

DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20267395

· 论 著 ·

细菌素 Enterocin-162 对临床常见多重耐药菌的抗菌活性研究

江岑岑^{1,2}, 吕 震², 陈传平², 唐 伟¹

(1. 安徽医科大学第二附属医院检验科, 安徽 合肥 230601; 2. 皖西卫生职业学院医学技术系, 安徽 六安 237005)

[摘 要] **目的** 探讨粪肠球菌 SHAMU-EF162 菌株所分泌的细菌素(Enterocin-162)对临床常见多重耐药菌(MDRO)的抗菌活性。**方法** 采用微量培养法监测 SHAMU-EF162 菌株的生长动力学曲线;采用牛津杯法评估 SHAMU-EF162 菌株对金黄色葡萄球菌的拮抗活性;通过大孔树脂吸附、梯度乙醇洗脱、旋转蒸发干燥和旋干物复溶,制备 Enterocin-162 粗提物;采用考马斯亮蓝染色法检测粗提物蛋白含量;采用牛津杯法,评估 Enterocin-162 的热、pH 和蛋白酶稳定性,以及对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、多重耐药铜绿假单胞菌(MDR-PA)、产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌(ESBLs-EC)和耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)临床分离株的抗菌活性。**结果** Enterocin-162 能够耐受 100℃、pH 2.0、pH 12.0、糜蛋白酶、菠萝酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K 以及 4 种蛋白酶的混合物处理。30 μ L Enterocin-162 粗提物(约含有 14.8 μ g 蛋白或多肽)对 MRSA、MDR-PA、ESBLs-EC 和 CRKP 临床分离株的抗菌活性优于万古霉素、多黏菌素、依拉环素、阿米卡星和左氧氟沙星药敏纸片。**结论** Enterocin-162 很可能是一种稳定、高效、广谱的新型 I 类细菌素,有望开发成新型抗菌药物,为临床常见 MDRO 感染的治疗提供新选择。

[关 键 词] 粪肠球菌;细菌素;多重耐药菌;抗菌活性

[中图分类号] R378.1

Antimicrobial activity of bacteriocin Enterocin-162 against clinical common multidrug-resistant organisms

JIANG Cencen^{1,2}, LYU Zhen², CHEN Chuanping², TANG Wei¹ (1. Department of Laboratory Medicine, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China; 2. Department of Medical Technology, West Anhui Health Vocational College, Lu'an 237005, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the antimicrobial activity of the bacteriocin (Enterocin-162) secreted by *Enterococcus faecalis* SHAMU-EF162 strain against clinically common multidrug-resistant organisms (MDROs). **Methods** The growth kinetics curve of the SHAMU-EF162 strain was monitored through the microcultivation assay. The antagonistic activity of the SHAMU-EF162 strain against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) was evaluated using Oxford cup method. Enterocin-162 crude extract was prepared by macroporous resin adsorption, gradient ethanol elution, rotary evaporation drying, and reconstitution. The protein content in the crude extract was detected by Coomassie brilliant blue staining. The thermal, pH, and protease stability of Enterocin-162, as well as its antimicrobial activity against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDR-PA), extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* (ESBLs-EC), and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) clinical isolates were assessed by Oxford cup method. **Results** Enterocin-162 can withstand exposure to 100℃ heat, pH 2.0, pH 12.0, chymotrypsin, bromelain, trypsin, proteinase K, and the mixture of four proteases. The antimicrobial activity of 30 μ L crude extract of Enterocin-162 (containing approximately 14.8 μ g of protein or polypeptide) against clinical isolates of MRSA, MDR-PA, ESBLs-EC, and

[收稿日期] 2025-09-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82102460);安徽省教育厅自然科学重点研究项目(2022AH053046)

[作者简介] 江岑岑(1989-),女(汉族),安徽省寿县人,中级检验技师,主要从事新型细菌素的抗菌活性研究。

[通信作者] 唐伟 E-mail: tangwei317822887@sina.com

CRKP was superior to those of antimicrobial disks of vancomycin, polymyxin, epicycline, amikacin, and levofloxacin. **Conclusion** Enterocin-162 is likely to be a stable, efficient, and broad-spectrum new class I bacteriocin, with the potential to be developed into a novel antimicrobial agent, and providing a new option for the treatment of common MDRO infection in clinical practice.

[Key words] *Enterococcus faecalis*; bacteriocin; multidrug-resistant organism; antimicrobial activity

由于抗菌药物在医学、农业和畜牧业领域的过度使用甚至滥用,多重耐药菌(multidrug-resistant organism, MDRO)已成为人类健康和经济发展的重大问题。根据全球疾病负担报告,在 33 种主要致死性细菌感染中,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、肺炎链球菌和肺炎克雷伯菌感染导致的死亡人数占比达 55%^[1]。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、多重耐药铜绿假单胞菌(MDR-PA)、产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)细菌和耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌(CRE),一直都是监测重点和治疗难点。目前,全球正致力于 MDRO 感染防控和新型抗菌药物研发,其中高效且稳定的广谱细菌素最具前景^[2-3]。

乳酸菌通常被视为益生菌,主要包括乳杆菌属、乳球菌属、肠球菌属(*Enterococcus spp.*)等,是细菌素的重要来源^[4]。为了挖掘新型细菌素,本课题组对日常微生物检验工作中的培养物进行了长期、广泛筛选和鉴定,获取一株对金黄色葡萄球菌具有拮抗活性的粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) SHAMU-EF162。本研究旨在探索此效应菌株分泌的细菌素(Enterocin-162)对临床常见 MDRO 的抗菌活性,为新型抗菌药物的研发提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 粪肠球菌 SHAMU-EF162、MRSA、MDR-PA、产 ESBLs 大肠埃希菌(ESBLs-EC)和耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)菌株,均分离自常规临床送检标本,经 Microflex LT 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)分析仪、VITEK 2 GP 鉴定卡或 GN 鉴定卡鉴定确认。金黄色葡萄球菌 ATCC29213 来自安徽医科大学第二附属医院微生物室。本研究属于免伦理审查范围。

1.2 主要试剂与仪器 Man Rogosa Sharpe (MRS)肉汤、Luria-Bertani (LB)琼脂平板(广东环凯微生物科技有限公司)、哥伦比亚绵羊血琼脂平板(成都瑞琦医疗科技有限公司)、牛津杯(徐州樊越仪器仪表有限公司)、96 孔平底无菌微孔板和 96 孔圆

底无菌微孔板(美国康宁公司)、XAD-16 非离子型大孔树脂(上海源叶生物有限公司)、无水乙醇(安徽天地高纯溶剂有限公司)、0.45 μm 和 0.22 μm 微孔滤膜(上海新亚净化器件厂)、0.45、0.22 μm 针式过滤器和 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)、pH 6.8 缓冲溶液(广州和为医药科技有限公司)、药敏纸片(英国 Oxoid 公司)。BJPX-VW1 涡旋混合器、BSC-1500IIA2-X 生物安全柜、BJPX-B150 恒温培养箱(山东博科科学仪器有限公司)、DZF-6050 干燥箱(常州海博仪器设备有限公司)、LDH-100 卧式摇床(常州丹瑞实验设备有限公司)、TGL-20M 台式高速冷冻离心机(长沙维尔康湘鹰离心机有限公司)、SM530 立式压力蒸汽灭菌器(重庆雅玛拓科技有限公司)、N-1200BV-OSB2100 旋转蒸发仪(上海领教科学仪器有限公司)、SHZ-D 循环水式多用真空泵、722 s 分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司)、麦氏比浊仪、VITEK 2 GP 鉴定卡、VITEK 2 GN 鉴定卡、VITEK 2 AST-GP639 药敏卡、VITEK 2 AST-GN335 药敏卡、VITEK 2 AST-GN334 药敏卡和 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定药敏分析仪(法国生物梅里埃公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株种属鉴定 (1)VITEK 2 鉴定卡法:配制 0.5 麦氏单位(1.5×10^8 CFU/mL)菌悬液,按照 VITEK 2 Compact 微生物鉴定药敏仪的操作要求,根据细菌种类使用 VITEK 2 GP 鉴定卡或 GN 鉴定卡,初步鉴定菌株种属。(2)MALDI-TOF MS 法:使用无菌加样枪头挑取适量菌体,均匀涂抹于质谱靶板待测区。依次滴加 70%甲酸和 α -氰基-4-羟基肉桂酸基质液。按照 Microflex LT MALDI-TOF MS 分析仪的操作说明,上机检测。使用 MALDI FlexAnalysis 和 Biotyper 软件,采集并分析菌株的质谱图,从而鉴定菌株种属。质谱鉴定分值 ≥ 1.7 ,表示鉴定结果可信。(3)16S rRNA 测序法:以菌株 DNA 为模板,使用 27F(5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-CTACG-GCTACCTTGTACGA-3')细菌通用引物进行聚

合酶链式反应(PCR)扩增。产物测序由上海派森诺公司完成。将测序数据提交至 GenBank,并在 NCBI 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中进行 BLAST 序列分析比对。使用 MEGA 11.0 软件构建系统发育树,明确菌株种属。

1.3.2 生长动力学监测 采用微量培养法对菌株的生长动力学进行监测^[5]。使用 LB 肉汤,将粪肠球菌 SHAMU-EF162 菌株的过夜培养物稀释至 1×10^6 CFU/mL,加入 96 孔平底无菌微孔板中,200 μ L/孔。每个菌株设置 3 个复孔,35℃ 培养 30.5 h。使用美谷分子 Spectra max i3x 多功能酶标仪,定时监测各孔的 OD₆₀₀ 值。使用 Origin 2021 软件绘制生长动力学曲线。

1.3.3 牛津杯法拮抗试验 使用无菌棉签,将金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 以 0.5 麦氏单位(1.5×10^8 CFU/mL)菌悬液密集涂布 LB 琼脂平板。放置牛津杯(内径 6 mm),加入 30 μ L 粪肠球菌 SHAMU-EF162 菌悬液(4.5×10^8 CFU/mL)。待杯内液体被平板完全吸收,移除牛津杯,29℃ 孵育 20 h。观察杯痕周围有无抑菌圈形成,并测量抑菌圈直径。参考左双海等^[6]的方法,计算拮抗指数(antagonism index, AI),评估粪肠球菌 SHAMU-EF162 对金黄色葡萄球菌的拮抗活性。AI = 1,无拮抗活性;1 < AI < 2,弱拮抗活性;2 ≤ AI < 3,中等拮抗活性;AI ≥ 3,强拮抗活性。“AI = 抑菌圈直径 ÷ 粪肠球菌 SHAMU-EF162 菌落直径”。

1.3.4 大孔树脂法制备抗菌活性粗提物 Enterocin-162 粗提物的制备方法参考文献^[7]。将经过复苏的粪肠球菌 SHAMU-EF162 接种于 MRS 肉汤,35℃ 振荡培养过夜。按 1% 接种量接种于 MRS 肉汤,30℃ 振荡培养(100 r/min)24 h。8 000 × g 离心 10 min 后,将上清液依次通过 0.45、0.22 μ m 微孔滤膜除菌,获取无菌发酵上清液。加入适量大孔树脂,磁力搅拌吸附过夜后,湿法灌装分离柱。足量超纯水和 30% 乙醇洗脱杂质和色素后,依次用 50%、60%、70%、80% 和 90% 乙醇洗脱。收集梯度洗脱液,旋转蒸发仪旋干后复溶于 10 mL 超纯水,滤过除菌备用。以金黄色葡萄球菌 ATCC29213 为靶菌,牛津杯筛选出具有杀菌活性的洗脱物,即为 Enterocin-162 粗提物。

1.3.5 粗提物溶液蛋白含量检测 100 μ L 不同浓度的蛋白标准品和 Enterocin-162 粗提物,分别与 1 mL Bradford 工作液混匀,室温孵育 5 min。分光光度计,测定 OD₅₉₅ 值。使用 Origin 2021 软件绘制

蛋白浓度标准曲线,计算粗提物蛋白浓度。

1.3.6 热稳定性、pH 稳定性和蛋白酶稳定性测试

(1)热稳定性:将 20 μ L Enterocin-162 粗提物,分别在 100、121℃ 处理 30 min。调回室温。(2)pH 稳定性:将 20 μ L Enterocin-162 粗提物,分别调整 pH 值至 2.0 和 12.0,37℃ 孵育 1.5 h。调回 pH 6.8。(3)蛋白酶稳定性:将 10 μ L Enterocin-162 粗提物,分别用 10 μ L 糜蛋白酶(2 mg/mL)、10 μ L 菠萝酶(2 mg/mL)、10 μ L 胰蛋白酶(2 mg/mL)、10 μ L 蛋白酶 K(2 mg/mL)以及 4 种蛋白酶的混合物处理 1.5 h。

分别设置无处理 Enterocin-162 粗提物对照和无菌水 - 混合酶对照,以金黄色葡萄球菌 ATCC29213 为靶菌,牛津杯法测定残余抗菌活性。

1.3.7 药敏试验 采用血琼脂平板复苏 MRSA、MDR-PA、ESBLs-EC 和 CRKP 菌株,配制 1.5×10^8 CFU/mL 菌悬液。按照 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定药敏仪的操作要求,根据细菌种类使用 VITEK 2 AST-GP639、GN335 或 GN334 药敏卡进行药敏试验。依据美国临床实验室标准化协会(CLSI)制定的 CLSI M100-S29 标准,判定 MRSA、MDR-PA、ESBLs-EC 和 CRKP 菌株。

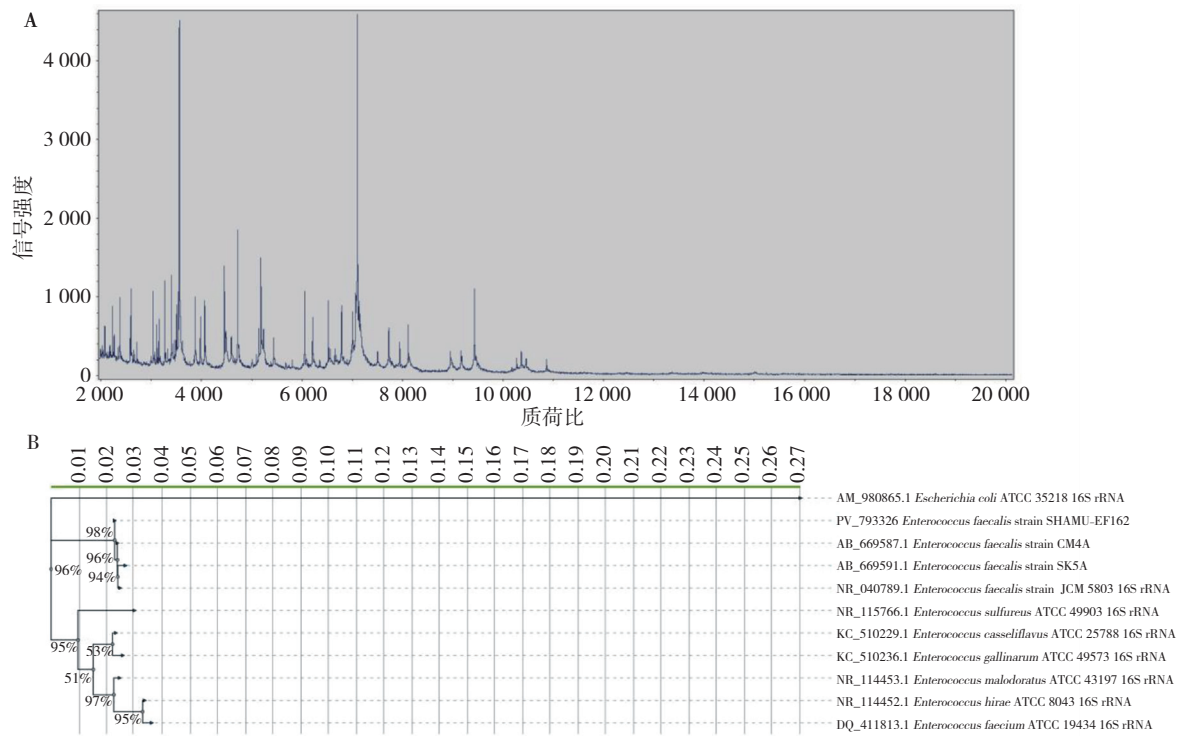
1.3.8 牛津杯法抗菌活性试验 将 MRSA、MDR-PA、ESBLs-EC 和 CRKP 临床分离株,分别以 1.5×10^8 CFU/mL 菌悬液密集涂布 LB 琼脂平板。牛津杯法验证 30 μ L 粗提物的抗菌活性,并根据靶菌种类放置药敏纸片。35℃ 培养 18 h,测量抑菌圈大小。

1.4 统计分析 应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差表示。两组样本间比较采用配对样本 *t* 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 粪肠球菌 SHAMU-EF162 菌株种属鉴定结果

拮抗菌株经 VITEK 2 GP 鉴定卡,初步鉴定为粪肠球菌。MALDI-TOF MS 和 MALDI Biotyper 3.1 软件分析,结果表明菌株为粪肠球菌,评分 > 2.0,结果可信。拮抗菌株的 16S rRNA 基因序列提交 GenBank,登录号为 PV793326。经过 BLAST 比对,菌株与 *Enterococcus faecalis* strain C1226 和 *Enterococcus faecalis* strain C5819 的种属同源性均达 100%。综上所述,可以确定拮抗菌株为粪肠球菌,命名为粪肠球菌 SHAMU-EF162(*Enterococcus faecalis* SHAMU-EF162)。见图 1。



注:A为粪肠球菌 SHAMU-EF162 的 MALDI-TOF MS 鉴定图谱;B为粪肠球菌 SHAMU-EF162 的系统发育树。

图 1 粪肠球菌 SHAMU-EF162 的 MALDI-TOF MS 鉴定图谱及系统发育树

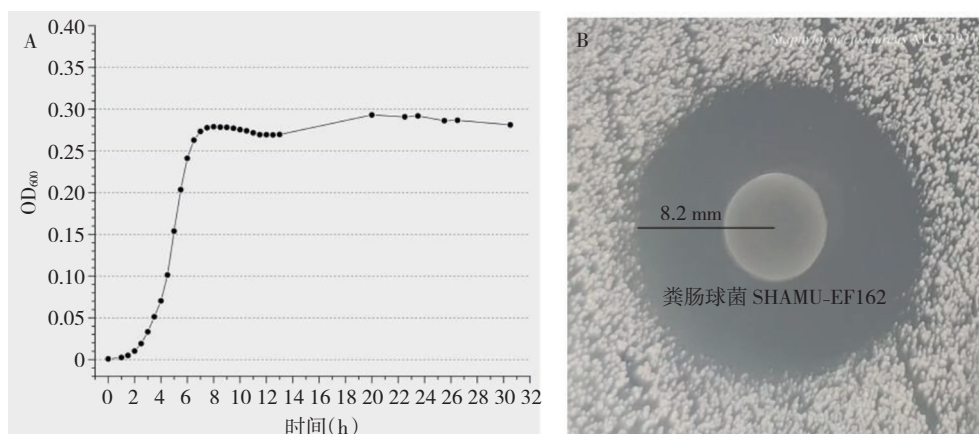
Figure 1 MALDI-TOF MS identification map and phylogenetic tree of *Enterococcus faecalis* SHAMU-EF162

2.2 粪肠球菌 SHAMU-EF162 的生长动力学曲线

粪肠球菌 SHAMU-EF162 的生长动力学曲线呈 S 型,0~2 h 为迟缓期,2~7 h 为对数期,7~30.5 h 为稳定期,见图 2A。细菌素是细菌的次级代谢产物,通常在稳定期产生。为确保细菌素的产量,确定其发酵时间为 24 h。

2.3 粪肠球菌 SHAMU-EF162 对金黄色葡萄球菌 ATCC29213 的拮抗活性

牛津杯法拮抗试验结果显示,粪肠球菌 SHAMU-EF162 菌落周围形成一个明显的抑菌圈($\Phi = 16.4$ mm),对金黄色葡萄球菌 ATCC29213 的拮抗指数为 2.73,具有中等拮抗活性。见图 2B。



注:A为粪肠球菌 SHAMU-EF162 的生长动力学曲线;B为粪肠球菌 SHAMU-EF162 对金黄色葡萄球菌的拮抗活性。

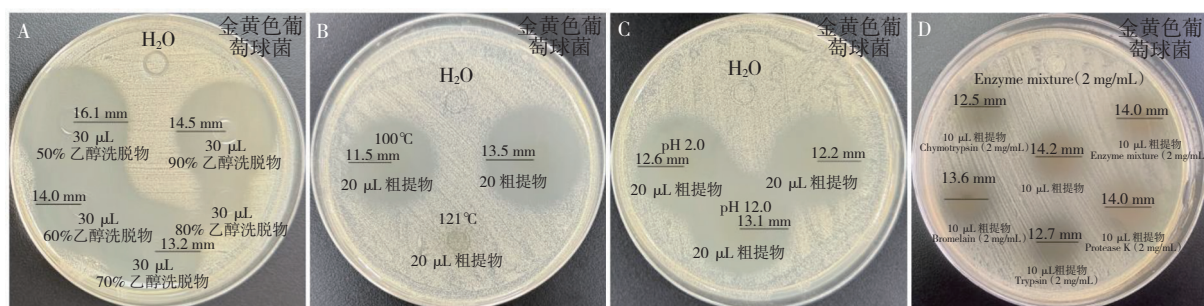
图 2 粪肠球菌 SHAMU-EF162 的生长动力学曲线及其对金黄色葡萄球菌的拮抗活性

Figure 2 Growth kinetics curve of *Enterococcus faecalis* SHAMU-EF162 and its antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*

2.4 梯度乙醇洗脱物的抗菌活性验证及 Enterocin-162 粗提物的稳定性评估 粪肠球菌 SHAMU-EF162 的 50%、60%、70% 和 90% 乙醇洗脱物, 对金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 具有很强抗菌活性, 抑菌圈直径分别为 32.3、28.0、26.4、29.0 mm。其中, 50% 乙醇洗脱物的抗菌活性最强, 见图 3A, 作为 Enterocin-162 粗提物用于后续试验。以蛋白标准品的浓度为纵坐标, 以 OD_{595} 值为横坐标, 绘制蛋白浓度标准曲线, 得到线性回归方程: $y = 195.939 2x +$

0.218 2, $R^2 = 0.999$ 。将粗提物吸光度带入方程, 计算出蛋白浓度为 $492.03 \mu\text{g/mL}$ 。

100℃ 处理 30 min, Enterocin-162 粗提物仍可保留约 85% 的抗菌活性; 121℃ 处理 30 min, 抗菌活性完全丧失, 见图 3B。pH 2.0 和 pH 12.0 处理 1.5 h, 见图 3C, 糜蛋白酶、菠萝酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K 以及 4 种蛋白酶的混合物处理 1.5 h (见图 3D), Enterocin-162 粗提物的抗菌活性未明显受损。



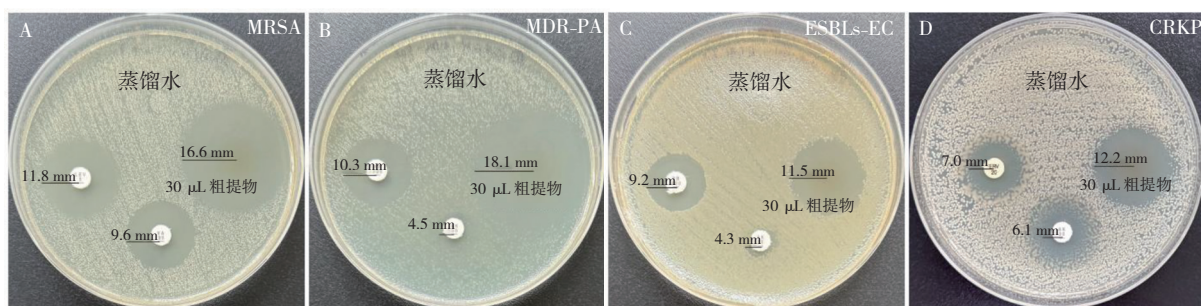
注: A 为梯度乙醇洗脱物对金黄色葡萄球菌的抗菌活性; B 为 Enterocin-162 粗提物的热稳定性; C 为 Enterocin-162 粗提物的 pH 稳定性; D 为 Enterocin-162 粗提物的蛋白酶稳定性。

图 3 梯度乙醇洗脱物的抗菌活性验证及 Enterocin-162 粗提物的稳定性评估

Figure 3 Verification of antimicrobial activity of gradient ethanol eluates and stability evaluation of Enterocin-162 crude extract

2.5 Enterocin-162 粗提物对 MRSA、MDR-PA、ESBLs-EC 和 CRKP 的抗菌活性 对 Enterocin-162 粗提物和临床常用抗菌药物的抑菌圈直径进行比较分析, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结果表明, Enterocin-162 粗提物 ($14.8 \mu\text{g}$) 对 MRSA、MDR-PA、ESBLs-EC 和 CRKP 临床分离株, 均有很

强的抗菌活性, 抑菌圈直径分别达到 (33.60 ± 1.26) 、 (29.32 ± 4.62) 、 (20.20 ± 4.63) 、 (24.38 ± 4.15) mm, 优于万古霉素 ($30 \mu\text{g}$)、多黏菌素 ($300 \mu\text{g}$)、依拉环素 ($20 \mu\text{g}$)、阿米卡星 ($30 \mu\text{g}$) 和左氧氟沙星 ($5 \mu\text{g}$) 药敏纸片。见图 4、表 1。



注: A 为 MRSA; B 为 MDR-PA; C 为 ESBLs-EC; D 为 CRKP。

图 4 Enterocin-162 粗提物对临床常见 MDRO 的药敏结果

Figure 4 Antimicrobial susceptibility testing results of Enterocin-162 crude extract against clinical common multidrug-resistant organisms

表 1 Enterocin-162 与抗菌药物对不同菌株抗菌活性对比
Table 1 Comparison of antimicrobial activities between Enterocin-162 and antimicrobial agents against different strains

菌株	抗菌药物	抑菌直径(mm)
MRSA(<i>n</i> = 6)	Enterocin-162 (14.8 μg)	33.60 ± 1.26
	万古霉素 (30 μg)	19.12 ± 1.51
	左氧氟沙星 (5 μg)	20.47 ± 7.11
MDR-PA(<i>n</i> = 6)	Enterocin-162 (14.8 μg)	29.32 ± 4.62
	多黏菌素 (300 μg)	11.83 ± 6.15
	阿米卡星 (30 μg)	11.05 ± 6.88
ESBL-EC(<i>n</i> = 6)	Enterocin-162 (14.8 μg)	20.20 ± 4.63
	多黏菌素 (300 μg)	14.20 ± 5.78
	阿米卡星 (30 μg)	11.17 ± 5.24
CRKP(<i>n</i> = 6)	Enterocin-162 (14.8 μg)	24.38 ± 4.15
	依拉环素 (20 μg)	14.55 ± 7.70
	阿米卡星 (30 μg)	12.83 ± 2.00

注:各组 Enterocin-162 与抗菌药物的抑菌直径比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

细菌之间的相互作用包括互利共生、偏利共生、偏害共生、无关共生、竞争和拮抗,是构建微生态的基础^[8]。其中,细菌种内或种间的拮抗作用,主要由细菌素介导。细菌素是细菌代谢过程中,由核糖体合成的一类杀菌蛋白或多肽。为避免自身受损,细菌素产生菌进化出多种保护机制,如免疫蛋白或外排泵。迄今发现的细菌素,大多属于窄谱细菌素,仅对产生菌株同种或亲缘关系密切的细菌具有抑制杀灭作用。相比之下,广谱细菌素能够杀伤不同种属细菌、酵母菌、寄生虫甚至癌细胞,因此更具科研和临床价值。细菌素可分为四类:Ⅰ类细菌素分子质量 <5 kDa,热稳定,经翻译后修饰,含羊毛硫氨基酸;Ⅱ类细菌素分子质量 <10 kDa,热稳定,未经翻译后修饰,不含羊毛硫氨基酸;Ⅲ类细菌素分子质量 >30 kDa,热不稳定;Ⅳ类细菌素含多糖或脂质^[9]。翻译后修饰,通常赋予Ⅰ类细菌素更强的热、pH 和蛋白酶稳定性。细菌素的杀菌机制多样,能够抑制细胞壁合成(羊毛硫肽、Humimycin B、Teixobactin 和 Clovibactin)、外膜合成(Darobactin)、DNA 复制(微菌素)、转录(塞克肽和套索肽)、翻译(硫肽)、群体感应(环脂肽)或破坏细胞膜完整性(羊毛硫肽、路邓素和环状细菌素)^[10]。细菌素因其独特的蛋白或

多肽属性,不易产生耐药性,在 MDRO 感染防控和新型抗菌药物研发方面前景广阔。

迄今为止,有关粪肠球菌细菌素的研究可分为两大类。第一类是分子量 >30 kDa 的Ⅲ类细菌素,包括 Enterolysin A (34 kDa)^[11]、Bacteriocin 41 (64.5 kDa)^[12]、EF478(45 kDa)^[13] 和抗念珠菌蛋白 (43 kDa)^[14] 等,这类细菌素热、pH 和蛋白酶稳定性较差,抗菌谱窄。第二类是分子量 <10 kDa 的Ⅰ类和Ⅱ类细菌素,包括 Eenterocin Gr17(4.5 kDa)^[15]、Bacteriocin DU10 (6.3 kDa)^[16]、Enterocin 388C (<5 kDa)^[17]、Enterocin GLHM(6.3 kDa)^[18] 以及粪肠球菌 EF-3 分泌的细菌素^[19] 等,此类细菌素热和 pH 稳定性较好,对部分蛋白酶耐受,抗菌谱较宽。Eenterocin Gr17 和 Bacteriocin DU10 均能耐受 121℃ 热处理,前者对铜绿假单胞菌的抗菌效果弱,后者对蛋白酶 K 和胃蛋白酶敏感。Enterocin 388C 对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和克雷伯菌无抗菌作用。Enterocin GLHM 能够高效杀伤肺炎克雷伯菌,但对胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、pH 2.0 和 pH 12.0 不耐受。粪肠球菌 EF-3 分泌的细菌素仅对金黄色葡萄球菌有效,且对胃蛋白酶、胰蛋白酶和酸碱敏感。既往研究很少涉及 MDRO,Phumisantiphong 等^[13] 探讨了 EF478 对多重耐药肠球菌和对耐万古霉素肠球菌的活性;张海涛等^[20] 仅评估粪肠球菌细菌素对耐万古霉素屎肠球菌的杀伤作用;Sonbol 等^[21] 发现粪肠球菌 OE-7 产生的细菌素对多重耐药的食源性粪肠球菌和金黄色葡萄球菌有抗菌活性,对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌无效,且可以被胰蛋白酶和蛋白酶 K 灭活。本研究的牛津杯法拮抗试验结果证实,粪肠球菌 SHAMU-EF162 能够产生一种对金黄色葡萄球菌具有很强抗菌活性的效应物。随后,经大孔树脂吸附、梯度乙醇洗脱、旋转蒸发干燥和旋干物复溶液活性验证,成功制备了 Enterocin-162 粗提物。该粗提物具有良好的热、pH 和蛋白酶稳定性,抑菌谱较广。此外,抗菌活性试验结果表明,30 μL 的 50%乙醇洗脱物(约含有 14.8 μg 蛋白或多肽),对 MRSA、MDR-PA、ESBLs-EC 和 CRKP 临床分离株的抗菌活性,明显优于万古霉素、多黏菌素、依拉环素、阿米卡星和左氧氟沙星药敏纸片。

综上所述,初步推断 Enterocin-162 属于一种稳定、高效、广谱的新型Ⅰ类细菌素,有望开发成新型抗菌药物,其科研价值和临床应用前景广阔。本课题组后续将在分离纯化的基础上,致力于研究

Enterocin-162 的分子结构、编码基因和杀菌机制, 以期 MDRO 感染治疗提供新的选择。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019[J]. *Lancet*, 2022, 400(10369): 2221–2248.
- [2] Brüßow H. The antibiotic resistance crisis and the development of new antibiotics[J]. *Microb Biotechnol*, 2024, 17(7): e14510.
- [3] Shukla R, Peoples AJ, Ludwig KC, et al. An antibiotic from an uncultured bacterium binds to an immutable target[J]. *Cell*, 2023, 186(19): 4059–4073. e27.
- [4] Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu DD, et al. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(7): 2939–2951.
- [5] 唐伟, 冷贵云, 高菊, 等. 新型不完全溶血型金黄色葡萄球菌的微生物学特征[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(9): 1535–1542.
Tang W, Leng GY, Gao J, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains with novel incomplete hemolytic phenotype[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2024, 59(9): 1535–1542.
- [6] 左双海, 彭开松, 操庆庆, 等. 一株拮抗多重耐药菌的芽孢杆菌的初步研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2013, 25(6): 621–624.
Zuo SH, Peng KS, Cao QQ, et al. The preliminary research of one *Bacillus* strain with antagonism to multidrug resistant bacteria[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2013, 25(6): 621–624.
- [7] 唐伟, 翁胜男, 王亚武, 等. Garvicin LG6 对不同溶血型金黄色葡萄球菌的抗菌活性[J]. *中国感染控制杂志*, 2025, 24(1): 23–29.
Tang W, Weng SN, Wang YW, et al. Antimicrobial activity of garvicin LG6 against *Staphylococcus aureus* of different hemolytic phenotypes[J]. *Chinese Journal of Infection Control*, 2025, 24(1): 23–29.
- [8] Palmer JD, Foster KR. Bacterial species rarely work together[J]. *Science*, 2022, 376(6593): 581–582.
- [9] Newstead LL, Varjonen K, Nuttall T, et al. Staphylococcal-produced bacteriocins and antimicrobial peptides: their potential as alternative treatments for *Staphylococcus aureus* infections[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2020, 9(2): 40.
- [10] Heilbronner S, Krismer B, Brötz-Oesterhelt H, et al. The microbiome-shaping roles of bacteriocins[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(11): 726–739.
- [11] Nilsen T, Nes IF, Holo H. Enterolysin a, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(5): 2975–2984.
- [12] Kurushima J, Nakane D, Nishizaka T, et al. Bacteriocin protein BacL1 of *Enterococcus faecalis* targets cell division loci and specifically recognizes L-Ala2-cross-bridged peptidoglycan[J]. *J Bacteriol*, 2015, 197(2): 286–295.
- [13] Phumisanthiphong U, Siripanichgon K, Reamtong O, et al. A novel bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 478 exhibits a potent activity against vancomycin-resistant *Enterococci* [J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186415.
- [14] Shekh RM, Roy U. Biochemical characterization of an anti-*Candida* factor produced by *Enterococcus faecalis* [J]. *BMC Microbiol*, 2012, 12: 132.
- [15] Liu GR, Wang Y, Li X, et al. Genetic and biochemical evidence that *Enterococcus faecalis* Gr17 produces a novel and sec-dependent bacteriocin, enterocin Gr17[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1806.
- [16] Perumal V, Repally A, Dasari A, et al. Partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* DU10 and its probiotic attributes[J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2016, 46(7): 686–694.
- [17] Sabia C, Messi P, de Niederhäusern S, et al. Study of two bacteriocins produced by *Enterococcus casseliflavus* and *Ent. faecalis* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 38(2): 99–105.
- [18] Mahdi LH, Nazem Abdul-Hur G, Auda IG. Evidence of anti-*K. pneumoniae* biofilm activity of novel *Enterococcus faecalis* enterocin GLHM[J]. *Microb Pathog*, 2020, 147: 104366.
- [19] 车笑吟, 涂会鑫, 杨舒涵, 等. 产细菌素粪肠球菌 EF-3 的分离鉴定及其细菌素理化特性[J]. *中国兽医杂志*, 2023, 59(9): 73–76.
Che XY, Tu HX, Yang SH, et al. Isolation and identification of bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* EF-3 and its bacteriocin physicochemical characteristics[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2023, 59(9): 73–76.
- [20] 张海涛, 马丽艳, 张俊杰, 等. 产细菌素粪肠球菌筛选鉴定及其对耐万古霉素菌跨膜抑菌效应的研究[J]. *海洋渔业*, 2025, 47(3): 405–412.
Zhang HT, Ma LY, Zhang JJ, et al. Screening and identification of bacteriocin-producing *Enterococcus* and their transmembrane inhibitory effects on vancomycin-resistant strains [J]. *Marine Fisheries*, 2025, 47(3): 405–412.
- [21] Sonbol FI, Abdel Aziz AA, El-Banna TE, et al. Antimicrobial activity of bacteriocins produced by *Enterococcus* isolates recovered from Egyptian homemade dairy products against some foodborne pathogens[J]. *Int Microbiol*, 2020, 23(4): 533–547.

(本文编辑:陈玉华)

本文引用格式: 江岑岑, 吕震, 陈传平, 等. 细菌素 Enterocin-162 对临床常见多重耐药菌的抗菌活性研究[J]. *中国感染控制杂志*, 2026, 25(1): 18–24. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20267395.

Cite this article as: JIANG Cencen, LYU Zhen, CHEN Chuanping, et al. Antimicrobial activity of bacteriocin Enterocin-162 against clinical common multidrug-resistant organisms[J]. *Chin J Infect Control*, 2026, 25(1): 18–24. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20267395.