贝莱斯芽孢杆菌 SN-20、解淀粉芽孢杆菌 SN-31、解淀粉芽孢杆菌 SN-34、解淀粉芽孢杆菌 SN-36、枯草芽孢杆菌 SN-43、解淀粉芽孢杆菌 SN-46 在 37 °C 下不同培养时间的生长情况,发现 0~4 h 为菌体调整期,是刚进入新环

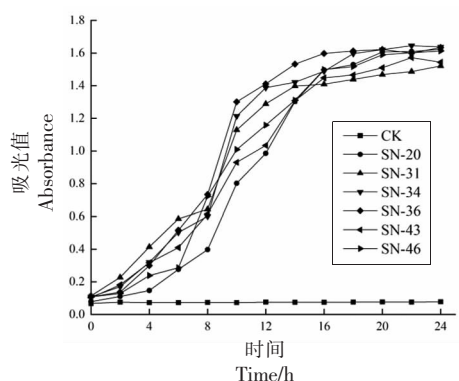
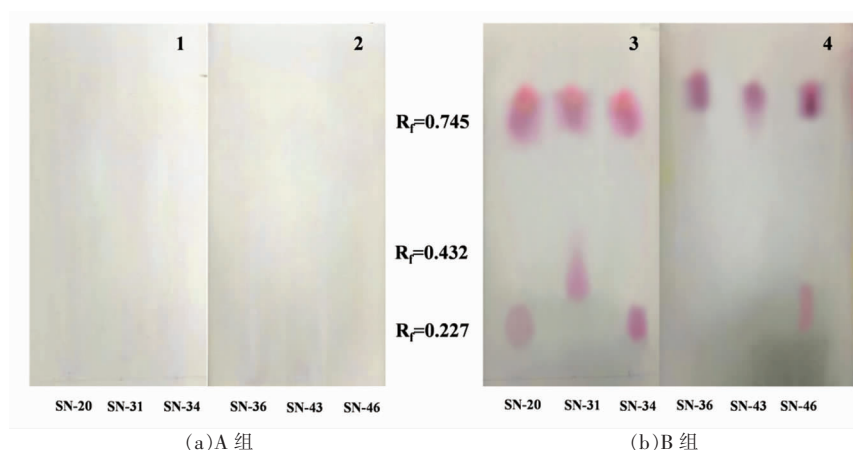


图 1 6 株芽孢杆菌生长曲线

Fig.1 Growth curve of six *Bacillus* strains

境的适应期;6 株芽孢杆菌均在 4~16 h 快速生长繁殖,进入对数生长期,此时菌体生长旺盛;16~24 h 为稳定生长期,一般芽孢杆菌脂肽在此时期逐渐产生。



注:A 组 1 和 2 为 6 株芽孢杆菌脂肽粗提物薄层层析展开与茚三酮显色结果,B 组 3 和 4 为 6 株芽孢杆菌脂肽粗提物薄层层析展开,经盐酸酸解后与茚三酮显色结果。

图 2 芽孢杆菌脂肽粗提物 TLC 层析

Fig.2 TLC chromatography of *Bacillus* lipopeptide crude extract

2.3 脂肽抑菌试验

6 株芽孢杆菌产生的粗提物对金黄色葡萄球菌的抑制效果如图 3 所示。

由图 3 可以看出,贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 和解淀粉芽孢杆菌 SN-46 脂肽粗提物对金黄色葡萄球菌的抑制效果最好,抑制直径可达到 12.5 mm 以上。

2.4 脂肽稳定性测定

选用金黄色葡萄球菌为指示菌探索脂肽稳定

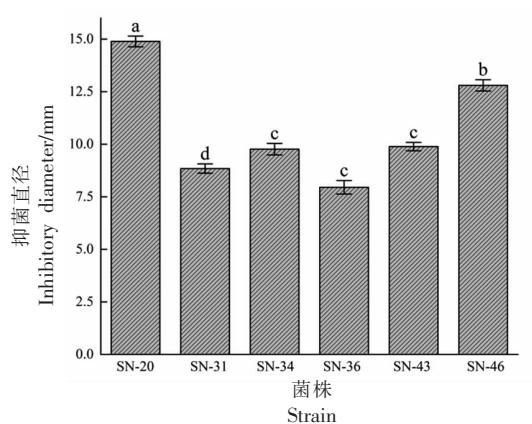
2.2 薄层层析

为确定 6 株菌粗提物质的成分组成及种类,对其进行了 TLC 层析试验,结果如图 2 所示。

由图 2 可知,A 组两板没有斑点,而 B 组两板均有斑点,说明 A 组两板没有游离的氨基无法显色,而 B 组酸解后成分中出现游离的氨基进而出现颜色。从显色判断出,6 株芽孢杆菌产生的脂肽为环形脂肽,无游离的氨基,酸解后破坏环形结构才会出现游离的氨基。B 组板分别在比移值 0.227,0.432,0.745 附近处出现显色斑点。结合相关文献可知芬原素迁移值为 0.150~0.230,杆菌霉素、伊枯草菌素和表面活性素迁移值分别为 0.300,0.430,0.700~0.764^[19],因此推测 6 株芽孢杆菌均可以产生表面活性素,贝莱斯芽孢杆菌 SN-20、解淀粉芽孢杆菌 SN-34 和解淀粉芽孢杆菌 SN-46 还可产生芬原素,解淀粉芽孢杆菌 SN-31 还可产生伊枯草菌素。

性测定。pH 值对脂肽稳定性影响如图 4 所示。

由图 4 可知,以 pH 值为 7 作为空白对照组,6 株芽孢杆菌脂肽均在 pH 值为 7 时抑菌活性最大,在 3,5,7,9,11 不同 pH 值条件下对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径差异显著。当 pH 值下降至 3.0 时,脂肽抑菌活性虽然有所下降,抑菌圈大小总体下降幅度范围在 10.08%~23.85%之间,但均具有抑菌性,说明脂肽对酸性条件有一定的耐受,在较强酸性环境下抑菌活性会有所降低。



注:不同小写字母表示各菌株之间显著差异($P < 0.05$)。

图3 芽孢杆菌脂肽粗提物对金黄色葡萄球菌的抑制直径

Fig.3 Inhibition diameter of *Bacillus* lipopeptide crude extract on *Staphylococcus aureus*

温度和蛋白酶 K 对脂肽稳定性影响如图 5 所示。

由图 5 可知,随着温度的升高,脂肽在 20~80 °C 时相对稳定,抑菌活性无明显的降低。当温度升至 100 °C 时,抑菌活性虽有一定程度的降低,但下降率低于 4%,表明脂肽有一定的耐热性。此外,6 株菌产生的脂肽分别经蛋白酶 K 处理后抑菌活性没有明显变化,说明脂肽对蛋白酶 K 不敏感。

2.5 脂肽的抑菌机制

2.5.1 金黄色葡萄球菌生长抑制曲线 前期抑菌试验表明贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 和解淀粉芽孢杆菌 SN-46 号产生的脂肽对金黄色葡萄球菌抑

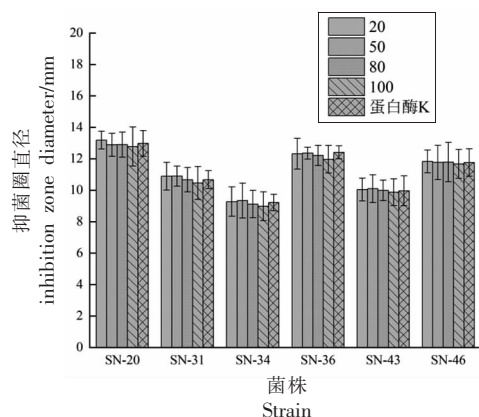


图5 温度和蛋白酶 K 对脂肽稳定性的影响

Fig.5 Effects of temperature and proteinase K on the stability of lipopeptides

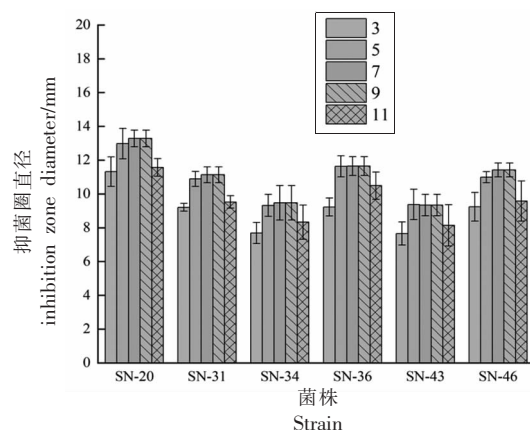


图4 pH 值对脂肽稳定性的影响

Fig.4 Effects of pH value on the stability of lipopeptides

制效果优于其它菌株,因此选取此 2 株芽孢杆菌作为研究对象,探究脂肽的抑菌机制。脂肽对金黄色葡萄球菌生长抑制曲线,结果如图 6 所示。

由图 6 可知,甲醇处理组金黄色葡萄球菌生长曲线相比于无菌水处理组无明显变化,说明溶剂对菌体生长无影响。而加入 0.8×MIC 的贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 和解淀粉芽孢杆菌 SN-46 的试验组与对照组相比,从 6 h 开始,不同时间段加入脂肽的菌液 OD_{600nm} 吸光值均比空白对照组低,表明脂肽从 6 h 开始对菌体的生长有抑制作用,且贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 抑制效果优于解淀粉芽孢杆菌 SN-46。

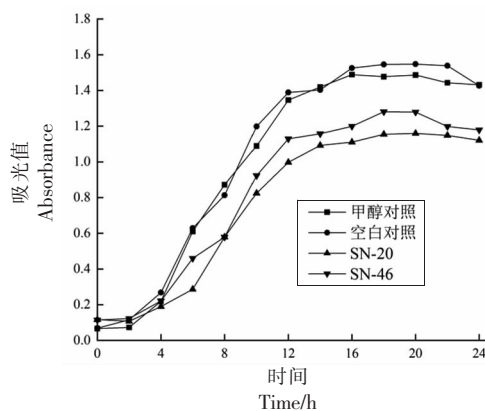


图6 芽孢杆菌脂肽对金黄色葡萄球菌生长抑制曲线

Fig.6 Growth inhibition curve of *Bacillus* lipopeptide on *Staphylococcus aureus*

2.5.2 脂肽对金黄色葡萄球菌最小抑菌浓度 (MIC) 测定 贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 和解淀粉芽

孢杆菌 SN-46 脂肽对金黄色葡萄球菌最小抑菌浓度进行试验,结果如表 1 所示。

表 1 脂肽对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度

Table 1 Minimum inhibitory concentration of lipopeptide against *Staphylococcus aureus*

脂肽质量浓度/(mg/mL)	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156
SN-20	-	-	-	-	+	+	+
SN-46	-	-	-	+	+	+	+

注:“+”指有菌生长;“-”指无菌生长。

由表 1 可知,贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 和解淀粉芽孢杆菌 SN-46 脂肽对金黄色葡萄球菌的抑制效果明显,贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 最小抑制浓度达到 1.25 mg/mL, 解淀粉芽孢杆菌 SN-46 最小抑菌浓度达到 2.5 mg/mL。

2.5.3 脂肽对金黄色葡萄球菌细胞膜透性的测定

脂肽对细胞膜通透性的影响结果如图 7 所示。

由图 7 可知,贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 和解淀粉芽孢杆菌 SN-46 脂肽处理组在波长 210 nm 处的吸收光度值大于无菌水和甲醇溶剂对照组,随着脂肽作用时间增加吸光值逐渐升高,且贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 处理组吸光值高于解淀粉芽孢杆菌 SN-46 处理组,推测脂肽的加入使菌体内部的 DNA 和 RNA 等大分子物质外渗,进而抑制了细菌的生长,且贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 脂肽对菌体内部破坏优于解淀粉芽孢杆菌 SN-46 菌株。

2.5.4 脂肽对金黄色葡萄球菌蛋白质合成的测定

脂肽对金黄色葡萄球菌蛋白质合成的测定如图 8 所示。

由图 8 可知,对照组处理的金黄色葡萄球菌的蛋白条带颜色较深,说明菌株蛋白质合成正常。而经过贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 和解淀粉芽孢杆菌 SN-46 脂肽处理的金黄色葡萄球菌的蛋白条带颜色明显变浅,说明金黄色葡萄球菌经脂肽处理之后,脂肽对其蛋白合成受到抑制,进而起到抑菌效果。

2.5.5 脂肽对金黄色葡萄球菌扫描电镜的制备与观察 通过扫描电镜观察脂肽对金黄色葡萄球菌菌体结构等的影响,结果如图 9 所示。

图 9a、9b 可以看出,对照组的金黄色葡萄球菌形状为球形,菌体形态一致,排列紧簇,细胞完整正常,未见任何细胞残体及内容物溢出;图 9c、

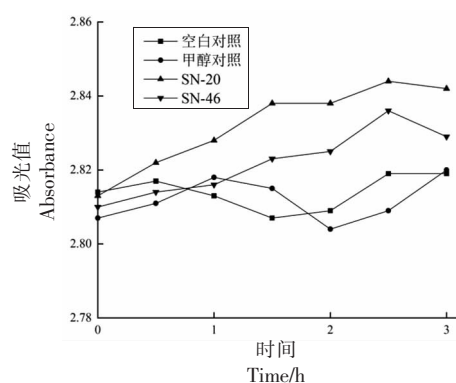


图 7 脂肽对金黄色葡萄球菌细胞膜透性的影响

Fig.7 Effects of lipopeptide on cell membrane permeability of *Staphylococcus aureus*

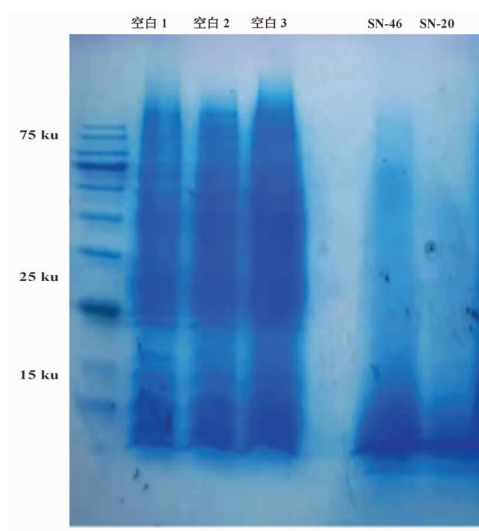


图 8 脂肽对金黄色葡萄球菌蛋白质合成的影响

Fig.8 Effects of lipopeptides on protein synthesis of *Staphylococcus aureus*

9d 可以看出,贝莱斯芽孢杆菌 SN-20 和解淀粉芽孢杆菌 SN-46 脂肽处理组有的细胞表面褶皱有部分凹陷,少数产生小孔洞,有的细胞是断裂、残缺的,形态不一,细胞内容物大量溢出,呈空洞状,

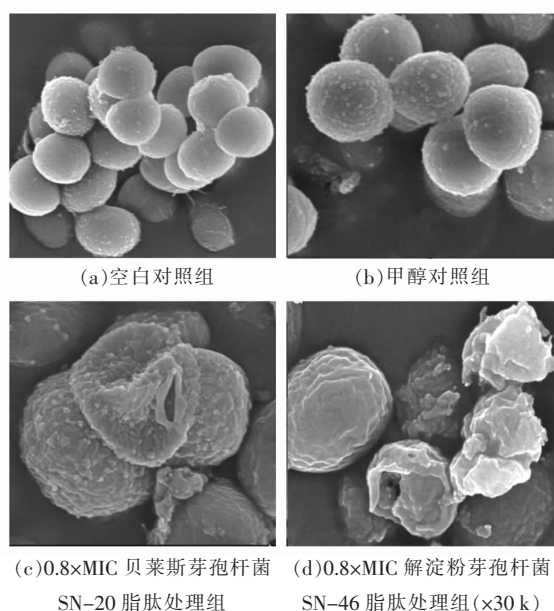


图9 金黄色葡萄球菌在扫描电镜下的微观形态结构图
Fig.9 Microstructure of *Staphylococcus aureus* under scanning electron microscope

使金黄色葡萄球菌死亡。

3 讨论

脂肽通常在芽孢杆菌发酵培养后期产生,主要包括表面活性素、芬原素和伊枯草菌素,这些脂肽在抑菌特性及其他特性上均有一定差异^[20]。研究发现,表面活性素是一类具有较强生物表面活性的物质,有较强的溶血活性,表面活性素对高温、酸碱和盐的耐受特性良好,具有抵抗溃疡,降低胆固醇,抗击炎症的功效^[21];芬原素可改变生物膜结构和通透性,起到抗菌作用,其对大量的丝状真菌和少部分细菌都表现出直接抗菌活性^[22];伊枯草菌素具有较强溶血性的抗活性,可以抑制部分细菌生长,对真菌抑制效果优于细菌,此外,还具有灭虫和抵抗病毒等作用^[23]。本研究对6株芽孢杆菌产生的脂肽进行提取和薄层层析试验,推测6株芽孢杆菌产生的物质为表面活性素、芬原素和伊枯草菌素3种环形脂肽。结合抑菌试验发现6株菌株产生的脂肽均对金黄色葡萄球菌有抑制效果,贝莱斯芽孢杆菌SN-20和解淀粉芽孢杆菌SN-46芽孢杆菌抑制效果最佳,与Zhang等^[24]研究结论相同。脂肽可对金黄色葡萄球菌产生良

好效果且对pH值、温度和蛋白酶K均有一定的耐受性,与Hsieh等^[25]和Lei等^[26]的研究结果一致,表明脂肽具有良好的稳定性,在一定极端条件下仍有效果。

金黄色葡萄球菌作为食源性致病菌可引起各种感染,如败血症、脓毒症、心内膜炎和肺炎^[27-28]。这种细菌还有可能污染动物产品,能在加工、制备、包装、切碎和储存过程中进入食物链,其可产生对热稳定的葡萄球菌肠毒素,食入人体可能引起剧烈呕吐和腹泻,这也是人类葡萄球菌食物中毒的主要原因。此外,抗生素的滥用导致了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的出现,这种耐药细菌很容易通过食物转移给人类,导致潜在的感染^[29-30]。因此,寻找替代传统抗生素的新抑菌药物迫在眉睫。本研究为探究脂肽的抑菌机制,在对金黄色葡萄球菌核酸类物质泄露、蛋白合成和细胞壁和细胞膜结构影响的试验中,发现经脂肽处理过的试验组菌体细胞形态不一且数量减少,细胞膜的完整性遭到破坏,胞壁和细胞膜表面褶皱或形成孔洞,菌体内部DNA和RNA等大分子内容物可能泄露,且蛋白质合成受到抑制,表明脂肽的抑制机制与抗生素完全不同,具有多种抑菌机制,不易产生耐药性,安全高效,有望作为传统抗生素的替代品。

4 结论

本研究对从东北传统发酵豆酱中的产脂肽芽孢杆菌进行研究,推测贝莱斯芽孢杆菌SN-20、解淀粉芽孢杆菌SN-31、解淀粉芽孢杆菌SN-34、解淀粉芽孢杆菌SN-36、枯草芽孢杆菌SN-43、解淀粉芽孢杆菌SN-46这6株芽孢杆菌均可产生表面活性素型脂肽,此外贝莱斯芽孢杆菌SN-20、解淀粉芽孢杆菌SN-34和解淀粉芽孢杆菌SN-46可产生芬原素型脂肽,解淀粉芽孢杆菌SN-31还可产生伊枯草菌素型脂肽。对脂肽稳定性测试发现脂肽对热、酸碱和蛋白酶K均有良好的稳定性。对脂肽的抑菌机制测定发现,脂肽通过影响金黄色葡萄球菌的核酸类物质泄露、蛋白合成和细胞壁和细胞膜结构而发挥抑菌作用,多种抑菌机制表明脂肽不易对金黄色葡萄球菌产生耐药性,有望作为安全高效的抑菌剂开发。

参 考 文 献

- [1] HUANG Z Q, YU X, YANG Q L, et al. Aptasensors for *Staphylococcus aureus* risk assessment in food[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 714265.
- [2] SINGH S, NUMAN A, SOMAILY H H, et al. Nano-enabled strategies to combat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2021, 129: 112384.
- [3] KIESEWALTER H T, LOZANO-ANDRADE C N, WIBOWO M, et al. Genomic and chemical diversity of *Bacillus subtilis* secondary metabolites against plant pathogenic fungi[J]. *Msystems*, 2021, 6(1): e00770-20.
- [4] ZHU Z W, ZHANG B Y, CAO Y, et al. A critical review on the environmental application of lipopeptide micelles[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 339: 125602.
- [5] WANG H D, XIU J L, HUANG L X, et al. Study on the application potential of lipopeptide fermentation broth in oil recovery[J]. *Energy Science & Engineering*, 2022, 10(7): 2065-2075.
- [6] WU Y B, ZHOU L B, LU F X, et al. Discovery of a novel antimicrobial lipopeptide, brevibacillin V, from *Brevibacillus laterosporus* fmb70 and its application on the preservation of skim milk[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(45): 12452-12460.
- [7] LIU Y L, MA A J, HAN P P, et al. Antibacterial mechanism of brevilaterin B: An amphiphilic lipopeptide targeting the membrane of *Listeria monocytogenes*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(24): 10531-10539.
- [8] 翟少伟, 李剑, 史庆超. 抗菌脂肽 Surfactin 的抗菌活性及应用[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(5): 1333-1340.
- ZHAI S W, LI J, SHI Q C. Antimicrobial lipopeptide surfactin: Antimicrobial activity and applications[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(5): 1333-1340.
- [9] 张睿, 王广军, 李志斐, 等. 枯草芽孢杆菌对铜绿微囊藻抑制效果的研究[J]. *中国环境科学*, 2015, 35(6): 1814-1821.
- ZHANG R, WANG G J, LI Z F, et al. Inhibition of *Microcystis aeruginosa* by *Bacillus subtilis* [J]. *China Environmental Science*, 2015, 35(6): 1814-1821.
- [10] MA Y X, KONG Q, QIN C, et al. Identification of lipopeptides in *Bacillus megaterium* by two-step ultrafiltration and LC-ESI-MS/MS[J]. *Amb Express*, 2016, 6(1): 79.
- [11] SHARAFI H, ABDOLI M, HAJFARAJOLLAH H, et al. First report of a lipopeptide biosurfactant from thermophilic bacterium *Aneurinibacillus thermoaerophilus* MK01 newly isolated from municipal landfill site[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 173(5): 1236-1249.
- [12] 张学雯, 王奕丁, 李红亚, 等. 黄曲霉拮抗菌 B10-6-1 脂肽类抗生素粗提物的性质与抑菌机理研究[J]. *湖北农业科学*, 2019, 58(14): 70-75.
- ZHANG X W, WANG Y D, LI H Y, et al. Studies on the properties and antibacterial mechanism of crude lipopeptide extracts from *Aspergillus flavus* antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* B10-6-1[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2019, 58(14): 70-75.
- [13] CERESA C, RINALDI M, CHIONO V, et al. Lipopeptides from *Bacillus subtilis* AC7 inhibit adhesion and biofilm formation of *Candida albicans* on silicone[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2016, 109(10): 1375-1388.
- [14] 靳鹏飞. 解淀粉芽孢杆菌 HAB-2 抑菌化合物分离鉴定及关键基因调控机制研究[D]. 海口: 海南大学, 2016.
- JIN P F. Isolation and identification of antimicrobial substance produced from *Bacillus amyloliquefaciens* HAB-2 and the regulation mechanism of key genes [D]. Haikou: Hainan University, 2016.
- [15] 李钰芳, 杨昆, 顾韦维, 等. 乳源抗菌肽 BCp12 对金黄色葡萄球菌多靶点抑菌机制[J]. *食品科学*, 2021, 42(23): 34-41.
- LI Y F, YANG K, GU W W, et al. Multi-target antibacterial mechanism of milk-derived antimicrobial peptide BCp12 against *Staphylococcus aureus* [J]. *Food Science*, 2021, 42(23): 34-41.
- [16] 张兴梅, 薛桥丽, 肖蓉, 等. 扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌抑菌机理的研究[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(1): 82-88.

- ZHANG X W, XUE Q L, XIAO R, et al. Antimicrobial mechanisms of mistletoe (*Viscum articulatum*) extracts against *Staphylococcus aureus*[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(1): 82–88.
- [17] 陈飞龙, 刘渔珠, 彭勃, 等. 抗菌肽 F1 对金黄色葡萄球菌的胞内作用机制[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 36–41.
- CHEN F L, LIU Y Z, PENG B, et al. Intracellular mechanism of action of antimicrobial peptide F1 on *Staphylococcus aureus*[J]. Food Science, 2017, 38(6): 36–41.
- [18] YANG X, HUANG E, YOUSEF A E. Brevibacillin, a cationic lipopeptide that binds to lipoteichoic acid and subsequently disrupts cytoplasmic membrane of *Staphylococcus aureus* [J]. Microbiological Research, 2017, 195: 18–23.
- [19] COZZOLINO M E, DISTEL J S, GARCIA P A, et al. Control of postharvest fungal pathogens in pome fruits by lipopeptides from a *Bacillus* sp. isolate SL-6[J]. Scientia Horticulturae, 2020, 261(C): 108957.
- [20] YANG R R, LEI S Z, XU X G, et al. Key elements and regulation strategies of NRPSs for biosynthesis of lipopeptides by *Bacillus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(19): 8077–8087.
- [21] WU Y S, NGAI S C, GOH B H, et al. Anticancer activities of surfactin and potential application of nanotechnology assisted surfactin delivery[J]. Frontiers in Pharmacology, 2017, 8: 761.
- [22] INES M, DHOUHA G. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity [J]. Peptides, 2015, 71: 100–112.
- [23] 薛鹏琦, 刘芳, 乔俊卿, 等. 油菜菌核病生防芽孢杆菌的分离鉴定及其脂肽化合物分析[J]. 植物保护学报, 2011, 38(2): 127–132.
- XUE P Q, LIU F, QIAO J Q, et al. Screening of *Bacillus* strains with high inhibition on rape sclerotinia disease and its lipopeptide compounds detection [J]. Journal of Plant Protection, 2011, 38(2): 127–132.
- [24] ZHANG N, PU Y H, SUN L J, et al. Modeling the effects of different conditions on the inhibitory activity of antimicrobial lipopeptide (AMPNT-6) against *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in shrimp meat[J]. Aquaculture International, 2017, 25(1): 57–70.
- [25] HSIEH F C, LIN T C, MENG, M, et al. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A[J]. Current Microbiology, 2008, 56(1): 1–5.
- [26] LEI S, ZHAO R X, SUN J L, et al. Partial purification and characterization of a broad-spectrum bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* zrx03 isolated from infant's feces[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(5): 2214–2222.
- [27] 肖茜文. 农产品加工中沙门氏菌和金黄色葡萄球菌多重 PCR 检测试剂盒的研制[D]. 长春: 吉林农业大学, 2017.
- XIAO Q W. Study on multiplex PCR detection kits for *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in agricultural products processing[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2017.
- [28] LIU C Y, SHI C, LI M Z, et al. Rapid and simple detection of viable foodborne pathogen *Staphylococcus aureus*[J]. Frontiers in Chemistry, 2019, 7: 124.
- [29] WANG W, LIU F, ZULQARNAIN B, et al. Genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from pigs and retail foods in China[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2017, 30(8): 570–580.
- [30] YEHIA H M, AL-MASOUD A H, ALSAWMAHI O N, et al. Effects of citrox treatment on the survival of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in chicken fillets packed under vacuum[J]. Food Science and Technology, 2020, 40(3): 588–595.

The Antimicrobial Mechanism of *Bacillus* Lipopeptide against *Staphylococcus aureus*

Ji Shuaiqi^{1,2}, Wu Rina^{1,2,3}, Zhang Taowei^{1,3}, Lou Mengxue^{1,2}, Zhang Yan^{1,3}, Wu Junrui^{1,2,3*}

¹College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866

²Liaoning Engineering Research Center of Food Fermentation Technology, Shenyang 110161

³Shenyang Key Laboratory of Microbial Fermentation Technology Innovation, Shenyang 110866)

Abstract To mitigate the growth of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* due to the misuse of antibiotics, this study aimed to identify natural and safe antimicrobial substances as alternatives to traditional antibiotic treatments for *Staphylococcus aureus* infections. Six *Bacillus* strains (*Bacillus velezensis* SN-20, *Bacillus amyloliquefaciens* SN-31, *Bacillus amyloliquefaciens* SN-34, *Bacillus amyloliquefaciens* SN-36, *Bacillus subtilis* SN-43, and *Bacillus amyloliquefaciens* SN-46) were selected for thin-layer chromatography analysis, lipopeptide stability testing, and determination of the antimicrobial mechanism of lipopeptides. The results indicated that these six *Bacillus* strains could produce lipopeptides such as surfactin, fengycin, and iturin. Among them, the crude lipopeptide extracts from *Bacillus velezensis* SN-20 and *Bacillus amyloliquefaciens* SN-46 exhibited significant inhibitory effects on *Staphylococcus aureus*, with inhibition zone diameters exceeding 12.5 mm and minimum inhibitory concentrations (MIC) of 1.25 mg/mL and 2.5 mg/mL, respectively. The lipopeptides produced by these two *Bacillus* strains maintained their antimicrobial activity at pH value of 3 and 11, at a temperature of 100 °C, and after treatment with protease K, demonstrating their excellent and stable antimicrobial properties. Further analysis revealed that the lipopeptides inhibit *Staphylococcus aureus* through multiple mechanisms, including disrupting cell membrane structure, increasing cell membrane permeability, and inhibiting protein synthesis. These multi-mechanism actions make it difficult for resistance to develop. This study suggested that the lipopeptides produced by *Bacillus* strains have promising applications and could potentially be developed as new drugs to combat *Staphylococcus aureus*.

Keywords *Bacillus*; lipopeptide; *Staphylococcus aureus*; antimicrobial mechanism