

放线菌 AF1 代谢粗提物对无乳链球菌的抗菌活性

周 思 胡晓云 贺玉广 王诗琪 廖美德

华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642

摘要 为了确定放线菌 AF1 代谢粗提物对无乳链球菌的抗菌效果, 试验采用分光光度计和平板计数法确定菌株 AF1 代谢物对无乳链球菌的抗菌作用, 并与几种常见无乳链球菌抗菌药物的效果进行比较。结果表明, 放线菌 AF1 代谢粗提物对无乳链球菌有较强的抗菌作用, 最小抑菌质量浓度(MIC)为 38 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对无乳链球菌的杀菌作用表现出明显的时间剂量关系。扫描电镜结果表明作用后的无乳链球菌细胞壁严重破裂。静态法测得放线菌 AF1 代谢粗提物对斑马鱼的 LC_{50} 为 27.44 mg/L, 拌饲喂食法测得 LC_{50} 为 35.44 mg/L, 急性毒性表现为低毒。放线菌 AF1 代谢粗提物对无乳链球菌具有良好的抗菌活性, 该研究可为无乳链球菌的防治提供新的线索。

关键词 放线菌 AF1; 无乳链球菌; 抗菌作用; 急性毒性

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)02-0083-06

无乳链球菌也称为 B 族链球菌, 是一种广泛分布于自然界的溶血性革兰氏阳性菌。无乳链球菌是人类的重要病原之一, 可引起皮肤感染、产后感染、新生儿败血症和新生儿脑膜炎等, 同时也是其他多种脊椎动物包括猪、牛、鱼等的重要病原菌^[1]。目前已有多个国家报道了鱼类链球菌病的暴发与流行^[2]。危害罗非鱼的链球菌主要为海豚链球菌和无乳链球菌 2 种, 其中无乳链球菌被认为是唯一拥有 B 群特异性抗原的链球菌^[3]。罗非鱼因具有适应性强、生长快、繁殖力高和食性广等优点, 作为联合国粮农组织推荐的养殖品种, 已被世界各地广泛引种与养殖^[4]。中国为罗非鱼养殖的主要国家, 近年来无乳链球菌在全国范围内的大规模暴发流行, 导致大批罗非鱼死亡^[5], 无乳链球菌病已严重危害着中国罗非鱼养殖业的健康发展。化学药物治疗是我国鱼类疾病控制最常见的方式, 无乳链球菌对阿莫西林、磺胺、利福平等药物敏感^[6], 但药剂的大量使用引起了严重的水体污染、耐药性增强和食品安全等问题^[7]。所以, 寻找能预防或治疗无乳链球菌病的活性物质具有重要意义。

天然产物在药物发现中具有重要作用。放线菌是寻找和发现天然生物活性物质的有效资源, 也是

广泛分布于土壤中的优势微生物类群^[8]。放线菌广泛分布在自然界中, 不论数量还是种类, 在土壤中都比较多, 具有丰富的生物多样性^[9]。据统计, 目前世界上已经发现的 2 000 多种抗生素中, 大约有 56% 是由放线菌产生的, 是任何一种微生物无法相比的^[10-11]。尽管大量放线菌被研究, 但仍然有至少 90% 的放线菌未被发现。虽然未知放线菌甚多, 但发现难度大^[12]。人们目前从土壤中分离得到并加以利用的放线菌不到土壤中放线菌总数的 10%, 也就是说, 土壤中还存在大量未开发的放线菌资源。在未来 10 a 内, 对放线菌新的天然化合物库的筛选可能产生新的抗生素^[13]。

笔者所在课题组从土壤中分离筛选得到放线菌 AF1 菌株, 经 16S rDNA 序列鉴定为加利利链霉菌 (*Streptomyces galilaeus*)^[14]。初步研究发现其代谢产物具有良好抗革兰氏阳性菌作用, 尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)。笔者研究放线菌 AF1 菌株代谢物对无乳链球菌的生物活性, 以期放线菌 AF1 的进一步开发利用和无乳链球菌病的防治提供理论依据和实践基础。

收稿日期: 2017-07-21

基金项目: 广东省农村科技领域项目(2014A020208088)

周 思, 硕士研究生, 研究方向: 微生物代谢产物, E-mail: 13409930615@163.com

通信作者: 廖美德, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物与天然农药生物技术研究, E-mail: liaomeide@scau.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 材 料

1) 菌种。放线菌 AF1 由笔者所在实验室从原始森林土壤中经高氏一号培养基筛选分离得到, 4℃ 保存; 无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (SU-2) 由华南农业大学动物科学学院提供。

2) 培养基。高氏一号培养基: 可溶性淀粉 20 g, KNO₃ 1 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, NaCl 0.5 g, 水 1 000 mL, 固体加琼脂 20 g; 脑心浸液肉汤(BHI)培养基: 蛋白胨 10 g, 脱水小牛脑浸粉 12.5 g, 脱水牛心浸粉 5 g, NaCl 5 g, 葡萄糖 2 g, 磷酸氢二钠 2.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, 固体加琼脂 20 g。

1.2 放线菌 AF1 代谢粗提物的制备

用适量无菌水从 AF1 种子平板上洗脱孢子配制成孢子悬液。取适量的孢子悬液接种到液体高氏一号培养基中, 置于温度 28℃、转速 180 r/min 摇床中培养。放线菌 AF1 发酵液离心, 上清液用乙酸乙酯萃取 3 次, 合并萃取液减压蒸发, 浓缩物置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.3 无乳链球菌生长曲线的测定

1) 标准曲线。取正常状态下培养 24 h 的无乳链球菌菌液为基础, 进行梯度稀释, 利用平板计数法对不同浓度的菌悬液计数, 分光光度计测定不同浓度菌悬液的吸光值(OD₆₀₀)。以无乳链球菌菌液浓度为 x 轴, 菌液浓度对应吸光值为 y 轴绘制细菌浓度与吸光值标准曲线。

2) 无乳链球菌生长曲线。取活化后的无乳链球菌菌液 100 μ L, 接种到 50 mL/250 mL 的 BHI 培养基的三角瓶中, 置于 28℃, 转速 180 r/min 的恒温摇床中培养。每间隔 2 h, 在无菌条件下吸取无乳链球菌样品液, 于 600 nm 波长条件下, 以 BHI 培养基为参比, 测定培养液的 OD₆₀₀ 值, 每个样品重复 3 次, 根据测定的 OD₆₀₀ 值绘制无乳链球菌生长曲线。为 AF1 代谢物对无乳链球菌的抗菌测定中作用时间的确定提供参考。

1.4 放线菌 AF1 代谢粗取物对无乳链球菌的最低抑菌浓度

参考 NCCLS 方法进行, 将 AF1 代谢物乙酸乙酯粗提物用丙酮配置成 2 000 μ g/mL 的试验母液。以二倍稀释法按 10% 比例加入到 BHI 液体培养液中至终质量浓度为 200、100、50、25、12.5、6.25 μ g/mL 的含毒培养基, 然后接入 100 μ L 活化后的无

乳链球菌培养液, 测定起始 OD₆₀₀ 值(以生理盐水为对照), 然后置于 37℃, 转速 180 r/min 的恒温摇床中, 培养 12 h, 测定其 OD₆₀₀ 值, 设置 3 组平行试验。按公式 1 计算抑制率:

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照组 } \Delta\text{OD}_{600} - \text{试验组 } \Delta\text{OD}_{600}}{\text{对照组 } \Delta\text{OD}_{600}} \times 100\% \quad (1)$$

1.5 常见抗菌药物对无乳链球菌的抑菌效果比较

对常见抗菌药物利用平板打孔法进行活性对比试验。用 6 mm 打孔器在 BHI 平板上打孔, 分别加入 100 μ L 抗菌药物及 AF1 代谢粗提物, 测量 12 h 后平板的抑菌圈直径。选取药物为无乳链球菌敏感药物氨苄青霉素、头孢菌素、氯霉素和利福平。

1.6 放线菌 AF1 代谢粗提物对无乳链球菌的杀菌作用

1) 放线菌 AF1 代谢粗提物对无乳链球菌生长曲线的影响。将 AF1 代谢粗提物加入到 BHI 培养液中至浓度为 1/2 MIC、1/4 MIC, 接种无乳链球菌后于 37℃, 转速 180 r/min 的恒温摇床中振荡培养, 每隔 2 h 测定其 OD₆₀₀ 值, 以不加放线菌 AF1 代谢粗提物为对照。

2) 杀菌活性的测定。分别配置含 AF1 代谢粗提物质量浓度为 0、12.5、25、50、100、200 μ g/mL 的含毒生理盐水。取活化后的无乳链球菌培养液 1 mL, 置于无菌离心管中, 于 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清液, 沉淀用生理盐水重悬、离心、洗涤、弃上清, 重复 3 次。然后用 1 mL 不同浓度的含毒生理盐水重悬, 分别于 1、2、3 h 取样, 按平板计数法计数, 设置 3 组平行实验, 按公式 2 计算杀菌率:

$$\text{杀菌率} = \frac{\text{对照组菌落数} - \text{试验组菌落数}}{\text{对照组菌落数}} \times 100\% \quad (2)$$

3) 扫描电镜观察。本文“1.6”步骤处理后的样品经超临界干燥、真空喷镀后, 用扫描电子显微镜观察^[15], 拍照记录。

1.7 安全性试验

试验斑马鱼购自广州市花鸟鱼艺市场, 鱼体大小均匀, 平均体质量 0.2 g 左右, 置于玻璃箱中暂养 7 d, 适量投喂饲料。试验用水为充分曝气的自来水, 试验前停食 24 h。采用静态法及拌饲喂食法测定对斑马鱼的急性毒性, 放线菌 AF1 代谢粗提物梯度设计分别为 56、28、14、7 mg/L, 每个处理 10 尾鱼, 设置 3 组重复, 喂食法投饵量按鱼体质量的 5% 投喂, 每天 3 次, 观察记录 96 h 斑马鱼的死亡情况。每个浓度设置 3 组重复。

1.8 统计分析

数据采用 DPS 7.05 Duncan's 新复极差法进行分析,SPSS 19.0 分析计算 AF1 代谢粗提物对斑马鱼的半致死浓度值(LC₅₀)和 95%的置信限。

2 结果与分析

2.1 生长曲线

1)无乳链球菌浓度标准曲线。以菌液浓度为横坐标,吸光值 A 为纵坐标得出回归方程。结果表明,无乳链球菌菌液浓度在 0~1.8×10⁸ cfu/mL 之间时,呈现出良好的线性关系(图 1)。

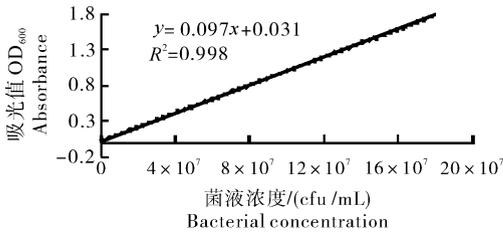


图 1 无乳链球菌浓度标准曲线图

Fig.1 The standard curve for cell concentration of *S. agalactiae*

2)无乳链球菌生长曲线。由于菌液浓度和吸光度成正比,所以可以用吸光度来代替浓度,测得生长曲线图。从图 2 中可以看出,该链球菌菌株在 8 h 时浓度达到最大,12 h 生长速率基本趋于稳定。因此,测量放线菌 AF1 代谢粗提物对无乳链球菌的作

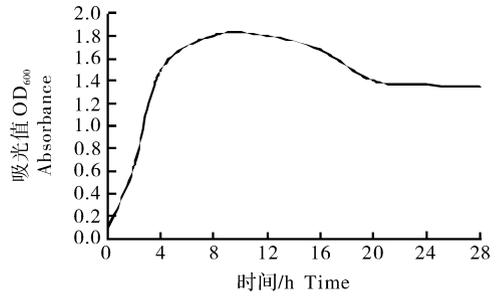


图 2 无乳链球菌生长曲线

Fig.2 Growth curve of *Streptococcus agalactiae* 用时间在培养的 12 h 以内。

2.2 抑菌活性测定结果

从 3 组对照组的数据可以看出,放线菌 AF1 菌株代谢粗提物对所测试的无乳链球菌具有抑制作用。放线菌 AF1 代谢粗提物质量浓度≥25 μg/mL 时,提取物表现出明显的抑菌活性,对无乳链球菌最低抑菌质量浓度在 25~50 μg/mL 之间。放线菌 AF1 代谢粗提物对无乳链球菌的抑菌作用(带毒培养法)测定结果如表 1 所示。

粗提物浓度 x 与对无乳链球菌抑制率 y 关系如图 3 所示,放线菌 AF1 代谢粗提物浓度与抑菌率关系为正相关,回归方程为 $y = 0.0195x + 0.0458$ 。抑菌率 80%时为受试菌的 MIC,对应的代谢物质量浓度为 38 μg/mL,放线菌 AF1 代谢粗提物对无乳链球菌的最低抑菌质量浓度为 38 μg/mL。

表 1 放线菌 AF1 代谢粗提物对无乳链球菌的抑菌作用

Table 1 The minimal inhibitory concentration of *S. galilaeus* AF1 metabolites on *S. agalactiae*

质量浓度/(μg/mL) Concentration	吸光值 Absorbance value(OD ₆₀₀)		差值 ΔOD Difference	抑菌率/% Inhibition ratio
	培养前 Before culture	培养后 After culture		
224	0.532 1 ± 0.05a	0.532 1 ± 0.06a	0.000 0	100.00
112	0.348 0 ± 0.02b	0.348 0 ± 0.02b	0.000 0	100.00
56	0.063 0 ± 0.02c	0.079 0 ± 0.02c	0.016 0	98.76
28	0.015 6 ± 0.04cd	0.457 0 ± 0.01d	0.441 4	59.20
14	0.015 0 ± 0.06cd	0.757 0 ± 0.07e	0.742 0	31.22
9	0.014 0 ± 0.04cd	0.977 0 ± 0.05f	0.963 0	9.46
CK(+)	0.014 0 ± 0.01d	1.077 6 ± 0.03g	1.063 6	
CK(-)	0.035 4 ± 0.03d	0.035 4 ± 0.03h	0.000 0	
CK	0.049 3 ± 0.08d	1.112 7 ± 0.01i	1.063 4	

注:CK(+),加菌不加代谢粗提物对照组;CK(-),加代谢粗提物不加菌对照组;CK,加菌丙酮对照组(≤10%)。同列不同的字母表示 Duncan's 检验有显著性差异。Note:CK (+);*S. agalactiae* broths without metabolites; CK (-);The metabolites without *S. agalactiae* broths; CK;*S. agalactiae* were treated with the acetone less than 10%. The value with different letters indicate there are significant difference.

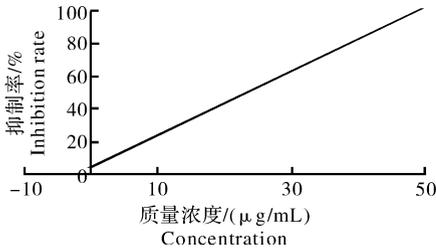
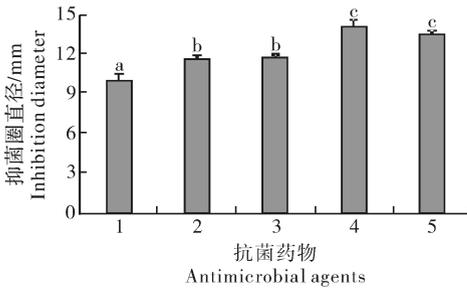


图 3 放线菌 AF1 代谢粗提物质量浓度与无乳链球菌抑菌率关系模式图

Fig.3 The relationship between the concentration of *S. galilaeus* AF1 metabolites and the inhibition rate against *S. agalactiae*

2.3 几种抗菌药物对无乳链球菌的抑菌效果

利福平为常见治疗无乳链球菌的药物,无乳链球菌对利福平敏感。图 4 中,在供试常用药物中,放线菌 AF1 代谢粗提物抑菌直径与利福平差异不显著,放线菌 AF1 代谢粗提物对无乳链球菌有很好的抑菌效果。



1: 氨苄青霉素 Ampicillin; 2: 头孢菌素 Cephalosporin; 3: 氯霉素 Chloramphenicol; 4: 利福平 Rifampicin; 5: 放线菌 AF1 代谢粗提物 *Streptomyces galilaeus* AF1 metabolites.

图 4 几种抗菌药物对无乳链球菌抑菌作用

Fig.4 The inhibition with certain antimicrobial agents against *S. agalactiae*

2.4 杀菌作用测定结果

以正常无乳链球菌为对照组,0~2 h 是菌体生长的延迟期,从 2 h 起菌体开始进入生长的对数期,8 h 后进入稳定期。加入 AF1 代谢粗提物后,无乳链球菌的菌体浓度明显下降,菌体的生长曲线均呈现出与对照组的差异性,进入各生长时期未有明显延迟现象,但菌液浓度均低于对照组(图 5),初步判断放线菌 AF1 代谢粗提物对无乳链球菌有一定的杀菌作用^[16]。

杀菌作用测定结果如表 2 所示。放线菌 AF1 代谢粗提物对无乳链球菌有杀菌作用,致死效果表

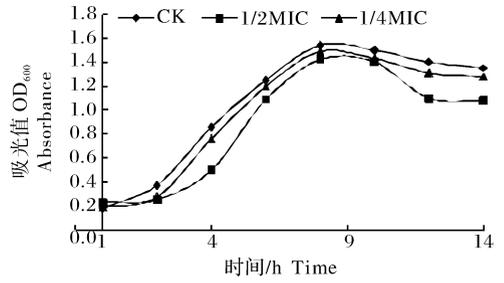


图 5 放线菌 AF1 代谢粗提物对无乳链球菌生长曲线的影响

Fig.5 Effect of *S. galilaeus* AF1 metabolites on growth curve of *S. agalactiae*

现出良好的剂量—时间关系,即提取物浓度越高,杀菌率越高;同一浓度下,作用时间越长,杀菌率越高。

表 2 放线菌 AF1 代谢提取物对无乳链球菌的杀菌作用

Table 2 The bactericidal effect of *S. galilaeus* AF1 metabolites against *S. agalactiae*

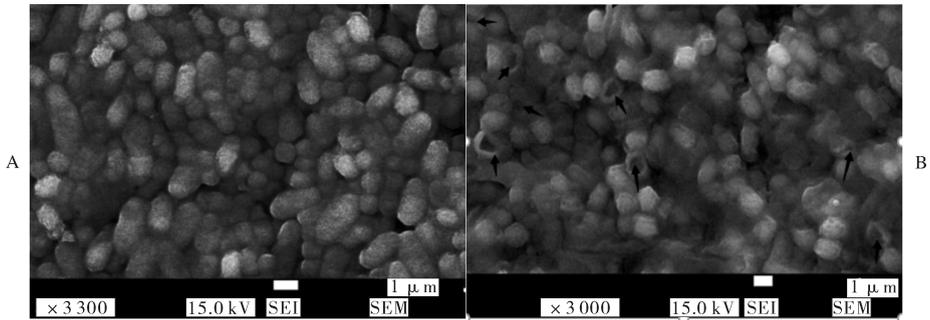
质量浓度/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Concentration	时间/h Time	菌落数平均值 ($\times 10^6$) Colonies	杀菌率/% Bactericidal rate
6.25	1	100 \pm 2.52a	2.91
	2	97 \pm 2.89ab	5.83
	3	93 \pm 1.16bc	9.71
12.5	1	79 \pm 1.16c	23.3
	2	73 \pm 2.52d	29.13
	3	68 \pm 0.58e	33.98
25	1	45 \pm 2.00f	56.31
	2	36 \pm 0.58g	65.05
	3	32 \pm 1.00h	68.93
50	1	22 \pm 0.53h	78.64
	2	19 \pm 0.58i	81.55
	3	13 \pm 1.53i	87.38
100	1	14 \pm 0.58j	86.41
	2	12 \pm 1.00j	88.35
	3	9 \pm 0.58j	91.26
CK	—	103 \pm 2.31a	—

2.5 无乳链球菌细胞扫描电镜图

进一步对发酵液的作用方式进行探索,得到了处理前后无乳链球菌在电镜下放大的照片。可以看出,经过 AF1 发酵液处理过的无乳链球菌的形态发生了改变,菌体变形或破裂(图 6)。

2.6 放线菌 AF1 代谢粗提物对斑马鱼的安全性试验

依据文献[17],农药对鱼类的极性毒性按 LC_{50} 的大小分为 4 个等级: LC_{50} (96 h) > 10 mg/L 为低毒,1.0 mg/L < LC_{50} (96 h) \leq 10 mg/L 为中毒,0.1 mg/L < LC_{50} \leq 1.0 mg/L 为高毒, LC_{50} (96 h) \leq 0.1 mg/L 为剧毒。试验结果数据用 SPSS 软件处理,得到放线菌 AF1 代谢粗提物对斑马鱼 24、48、72、96 h



A: 3 300× 放大正常的无乳链球菌菌体；B: 3 000× 放大粗提物处理后的无乳链球菌菌体。部分破碎细胞在图 B 中标记。
A. *S. agalactiae*; B. *S. agalactiae* were treated with *S. galilaeus* AF1 metabolites at concentrations 2× MIC for 2 h. Part of the broken cells and cell fragments were marked in the Fig. B.

图 6 无乳链球菌扫描电镜图

Fig.6 SEM of *Streptococcus agalactiae*

表 3 放线菌 AF1 代谢粗提物对斑马鱼的急性毒性

Table 3 The acute toxicity of *S. galilaeus* AF1 metabolites against zebrafish

试验方法 Test method	时间/h Time	回归方程 Regression equation	半致死量/(mg/L) LC ₅₀	置信限/(mg/L) Confidence limit
静态法 Static method	24	—	—	—
	48	$y = -8.915 + 5.250x$	49.90	37.00~101.48
	72	$y = -3.120 + 2.040x$	33.84	20.57~106.39
拌饲喂食法 Feeding method	96	$y = -4.031 + 2.802x$	27.44	15.43~50.89
	24	—	—	—
	48	$y = -4.167 + 2.434x$	51.53	32.30~304.08
	72	$y = -3.298 + 2.040x$	41.39	25.03~213.59
	96	$y = -2.778 + 1.793x$	35.44	20.37~195.98

的半致死浓度值(LC₅₀)和 95% 的置信区限。静态法测得放线菌 AF1 代谢粗提物对斑马鱼的 LC₅₀(96 h)为 27.44 mg/L,拌饲喂食法测得 LC₅₀(96 h)为 35.44 mg/L,对斑马鱼急性毒性为低毒(表 3)。

3 讨 论

放线菌产生的生物活性物质种类较多,如抗生素、抗肿瘤药物、有机酸、酶抑制剂等,其中链霉菌是发现抗生素的有力资源。自青霉素问世后产生了多种新的抗生素,但经过长期的开发利用,新抗生素发现也日益困难,新药的缺乏以及过度地使用抗生素使细菌的耐药性不断增加。有报道新的筛选方法或用已有的筛选方法对新材料进行筛选时,未知的重要抗生素则更容易被发现分离^[18],因此,利用不同的分离培养方式从特殊环境中筛选菌株是获取新颖化合物的方式之一。另一方面可通过不同的培养方式如固体发酵来增加代谢产物的种类及含量^[19]。链球菌不仅对畜牧业和渔业产生巨大危害,还对食品安全及人类健康构成严重威胁^[20]。自 20 世纪 80 年代以来,世界范围内广泛出现鱼类链球菌感染,病原菌多为无乳链球菌。药物防治罗非鱼链球菌病是最为

直接和简便的控制手段^[21]。研究开发新的化合物是今后控制罗非鱼无乳链球菌病的一条有效途径。

放线菌 AF1 代谢粗提物具有独特的抑菌机制,与抗菌肽相似,能导致静息细胞细胞壁破裂^[22]。但其对革兰氏阳性菌有较好的抑菌作用,对革兰氏阴性菌没有作用。细胞壁是细菌表面的一种复杂结构,能承受细胞的强大压力。革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌细胞壁的结构可能导致不同的抗菌机制^[23]。

试验初步测定了放线菌 AF1 代谢粗提物对无乳链球菌的生物活性,结果表明其对无乳链球菌有较好的抗菌作用。斑马鱼在药物安全性评价中已有了较广泛的应用。经测试,放线菌 AF1 代谢粗提物对斑马鱼的极性毒性为低毒,对斑马鱼的安全性较高。本研究为无乳链球菌病的预防和治疗提供了新的线索,但针对耐药性及抑菌机制有待进一步的研究。同时,试验结果为放线菌的应用开辟了新的方向,对放线菌 AF1 的活性物质的分离提纯以及结构鉴定有望发现新的抗菌先导化合物,具有一定的研究价值。

参 考 文 献

[1] PETEIRA U P,MIAN G F,OLIVEIRA I C M,et al. Genoty-

- ping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia[J]. *Veterinary microbiology*, 2010, 140(1/2): 186-192.
- [2] 王玮, 丁建乐, 房金岑. 罗非鱼产业标准化现状及分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(6): 976-981.
- [3] 程世亮, 刘新风, 郑文, 等. 鱼类无乳链球菌病[J]. *动物医学进展*, 2016, 37(2): 105-109.
- [4] 卢迈新. 罗非鱼链球菌病研究进展[J]. *南方水产*, 2010, 6(1): 75-79.
- [5] 柯剑, 赵飞, 罗理, 等. 广东省罗非鱼主养区无乳链球菌的分离、鉴定与致病性[J]. *广东海洋大学学报*, 2010, 30(3): 22-27.
- [6] 黄艳华, 彭亚, 刘杰, 等. 罗非鱼致病性无乳链球菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *南方农业学报*, 2014, 45(3): 498-504.
- [7] 周清, 沈锦玉, 徐洋, 等. 海南罗非鱼无乳链球菌分离鉴定及其特性研究[J]. *生物学杂志*, 2012, 29(2): 27-30.
- [8] 刘志恒, 王剑, 张立新. 基因组时代的放线菌系统学及其研究进展[J]. *微生物学报*, 2011, 51(2): 141-153.
- [9] 杨静, 廖美德. 放线菌资源及其应用[J]. *世界农药*, 2014, 36(1): 22-26.
- [10] 姜怡, 唐蜀昆, 张玉琴, 等. 放线菌产生的生物活性物质[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(1): 188-190.
- [11] 姜怡, 徐平, 娄恺, 等. 放线菌药物资源开发面临的问题与对策[J]. *微生物学通报*, 2008, 32(2): 272-274.
- [12] 范玲. 微生物农药研究进展及产业发展对策[J]. *中国生物工程杂志*, 2002, 22(5): 83-86.
- [13] COATES A R, HU Y. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections[J]. *British journal of pharmacology*, 2007, 152(8): 1147-1154.
- [14] 杨静, 廖美德. 放线菌 AF1 发酵液提取物对病原微生物的抑菌作用和稳定性分析[J]. *世界农药*, 2014, 36(4): 53-57.
- [15] 苗壮, 刘竞艳, 常璐, 等. 扫描电镜粉末样品的制备方法[J]. *钛工业进展*, 2008, 25(4): 31-34.
- [16] 王鑫. 白藜芦醇对金黄色葡萄球菌标准株的抑菌作用及机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
- [17] 林璉, 王开运, 许辉, 等. 5 种新型杀菌剂对 4 种鱼的急性毒性及安全性评价[J]. *世界农药*, 2014, 36(2): 34-38.
- [18] 李文均, 张忠泽. 几种主要稀有放线菌的选择性分离[J]. *国外医药抗生素分册*, 2002, 23(1): 18-22.
- [19] 李增波, 薛泉宏, 梁军锋. 利用放线菌固态发酵生产农用抗生素的初步研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2005, 33(8): 117-121.
- [20] 韦现色, 蒋恒洁, 林勇, 等. 罗非鱼源无乳链球菌对 16 种抗菌药的敏感性研究[J]. *广西畜牧兽医*, 2013, 29(2): 115-117.
- [21] JOHRI A K, PAOLETTI L C, GLASER P, et al. Group b *Streptococcus*: global incidence and vaccine development[J]. *Nature reviews microbiology*, 2006, 12(4): 932-942.
- [22] 崔艳红, 黄现青. 抗菌肽的抗菌机理及其应用[J]. *中国兽医杂志*, 2006, 42(9): 51-52.
- [23] LING L L, SCHNEIDER T, PEOPLES A J, et al. A new antibiotic kills pathogens without resistance[J]. *Nature*, 2015, 517: 455-459.

Bioactivity of *Streptommyces galilaeus* AF1 metabolites against *Streptococcus agalactiae*

ZHOU Si HU Xiaoyun HE Yuguang WANG Shiqi LIAO Meide

Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract To investigate the antimicrobial activities of the *Streptommyces galilaeus* AF1 metabolites on *Streptococcus agalactiae*, a spectrophotometer and counting plate colony was used to detect the effect of the metabolites against *S. agalactiae* and a comparative test on the efficacy with certain antimicrobial agents was conducted. The results showed that the metabolites of *S. galilaeus* AF1 have strong effects against *S. agalactiae* and the minimal inhibitory concentration was 38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with the dose-time-effect relationship. The scanning electron microscopy results indicated that the cell walls of *S. agalactiae* were ruptured severely after being treated with the metabolites. The 96 h LC_{50} value for zebrafish were 27.44 mg/L and 35.44 mg/L by static method and feeding method, respectively and the acute toxicity was low. This study showed that the metabolites of *S. galilaeus* AF1 have good antibacterial activity against *S. agalactiae* and provides a new clue for prevention and control of *S. agalactiae*.

Keywords *Streptommyces galilaeus* AF1; *Streptococcus agalactiae*; antimicrobial; acute toxicity
(责任编辑:边书京)