

袁建军. 一把伞南星拮抗性内生细菌筛选[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 373–374.

一把伞南星拮抗性内生细菌筛选

袁建军

(乐山职业技术学院, 四川乐山 614000)

摘要:一把伞南星具有很大的药用价值, 能够从其各个组织器官中分离具有抗菌活性的内生细菌。以耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 3 种菌为靶标菌, 一把伞南星内生细菌为目标菌, 以期筛选出对 3 种靶标菌有拮抗活性的菌株。结果表明, 一把伞南星中有大量的内生细菌, 分离获得 19 株内生细菌; 这 19 株内生细菌对 3 种靶标菌均有不同程度的拮抗作用; 皿内对峙法初筛结果, 9 株内生细菌对 3 种靶标菌拮抗作用较强, 牛津杯法复筛结果, 4 株内生细菌 (YJJ10、YJJ14、YJJ15 和 YJJ19) 对 3 种靶标菌的相对抑菌率均超过 100%, 其中 YJJ14 和 YJJ15 对 MRSA 的相对抑菌率分别达到 280.0% 和 215.7%。

关键词:一把伞南星; 内生细菌; 拮抗作用

中图分类号: Q93–331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)12–0373–02

自从成功研制和在临床上广泛应用抗生素以来, 目前为止能够在临床上应用的抗生素超过 350 种, 对于防治许多感染性疾病, 抗生素发挥了巨大的作用, 因而许多疾病得到了有效的控制或彻底的治疗^[1–2]。但是由于人们缺乏对抗生素药物正确的认识, 把抗生素药物当作能够治百病的灵丹妙药, 以至于各种抗生素被广泛地使用, 甚至达到滥用的程度, 这给病原菌产生耐药性提供了契机, 也最终导致抗生素逐步丧失其神奇的疗效^[3–4]。致病菌的耐药问题, 已成为当今感染性疾病的显著特点之一^[5]。其中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 已成为重要致病菌。MRSA 是金黄色葡萄球菌的一种, 其能够耐甲氧西林, 因此称为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, 能引起化脓性疾病, 大肠杆菌能引起肠道疾病, 金黄色葡萄球菌能够引起化脓和肠道疾病, 这 3 种细菌已成为当今临床治疗及预防控制医院感染的棘手问题^[6]。筛选出能抗 MRSA、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的内生细菌, 对预防控制其感染及其进行早期治疗, 有着十分重大的意义。

一把伞南星 [*Arisaema erubescens* (Wall.) Schott.] 是天南星科天南星属植物。多年生草本, 以球状块茎入药, 可用于临床燥湿化痰, 祛风止痉, 散结消肿, 是重要的解毒中药, 还可治疗痈肿及蛇虫咬伤^[7], 对钉螺有一定的毒杀作用^[8]。

本研究用分离得到的一把伞南星内生细菌分别对 3 种不同病原菌进行皿内对峙法初筛和牛津杯法复筛试验, 筛选到多株对 3 种靶标菌均有显著拮抗活性的菌株, 为一把伞南星资源的保护、开发及利用提供了菌种资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收稿日期: 2013–04–16

作者简介: 袁建军 (1963—), 男, 讲师, 主要从事遗传学、微生物学、生物化学、营养学教学实验。E-mail: 251548750@qq.com。

一把伞南星植株采自峨眉山七里坪 (海拔约 1 300 m), 采集后立即保存于采集袋内, 并迅速带回实验室, 分别取新鲜健康植株的根、茎、叶、花进行内生细菌的分离。

1.2 靶标菌

MRSA、*S. aureus*、*E. coli* 由本校病理实验室提供。

1.3 内生细菌的分离

分别取健康的一把伞南星的根、茎、叶、花, 按下列程序进行表面消毒。取 5~10 g 组织样品, 自来水冲洗表面的泥土等污物, 放于已灭菌的培养皿或三角瓶中, 无菌水冲洗 3~5 次, 有效氯含量为 5% 的次氯酸钠处理 3 次, 每次 2 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 将已完成表面消毒的样品放入无菌搅拌机中, 加无菌水打浆, 粉碎的组织液置于无菌的三角瓶中备用。分别移取最后 1 次冲洗液和榨汁液各 1 mL, 稀释 1×10^4 倍, 涂布于 NA 平板培养基上, 于 28 °C 下培养, 逐日观察。将挑取的单菌落划线接种于相对应的分离培养基平板, 28 °C 恒温培养, 重复以上步骤, 直至菌种纯化, 再转接单菌落至斜面培养基, 28 °C 培养 5~7 d, 之后 4 °C 保藏菌种。

1.4 一把伞南星拮抗性内生细菌初筛

在平板上分别接种 100 μ L MRSA、*S. aureus*、*E. coli* 培养液, 涂布均匀。将一把伞南星内生细菌的菌饼 (直径 7 mm) 的有菌面平整地贴在平板表面^[9–10], 置于培养箱上 28 °C 培养 2~3 d 后测量抑菌圈直径, 以无菌的培养基饼 (直径 7 mm) 代替内生细菌接种作为对照, 每种处理重复 3 次。相对抑菌率 = (抑菌圈直径 - 菌饼直径) / 菌饼直径 \times 100%。

1.5 一把伞南星拮抗性内生细菌复筛

为获得抑菌能力较稳定、较强的菌株, 将初筛获得的活性菌株用划线法分离纯化, 即在固体 NA 培养基上接种 100 μ L 初筛出的活性菌株, 涂布均匀, 28 °C 培养 1 d; 再转接到斜面上, 28 °C 培养 1 d, 制成菌悬液。在 NA 培养基上接种 100 μ L 3 种靶标菌培养液, 涂布均匀, 每个平板中插入 3 个牛津杯 (直径 7 mm), 并加入同种活性菌株菌悬液 100 μ L^[11]。于 28 °C 培养 4~5 d 后测量抑菌圈直径。在牛津杯中注入

100 μL 无菌水代替活性菌株菌悬液接种作为对照,每种处理重复 3 次。相对抑菌率(%)=(抑菌圈直径-牛津杯直径)/牛津杯直径×100%。

2 结果与分析

2.1 一把伞南星内生细菌的分离

从一把伞南星中分离获得 19 株内生细菌,依次编号为 YJJ01~YJJ19。

表 1 一把伞南星内生细菌初筛结果

拮抗菌株	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌		大肠杆菌		金黄色葡萄球菌	
	抑菌圈直径(mm)	相对抑菌率(%)	抑菌圈直径(mm)	相对抑菌率(%)	抑菌圈直径(mm)	相对抑菌率(%)
YJJ14	17.6±0.2**	151.4	12.4±0.2	77.1	17.2±0.4**	145.7
YJJ02	13.4±0.1*	91.4	15.1±0.1*	115.7	13.2±0.3*	88.6
YJJ12	22.5±0.2**	221.4	13.6±0.4*	94.3	15.0±0.2*	114.3
YJJ16	12.6±0.2	80.0	25.9±0.2**	270.0	13.7±0.2*	95.7
YJJ10	14.5±0.1*	107.1	14.5±0.1*	107.1	14.5±0.1*	107.1
YJJ09	15.2±0.1*	117.1	13.8±0.1*	97.1	13.2±0.2*	88.6
YJJ17	17.8±0.2**	154.3	15.6±0.2**	122.9	15.6±0.1**	122.9
YJJ19	16.6±0.2**	137.1	13.7±0.2*	95.7	13.8±0.2*	97.1
YJJ18	13.5±0.2*	92.9	18.8±0.1**	168.6	12.6±0.2	80.0

注: * 表示与对照相比差异达 0.05 显著水平, ** 表示与对照相比差异达 0.01 显著水平。

2.3 拮抗性菌株复筛结果

经过复筛后从 9 株内生细菌中筛选出 4 株抗性较明显的菌株,其中 YJJ14 和 YJJ15 对 MRSA 的拮抗效果十分明显,其抑菌圈都超过 20 mm,相对抑菌率超过 200%(表 2)。对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的拮抗作用相对要弱,但抑菌圈均超过 14 mm,相对抑菌率在 100% 以上。

表 2 拮抗菌株复筛结果

拮抗菌株	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌		大肠杆菌		金黄色葡萄球菌	
	抑菌圈直径(mm)	相对抑菌率(%)	抑菌圈直径(mm)	相对抑菌率(%)	抑菌圈直径(mm)	相对抑菌率(%)
YJJ10	15.2±0.2*	117.1	15.5±0.2*	121.4	15.5±0.2*	121.4
YJJ14	26.6±0.1**	280.0	14.5±0.3*	107.1	14.5±0.3*	107.1
YJJ15	22.1±0.2**	215.7	14.1±0.4*	101.4	14.1±0.4*	101.4
YJJ19	16.1±0.2**	130.0	14.6±0.2*	108.6	14.6±0.2*	108.6

注: * 表示与对照相比差异达 0.05 显著水平, ** 表示与对照相比差异达 0.01 显著水平。

3 讨论

通过菌饼法对目标菌(19 株一把伞南星内生菌)及靶细菌(MRSA,大肠杆菌,金黄色葡萄球菌)进行初筛和牛津杯法复筛。其中初筛筛选出 9 株对 3 种靶标菌具有拮抗作用的目标菌株,复筛筛选出 4 株对 3 种菌具有拮抗作用的稳定活性菌株。

在整个试验过程中,同一株内生细菌对于同一种病原细菌的抑制作用在初筛和复筛中并没有保持一致,而且差异较大。对于这种差异,可能是受分离得到的各株菌的稳定性的影响。

本试验以抑菌圈直径作为表征内生细菌是否具有拮抗作用的指标,只能定性反应内生细菌的拮抗活性,无法确定内生细菌抗菌的作用机制,还需要进一步研究,以确定抗菌作用机制。

参考文献:

[1] Arnold L D. 抗生素形成的生物学[J]. 张雁,译. 国外医药抗生素分册,1988,9(1):1-55.

[2] 吴碧文. 海洋真菌抗 MRSA 活性菌株的筛选及菌株 W0707 抗菌

活性物质的研究[D]. 海口:华南热带农业大学,2006.

[3] 顾觉奋,施 娟. 抗 MRSA 抗生素研究新进展[J]. 国外医药:抗生素分册,2004,25(5):216-220.

[4] 王 琳,时 萍,丁海燕,等. 157 株 MRSA 菌株的耐药调查及感染病例的药用分析[J]. 抗感染药学,2005,2(3):121-127.

[5] 张丽萍,王超强,张 伟,等. MRSA 的分布特点及耐药性分析[J]. 淮海医药,2004,22(4):331-331.

[6] 黄 辉,陈 颖,安如俊,等. MRSA 中 mecA 及 femB 基因的检测与耐药相关性[J]. 微生物学杂志,2009,29(3):54-56.

[7] 李 卉,李仲芳,刘 芳,等. 一把伞南星组织培养研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(8):2231-2231,2236.

[8] 柯文山,杨金莲,马安宁. 一把伞南星块茎水浸液的杀螺活性初探[J]. 公共卫生与预防医学,2007,18(5):21-22.

[9] 单文荣,刘花粉,李俊霞,等. 菌饼法筛选不同活性物对棉花黄萎病菌抑制效果研究[J]. 中国棉花,2010,37(8):16-18.

[10] Ramesh R A A, Joshi M P G. Pseudomonads: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, ralstonia solanacearum in the eggplant[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology,2009,25:47-55.

[11] 姜淑英,谭强来,徐 锋,等. 益生菌拮抗阪崎肠杆菌的初步研究[J]. 中国微生物生态学杂志,2011,23(1):1-4.