

## 链霉菌 FIM 95-F1 产生的抗真菌抗生素 S1

彭 飞, 谢 阳, 陈路劫, 江 红, 连云阳\*

福建省微生物研究所 福建省新药(微生物)筛选重点实验室 福州 350007

**摘要:**放线菌 FIM 95-F1 的形态特征、培养特性及生理生化特征和 16S rDNA 序列分析表明该菌属于 *Streptomyces castelarensis* 的一个变种, 暂定名为 *S. castelarensis* FIM 95-F1。本研究利用高速逆流色谱分离和结晶法相结合的方法从放线菌 FIM 95-F1 胞内分离纯化抗真菌抗生素 S1。化合物理化性质和 UV、IR、MS 以及 NMR 等波谱分析结果表明化合物 S1 与抗真菌抗生素 Scopafungin 同质, 为 36 元环大环内酯类抗生素。S1 对白色念珠菌 (*Candida albicans*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 及红酵母 (*Rhodotorula* sp.) 均有抗菌活性, 其 MIC 分别为 0.234、0.469  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.234  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**关键词:** *Streptomyces castelarensis*; 分离纯化; 结构; scopafungin

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Antifungal Antibiotic S1 Produced by *Streptomyces castelarensis* FIM95-F1

PENG Fei, XIE Yang, CHEN Lu-jie, JIANG Hong, LIAN Yun-yang\*

Fujian key laboratory of Screening for Novel Microbial Products, Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou 350007

**Abstract:** Based on the taxonomic study, the antifungal antibiotic S1 producer FIM95-F1 was named as *Streptomyces castelarensis* FIM 95-F1 tentatively. The bioactive metabolite S1 was isolated and purified from the mycelia of strain FIM 95-F1 using high speed countercurrent chromatography (HSCCC) and crystallization methods. Basic physico-chemical properties and UV, IR, MS, and NMR spectra data suggested that antibiotic S1 was identical with Scopafungin, a 36-membered ring macrolide antibiotic. Antibiotic S1 showed potent antifungal activity against *Candida albicans*, *Rhodotorula* sp., and *Aspergillus niger* with MIC value of 0.234, 0.234  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0.469  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively.

**Key words:** *Streptomyces castelarensis*; isolation and purification; structure; scopafungin

近年来,随着免疫缺陷患者的增多以及临床上广谱抗生素、化疗药物和免疫抑制剂的大量使用,深部真菌感染的发病率逐年增加,再则真菌作为真核生物,其与人类细胞的高度相似性直接导致抗真菌药物的匮乏。现有的临床抗真菌药物如两性霉素等都具有很强的毒副作用,这也限制了它们的使用<sup>[1]</sup>。因此筛选强效低毒的抗真菌抗生素是当务之急。

本研究室从土壤中分离筛选出一株具有抗真菌活性的放线菌 FIM95-F1。经分类学的初步研究表明其归属于 *Streptomyces castelarensis* 的一个变种,暂定名为 *S. castelarensis* FIM95-F1。本研究首次利用高速逆流色谱(HSCCC)<sup>[2,3]</sup>和结晶法相结合的方法从

其胞内分离纯化抗真菌抗生素 S1,同时进行 S1 的结构鉴定和抗菌活性的相关研究。

## 1 材料和方法

## 1.1 菌种来源

FIM 95-F1 来自于福建省微生物研究所,其发酵代谢产物具有抗真菌活性。

## 1.2 菌株 FIM 95-F1 分类学研究

菌株 FIM95-F1 的孢子悬液在高氏-天冬素琼脂平板上划线,同时斜插无菌盖玻片,35  $^{\circ}\text{C}$  培养,分别于 5、10、20 d 取出盖玻片用光学显微镜及电镜观察菌丝及孢子的表面特征。培养特征和生理生化特性采用国际链霉菌规划(ISP)推荐的培养基 28  $^{\circ}\text{C}$  培养,不同时间观察并记录结果。碳源利用试验以不加淀粉的高氏一号琼脂为基础培养基,分别加入各种碳源 1.85% 28  $^{\circ}\text{C}$  培养,观察一个月。

菌株 16SrRNA 基因序列分析:总 DNA 提取采用参考文献中推荐的方法<sup>[4]</sup>。以总 DNA 为模板,引

收稿日期:2010-11-30 接受日期:2011-03-11

基金项目:福建省自然科学基金(2009J01077);国家重大专项“重大新药创新”药物筛选及相关技术平台(2009ZX9302-004;2010ZX09401-403)

\* 通讯作者 E-mail: yylian@tom.com

物序列如下: 27f: 5'-agagttgatcctggctcag-3'; 1492r: 5'-tacggctacctgttacgactt-3', Tag 酶进行 PCR 扩增。扩增程序采用: 94 °C 预变性 2 min 94 °C 变性 40 s 54 °C 退火 40 s 72 °C 延伸 3 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物的测序由北京泰京生物有限公司完成。测序结果在 NCBI 进行 BLAST 比对, 再通过软件 Clustalx ( version 1.8) 对扩增序列和 GenBank 中近缘典型菌种的序列进行比对, 用 MEGA4. 1 建系统发育树。

### 1.3 培养基和发酵培养条件

菌体接入种子培养基: 可溶性淀粉 15 g; 葡萄糖 5 g; 蛋白胨 5 g; 酵母粉 5 g;  $K_2HPO_4$  0.5 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g;  $CaCO_3$  1 g; NaCl 0.5 g;  $(NH_4)_2SO_4$  0.5 g;  $H_2O$  1000 mL pH7.5; 28 °C 220 r/min 培养 48 h, 以 5% 接种量接入发酵培养基: 可溶性淀粉 40 g; 葡萄糖 5 g; 花生饼粉 20 g; 蛋白胨 5 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g;  $K_2HPO_4$  0.5 g;  $CaCO_3$  1 g;  $H_2O$  1000 mL; pH7.5; 28 °C 220 r/min 培养 96 h。

### 1.4 分离纯化方法

#### 1.4.1 粗品分离

发酵液于 3800 r/min 离心 10 min, 菌渣于工业酒精中浸泡 24 h 后离心去渣, 有机相减压浓缩, 浓缩液用水饱和正丁醇萃取, 减压浓缩后得到粗品。

#### 1.4.2 高速逆流色谱分离

本研究采用上海同田生物 TBE-300 型高速逆流色谱仪 (HSCCC)。溶剂系统采用乙酸乙酯: 正丁醇: 水 (8:1:10), 本试验以上相作为固定相, 下相为流动相。将固定相泵满螺旋柱, 调节转速到 890 r/min (正转), 以 0.5 mL/min 的恒定速度将流动相泵入螺旋柱, 直到平衡状态。100 mg 粗品溶于 20 mL 的流动相中, 并引入螺旋柱, 以 0.5 mL/min 的流速洗脱, 分部收集流出液。高效液相 (HPLC) 分析收集液, 分析条件: Nucleo sil  $C_{18}$  色谱柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 7  $\mu$ m), 流动相甲醇-pH 4.0 磷酸缓冲液 (75:25), 流速 1 mL/min, 紫外检测波长 230 nm, 柱温 40 °C, 进样量 20  $\mu$ L。

#### 1.4.3 结晶法纯化

高效液相 (HPLC) 跟踪, 合并相同组分, 4 °C 静止过夜。出现细针状结晶的收集管离心 (4300 r/min) 15 min, 白色沉淀即为组分 S1 (30 mg)。

### 1.5 S1 的结构测定

S1 活性组分作 UV、IR、MS、HR-MS 以及 NMR 等波谱分析和理化性质分析, 推测其化学结构。

### 1.6 S1 的抗菌活性分析

抗菌活性测定中供试菌株为白色念珠菌 (*Candida albicans*) FIM B-03、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) FIM B-07 和红酵母 (*Rhodotorula sp.*) FIM B-05, 均由福建省微生物研究所提供。采用试管二倍稀释法测定 S1 抑菌活性<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 放线菌 FIM 95-F1 分类学研究

菌株 FIM95-F1 在高氏-天冬素琼脂上菌落圆形, 直径 3~6 mm, 边缘整齐, 菌落隆起, 表面平坦、光滑, 气丝覆盖整个菌落; 其基内菌丝分枝不断裂, 黄色; 气生菌丝灰色, 在酵母膏-麦芽膏琼脂 (ISP2)、燕麦琼脂 (ISP3)、酪氨酸琼脂 (ISP7) 上培养 15 d 后, 出现黑色吸水斑, 气丝上的孢子链为 3~5 圈的紧密螺旋 (图 1)。培养特征见表 1 (色谱采用“美国 ISCC-NBS 标准色彩”)。

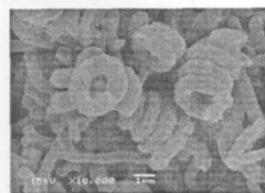


图 1 FIM95-F1 在高氏-天冬素琼脂上 28 °C 培养 10 d 的电镜扫描照片

Fig. 1 Scanning electron micrography of strain FIM 95-F1 grown on Gause-asparagine agar at 28 °C for 10 days. Bars 1  $\mu$ m.

菌株 FIM95-F1 碳源利用情况为: 能利用葡萄糖、蔗糖、淀粉、D-果糖、鼠李糖、绵子糖、乳糖、D-半乳糖、D-密二糖、D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露糖、海藻糖、D-纤维二糖、甘油、水杨素、甘露醇、赤酚醇、山梨醇、肌醇, 不利用 L-山梨糖、松三糖、菊糖、阿东糖醇、甜醇、纤维素、七叶苷。其生理生化特性为: 液化明胶, 牛奶凝固并胨化, 水解淀粉, 不还原硝酸盐, 不产生硫化氢和黑色素。菌株 FIM95-F1 的细胞壁含 LL-DAP 和甘氨酸, 为孢壁 I 型, 全细胞不含特征性糖, 为糖 C 型。测得菌株 FIM95-F1 的 16S rDNA 序列 1426 bp 与 Genebank 中基因序列进行 Blast 比对, 结果发现该菌与 *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *enhygrus* NRRL 3664 同源性最高, 达到 99%。用 Neighbor-Joining 法建立的 FIM 95-F1 与近缘典型菌株的 16S rDNA 系统发育树, 结果如图 2 所示。从系统发育树中可以看出, 菌

表 1 菌株 FIM95-F1 的培养特征

Table 1 The culture characteristics of strain FIM 95-F1

培养基 Medium	培养特征 Culture characteristics
ISP1	菌丝体絮状-颗粒状,乳白,沉于试管底部,培养液清亮,颜色未变。
ISP2	气丝:丰富,灰色-黑色,产生黑色吸水斑 基丝:良好,light yellow-strong yellow 可溶性色素:无
ISP3	气丝:丰富,灰黑,产生黑色吸水斑 基丝:良好,pale yellow 可溶性色素:无
ISP4	气丝:丰富,pale yellow-light olive gray, 基丝:中等,pale yellow-dark yellow 可溶性色素:无
ISP5	气丝:中等,yellowish white 基丝:良好,pale yellow-moderate yellow 可溶性色素:无
ISP6	气丝:无 基丝:中等,pale yellow 可溶性色素:无
ISP7	气丝:丰富,yellowish white,产生黑色吸水斑 基丝:良好,dark orange yellow-deep yellowish brown 可溶性色素:moderate yellowish brown
Czapek Solution Agar	气丝:薄,yellowish gray 基丝:差,yellowish gray 可溶性色素:无

株 FIM 95-F1 与 *S. rutgersensis* subsp. *castelarensis* DSM40830 形成一个分枝。Goodfellow<sup>[6]</sup> 等对 6 株吸水链霉菌重新进行分类鉴定,把 *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *enhygrus* NRRL 3664、*Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NRRL 3111 以及典型菌株 *Streptomyces rutgersensis* subsp. *castelarensis* DSM40830 归为同种,重定名为 *Streptomyces castelarensis* sp. nov. comb. nov.。菌株 FIM95-F1 形态特征、培养特性、生理生化特征以及 16S rDNA 序列分析表明该菌归属于 *Streptomyces castelarensis* 中的一个变种,暂定名为 *Streptomyces castelarensis* FIM95-F1。

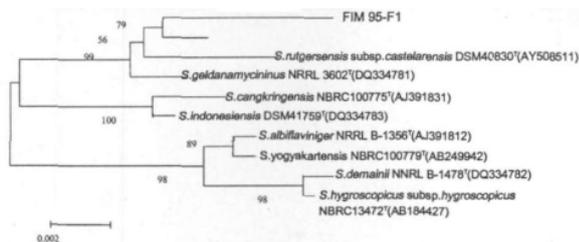


图 2 依据 16S rRNA 序列构建的 FIM95-F1 与典型菌株及其相关种、属的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree showing the relationship between strain FIM95-F1 and representative species of the genus *Streptomyces* based on nearly complete 16S rRNA gene sequences.

## 2.2 活性代谢活性的分离和纯化

FIM 95-F1 活性代谢产物经 HSCCC 分离、结晶纯化以及分析型 HPLC 检测和活性跟踪,发现含有两个活性组分(S1 和 S2),均具有抗红酵母、黑曲霉和白色念珠菌的活性,其中 S1 活性高于 S2,同时 S1 的含量高于 S2。

## 2.3 活性代谢产物结构解析

### 2.3.1 活性代谢产物物化性质

S1 组分的 HPLC 分析见图 3,洗脱曲线为单一的峰(HPLC 纯度为 96%),纯度达到化学结构测定的要求。该组分为白色针状结晶,易溶于甲醇、乙醇、正丁醇和冰醋酸,微溶于水、丙酮、二氯甲烷、氯仿、丁醇和乙醚。

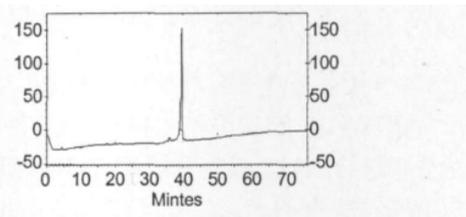


图 3 抗生素 S1 的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC spectrum of antibiotic S1

### 2.3.2 紫外吸收光谱

S1 组分的紫外扫描图谱(图 4)显示在 231 nm 处有最大吸收,推测其结构中含有共轭基团,又由于其在 254 nm 处没有吸收峰,故认为 S1 组分没有苯环结构,因此推测 S1 的结构中至少含有一个共轭双键。

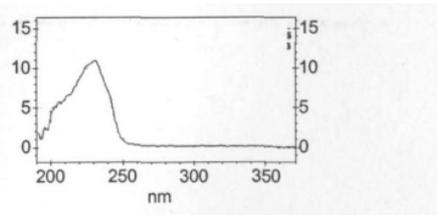


图 4 抗生素 S1 的紫外图谱

Fig. 4 UV spectrum of antibiotic S1

### 2.3.3 红外吸收光谱

S1 组分的红外吸收光谱如图 5 所示,在其特征频率区波数  $3367\text{ cm}^{-1}$  处有宽的强吸收峰,为 O-H 的伸缩振动; $2963\text{ cm}^{-1}$  和  $1383\text{ cm}^{-1}$  为 C-H 的伸缩振动吸收峰;指纹区  $1071\text{ cm}^{-1}$  处有 C-O 伸缩振动吸收峰,说明分子结构中有醇羟基; $1637\text{ cm}^{-1}$  表现为 C=C 伸缩振动(共轭)吸收峰,显示分子内有共

轭烯类结构; 1703  $\text{cm}^{-1}$  表现为羰基伸缩振动吸收峰; 1254  $\text{cm}^{-1}$  处有 C-N 伸缩振动吸收峰, 分子中应该有氨基。综合上述分析推断分子中具有羟基、胺基、烷基、羰基以及共轭双键等结构。

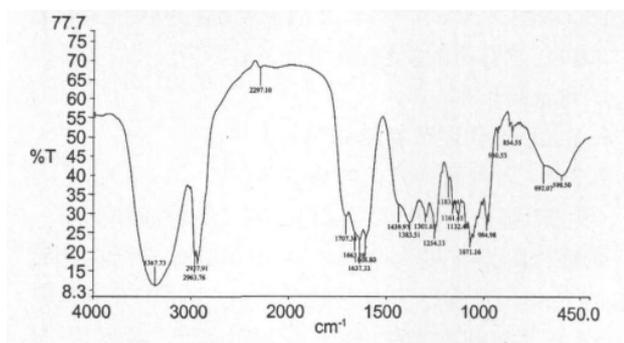


图5 抗生素 S1 的红外吸收光谱 (KBr)

Fig. 5 IR spectrum of antibiotic S1 (KBr)

### 2.3.4 低分辨质谱和高分辨质谱 (HR-MS) 分析

电喷雾正、负离子模式质谱分析 (图 6) 表明 S1 的分子量为 1142。而高分辨质谱 (HR-MS) 分析表明 S1 的分子式为  $\text{C}_{59}\text{H}_{103}\text{N}_3\text{O}_{18}$  与 Scopafungin<sup>[7-9]</sup> 一致。

### 2.3.5 核磁共振 (NMR) 分析

S1 与 Scopafungin<sup>[9]</sup> 的  $^{13}\text{C}$  NMR 对比结果见表 2。从 S1 的  $^{13}\text{C}$  NMR 的结果可以看出:  $\delta 158.2$  表明

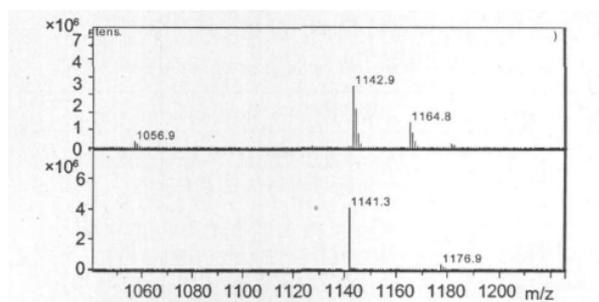


图6 抗生素 S1 的电喷雾正、负离子模式质谱图

Fig. 6 ESI-MS (Negative and Positive ion) of antibiotic S1

该化合物存在脲基的特征信号, 它也是 Scopafungin 的特征信号。同时在  $\delta 176.8$ 、174.1 和 171.7 的 3 组信号提示该分子中存在三个羰基碳。在  $\delta 136.9$ 、136.4、134.9、132.8、132.5、132.3、131.9 以及 129.8 的信号表明该分子中存在多个双键, 该化合物具有多个共轭体系的特征也与 S1 在 231 nm 处具有最大紫外吸收相吻合。从 S1 与 Scopafungin 的  $^{13}\text{C}$  NMR 其他信号的对比分析结果也表明二者在相应的化学基团上一一对应。

综合上述实验数据以及数据库检索分析, 推断菌株 FIM95-F1 所产生的抗真菌活性组分 S1 与抗真菌抗生素 Scopafungin 同质<sup>[7-9]</sup> 化学结构式如图 7 所示。

表 2 化合物 S1 与 Scopafungin<sup>[9]</sup> 的  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 的比较

Table 2 Comparison of  $^{13}\text{C}$  NMR data (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) between compound S1 and Scopafungin<sup>[9]</sup>

基团 Group	Scopafungin $\delta$ (ppm)	S1 $\delta$ (ppm)	基团 Group	Scopafungin $\delta$ (ppm)	S1 $\delta$ (ppm)
	177.0	176.8		45.2	45.4
	174.1	174.1		43.9	44.7
	171.7	171.7		42.8	42.3
	157.9	158.2		40.2	40.4
				32.6	32.7
				30.5	30.6
	136.6	136.9		28.4	28.3
	136.2	136.4		41.2	41.3
	134.8	134.9		40.7	40.5
	132.8	132.8		44.2	44.2
	131.9	132.5		42.1	42.0
	131.8	132.3		41.9	41.2
	131.7	131.9		39.2	39.4
	129.8	129.8		37.0	37.2
	99.8	99.9		33.6	33.8
	80.6	80.2		33.0	33.2

	77.1	77.8	30.3	30.0
	75.6	76.0	29.5	29.8
	75.4	75.8	27.3	27.6
	75.1	75.2	20.5	20.6
	74.5	75.1	17.8	18.0
	72.3	72.5	16.8	17.1
	72.1	72.1	15.3	15.4
	71.3	71.1	14.8	14.9
	69.5	69.7	14.6	14.8
	69.1	68.9	11.0	11.1
	66.0	66.3	10.5	10.6
	65.6	65.9		

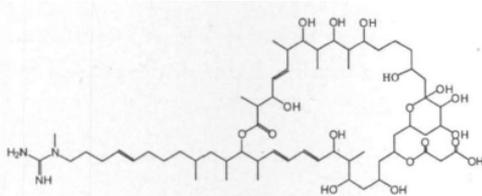


图7 Scopafungin 的化学结构  
Fig. 7 Structure of Scopafungin

#### 2.4 S1 抗菌活性分析

抗菌活性结果表明, S1 对测试真菌均具有较强抑制活性, 对白色念珠菌 (*Candida albicans*)、红酵母 (*Rhodotorula* sp.) 和黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 的 MIC 值分别为 0.234、0.234、0.469  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 对上述三种菌的 MFC 值 (最低杀菌浓度) 分别为 0.468、1.875、7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 3 讨论

本研究以放线菌 FIM 95-F1 为研究对象, 通过对菌株 FIM95-F1 细胞壁化学组分的分析得知其为 I 型, 无特征性糖, 表明 FIM 95-F1 为链霉菌属<sup>[10]</sup>。菌株 16SrDNA 序列分析发现其与 *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *enhygrus* strain NBRC 13978 相似性最高, 达到 99%。从系统发育树上可以看出, 它与 *S. rutgersensis* subsp. *castelarensis* DSM40830 在同一簇内, 自展值为 79%。而 Goodfellow 等学者已把上述菌株归类命名为 *Streptomyces castelarensis* sp. nov., 初步把菌株 FIM 95-F1 归属于 *Streptomyces castelarensis* 的一个变种。

高速逆流色谱应用于放线菌的分离纯化具有许多优点, 克服传统的色谱方法从相对低产的原始菌

株中分离活性代谢产物的一些缺陷, 如纸层析、柱层析以及薄层层析等, 往往出现上样体积太小、样品损失严重等现象, 而高速逆流色谱正好解决了这一问题。首先, 它用液态基质作为固定相, 不存在样品组分的吸附变性失活拖尾等现象; 其次, 它的分离效率高, 进样量大<sup>[2, 3]</sup>, 这对于样品的纯化制备显示出很大的优势。本文首次利用高速逆流色谱和结晶法相结合的方法从菌株 FIM 95-F1 中分离出具有抗真菌活性的非多烯大环内酯类抗生素 Scopafungin。

Scopafungin 是一类 36 元环的非多烯大环内酯类抗生素, 研究表明它对多数真菌具有抗菌活性, 其部分活性与目前临床普遍使用的抗真菌药物两性霉素 B (Amphotericin B) 相当<sup>[9]</sup>, 研究还表明该化合物具有抑制线粒体内的氧化磷酸化作用<sup>[11]</sup> 以及非专一性的 NADH 脱氢酶的抑制作用<sup>[12]</sup>。而本文从菌株 FIM 95-F1 代谢活性产物中也分离到抗真菌抗生素 Scopafungin, 而且发现其对白色念珠菌、红酵母和黑曲霉均具有显著的抑制作用, 同时本课题组有关 Scopafungin 细胞毒理试验表明其对老鼠淋巴细胞的毒性很小 (结果未显示), 该结论与 Tatsushi 等学者的实验结论一致<sup>[12]</sup>, 这为 Scopafungin 在抗真菌药物的研发及应用奠定了良好的基础。

致谢: 承蒙暨南大学中药及天然药物研究所高昊副教授、丁蓉、穆祯强以及焦伟华博士指导化学结构的解析, 谨此深致谢忱。

#### 参考文献

- Zhao XP (赵雪平), Shi NH (施南华), Li QF (李奇峰) *et al.* Advances in natural antifungals from microorganisms. *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志) 2005, 30: 512-512.

- 2 Foucault AP ,Chevolot L. Counter-current chromatography: instrumentation ,solvent selection and some recent applications to natural product purification. *J Chromatogr A* ,1998 , 808: 3-22.
- 3 Foucault AP. Enantioseparations in counter-current chromatography and centrifugal partition chromatography. *J Chromatogr A* 2001 ,906: 365-378.
- 4 Liu ZH( 刘志恒) ,Jiang CL( 姜成林) . Modern biology and biotechnology of actinomycete( 放线菌现代生物学与生物技术) . Beijing: Science Press 2004: 293-294.
- 5 Xiao YH( 肖永红) ,Wang QN( 王其南) ,Li CZ( 李崇智) , *et al.* In vitro antibacterial activities of cefodizime. *Sichuan Med J( 四川医学)* ,1997 3: 145-147.
- 6 KumarY ,Goodfellow M. Five new members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade: *Streptomyces castelarensis* sp. nov. ,comb. nov. ,*Streptomyces himastatinicus* sp. nov. ,*Streptomyces mordarskii* sp. nov. ,*Streptomyces rapamycinicus* sp. nov. and *Streptomyces ruanii* sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008 58: 1369-1378.
- 7 Johnson LE ,Dietz A. Scopafungin ,a crystalline antibiotic produced by *Streptomyces hygroscopicus* var. enhygrus var. nova. *Appl Microbiol* ,1971 22: 303-308.
- 8 Bergy ME ,Hoeksema H. Scopafungin ,a crystalline endomycin component. *J Antibiot* ,1972 25: 39-43.
- 9 Samain D ,Cook JC ,Rinehart KL ,*et al.* Structure of scopafungin ,a potent nonpolyene antifungal antibiotic. *J Am Chem Soc* ,1982 ,104: 4129-4141.
- 10 Xu LH( 徐丽华) ,Li WJ( 李文均) ,Liu ZH( 刘志恒) ,*et al.* Actinomycete Systematics—Principle ,Method and Practice( 放线菌系统学—原理、方法及实践) . Beijing: Science Press 2007: 384-385.
- 11 Reusser F. Scopafungin ,an inhibitor of oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem Pharmacol* ,1972 ,21: 1031-1038.
- 12 Mogi T ,Matsushita K ,Murase Y. *et al* Identification of new inhibitors for alternative NADH dehydrogenase ( NDH-II) . *FEMS Microbiol Lett* 2009 291: 157-161.