

康琳,魏金莉,胡蝶,等.雪胆中抗 MRSA 内生细菌的多样性[J].江苏农业科学,2014,42(2):303-305.

# 雪胆中抗 MRSA 内生细菌的多样性

康琳,魏金莉,胡蝶,刘佳凤,王毅鹏,杨帅丹,龚明福

(乐山师范学院生命科学学院/峨眉山特色生物资源重点实验室,四川乐山 614004)

**摘要:**从雪胆多种组织中分离、筛选出抗 MRSA 的菌株,采用总 DNA ERIC-PCR 方法和 16S rRNA 基因全序列分析方法,对抗 MRSA 的雪胆内生细菌进行遗传多样性和系统发育分析。结果表明,雪胆内生细菌非常丰富,分离获得 25 株抗 MRSA 菌株。在遗传距离为 0.50 时,25 株菌被划分为 4 个 ERIC 群和 1 个独立成群的菌株。

**关键词:**雪胆;内生细菌;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;多样性

**中图分类号:**S567.23+9.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)02-303-03

雪胆(*Hemsleya sinensis* Cogn.)为葫芦科雪胆属植物,含多种活性成分,具有多种药理作用,包括抗肿瘤<sup>[1]</sup>、改善微循环、广谱抗菌<sup>[2]</sup>、抗病毒<sup>[3]</sup>、保护肝脏<sup>[4]</sup>、治疗胃肠疾病<sup>[5]</sup>、降温<sup>[2]</sup>、抗炎镇咳<sup>[6]</sup>等作用,被广泛应用于临床,是一种具有发展前景的中药<sup>[7]</sup>。目前,对雪胆的研究取得了一定进展,如雪胆有效成分的提取工艺、作用机制、检测方法的建立等。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)为医院内感染的多重耐药性病原菌<sup>[8]</sup>,只对万古霉素敏感<sup>[9]</sup>,目前几乎所有国家都已有 MRSA 的报

道,我国各大医院 MRSA 的分离率也很高<sup>[10]</sup>,近年来在全世界蔓延的速度比较快。MRSA 除对甲氧西林耐药外,还对临床上广泛应用的多种抗生素耐药,导致感染呈散发性或暴发性流行,成为全世界范围抗细菌感染中的难题,已引起医药界专家与制药企业高度关注,因此,解决 MRSA 耐药性问题,即研发新的抗 MRSA 药物已经成为当今非常重要的任务。根据相似性原理,生活在药用植物组织中的内生细菌能产生与药用植物相似的活性成分。刘佳等筛选到 1 株具有抗 MRSA 活性的枯草芽孢杆菌,该菌产生的胞外抑菌物质对 MRSA 具有较好的抑制效果<sup>[11]</sup>。雪胆抗菌谱广,其内生细菌具有抗 MRSA 的潜力,因此从雪胆内生细菌中筛选抗 MRSA 菌株并通过发酵生产抗 MRSA 药物具有重要的意义和发展潜力。

收稿日期:2013-06-07

基金项目:四川省教育厅科研项目(编号:12ZA240);乐山师范学院科研项目(编号:Z1160)。

作者简介:康琳(1990—),女,本科生,从事微生物资源研究。

E-mail:947531778@qq.com。

通信作者:龚明福,教授,博士,从事微生物资源及微生物与植物间相互关系研究。E-mail:gongmingfu98@163.com。

件下的含量,相对来说避光更有利于底泥中磷的释放。这可能是由于光照会使底栖藻类生物作用更加旺盛,因此铁、铝等结合态磷更容易被藻类吸收同化,从而导致铁、铝等结合态的磷酸根离子的释放能力相对较弱,进而磷的释放量也随之减少。

## 3 结论

在试验周期内,煤渣和红土覆盖层均能有效抑制底泥中的磷向上覆水中释放;红土覆盖对底泥磷释放的控制效果比煤渣覆盖更好。酸性或碱性条件均有利于底泥中的磷向上覆水中释放,碱性条件比酸性条件更有利于底泥中磷的释放;在中性条件下,磷的释放量最小。环境温度对底泥中磷释放的影响较大,温度升高有利于底泥中磷的释放。扰动强度越大,在相同的试验时间内底泥中磷向上覆水中的释放量越大;在释放初期两者差异不大,随着时间的延长,两者差异越来越大。光照对原位覆盖法控制底泥中磷释放的影响不明显,相对来说避光更有利于底泥中磷的释放。原位覆盖法可以有效控制底泥中的磷向上覆水中释放。

## 参考文献:

[1]朱广伟,陈英旭,田光明.水体沉积物的污染控制技术研究进展

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

NA 培养基:牛肉膏 5 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g、琼脂

[J]. 农业环境保护,2002,21(4):378-380.

[2]Liu C H, Jay J A, Ika R, et al. Capping efficiency for metal-contaminated marine sediment under conditions of submarine groundwater discharge[J]. Environmental Science and Technology, 2001, 35(11): 2334-2340.

[3]朱兰保,盛蒂.污染底泥原位覆盖控制技术研究进展[J].重庆文理学院学报:自然科学版,2011,30(3):38-41,55.

[4]敖静.污染底泥释放控制技术的进展[J].环境保护科学,2004,30(6):29-32,35.

[5]Palermo M R. Design consideration for in-situ capping of contaminated sediments[J]. Water Science and Technology, 1998, 37(6/7):315-321.

[6]童昌华,杨肖娥,濮滨民.水生植物控制湖泊底泥营养盐释放的效果与机理[J].农业环境科学学报,2003,22(6):673-676.

[7]薛传东,杨浩,刘星.天然矿物材料修复富营养化水体的实验研究[J].岩石矿物学杂志,2003,22(4):381-385.

[8]朱兰保,盛蒂,葛友成.原位覆盖法控制底泥氮释放的研究[J].蚌埠学院学报,2013,2(3):29-31.

[9]HJ 636—2012 水质 总氮的测定 碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法[S].北京:中国标准出版社,2012.

[10]李寿泉.浅析环境因子对城市缓流水体底泥磷释放的影响[J].江苏环境科技,2007,20(6):13-16.

18 g、水 1 000 mL,pH 值 7.2 ~ 7.4;PDA 培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 18 g、水 1 000 mL,pH 值自然,121 ℃ 灭菌 30 min。

1.2 雪胆内生细菌的分离纯化

从峨眉山采集生长健康的雪胆,从其根茎组织中分离内生细菌。将待分离的新鲜雪胆根茎组织用自来水冲洗干净,并称取样品 1 g,先用 75% 乙醇浸泡消毒 5 min,再用 2% 次氯酸钠进行表面消毒 5 min,最后用无菌水冲洗 3 ~ 5 次;冲洗干净之后,每种样品中加入 10 mL 无菌水,放在无菌研钵中研磨,静置 20 min,取上清液按倍比稀释法系列稀释 1 000 倍后,取梯度稀释液 0.1 mL 涂布于平板上,每个处理重复 3 次,于 28 ℃ 下暗培养 72 h;最后一次冲洗的无菌水涂布在 NA 培养基上,于 28 ℃ 下暗培养 72 h,观察是否有菌落长出,进行无菌检验。

等菌落长出后观察菌落形态和菌体形态(包括大小、形状、颜色、表面光泽、透明度、质地、革兰氏染色反应、有无芽孢等),分别挑取不同的菌落,然后在培养基平板上纯化,将纯化后的内生细菌用相应的培养基斜面及甘油管于 4 ℃ 冰箱内保存备用。

1.3 抗 MRSA 内生细菌的筛选

1.3.1 初筛 在平板表面涂布 MRSA,晾干,取活化的内生细菌菌液一环点接到 NA 平板上;取无菌水代替内生细菌菌液点接到涂有指示菌 MRSA 的 NA 平板上培养,作为空白对照,每个处理重复 3 次。将平板置于 37 ℃ 培养箱中培养 24 h,测定抑菌圈直径并记录试验结果。

1.3.2 复筛 在平板表面涂布 MRSA,晾干,然后在平板上距离平板中心 1.5 cm 处放入牛津杯,吸取 100 μL 初筛的具有抑菌作用的内生细菌发酵液,加入到牛津杯中,用万古霉素代替内生细菌菌液作为阳性对照,每处理重复 3 次。将平板置于 37 ℃ 培养箱中培养 24 h,测量抑菌圈直径。

1.4 拮抗性雪胆内生细菌 ERIC-PCR 分析

拮抗性内生细菌基因组总 DNA 的提取方法参见徐琳等的方法<sup>[12]</sup>,特异性引物选取 ERIC1R(5'-ATGTAAGCTCCCTGGGGATTAC-3')和 ERIC2L(5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3')<sup>[13]</sup>,由上海生工生物工程技术有限公司合成。反应总体积为 25 μL,其组成为 10 × Buffer 2.5 μL、25 mmol/μL MgCl<sub>2</sub> 2.0 μL、2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL、20 pmol/μL ERIC1R 0.5 μL、20 pmol/μL ERIC2L 0.5 μL、13 μL ddH<sub>2</sub>O、模板总 DNA(40 ~ 80 ng/μL)4.0 μL。ERIC-PCR 反应程序参照马溪平等的方法<sup>[13]</sup>。反应结束后取出 PCR 小管,用 1% 琼脂糖凝胶电泳 3.5 h,利用凝胶成像系统仪拍照并保存图谱,凝胶图像经电脑扫描处理后,在同一位置有带的记为“1”,没有的记为“0”。采用 DPS 软件,用遗传距离按类平均连锁聚类法(UPGMA)进行 0-1 系统聚类分析,得出树状图<sup>[14]</sup>。

2 结果与分析

2.1 雪胆内生细菌的分离

将采集到的雪胆进行内生细菌分离,结果发现,在 NA 平板上长出大量菌落,且菌落形态存在明显差异,共得到 30 株内生细菌,依次编号为 KLXD01 ~ KLXD30,这表明雪胆组织

中存在大量的内生细菌。

2.2 抗 MRSA 内生细菌的筛选

采用平板对峙法初筛、牛津杯法复筛,从所分离到的 30 株内生细菌中共筛选出 25 株对 MRSA 具有抑制效果的菌株(表 1),不同细菌菌株的抑菌效果存在明显差异,KLXD06、KLXD17、KLXD21、KLXD24 等 4 株菌抗 MRSA 的效果较好,其中 KLXD06 抗 MRSA 最大,抑菌圈直径达 19.3 mm。

表 1 雪胆内生细菌对 MRSA 的抑菌效果

菌株	抑菌圈直径(mm)
KLXD01	11.667 ± 0.577 4b
KLXD02	8.000 ± 0.000 0a
KLXD03	6.333 ± 0.288 0a
KLXD04	6.333 ± 0.288 7a
KLXD05	8.000 ± 0.000 0a
KLXD06	19.300 ± 0.251 7c
KLXD07	7.667 ± 0.057 7a
KLXD08	7.333 ± 0.057 7a
KLXD09	8.000 ± 0.000 0a
KLXD10	9.667 ± 0.493 3a
KLXD11	14.000 ± 1.652 3b
KLXD12	8.000 ± 0.000 0a
KLXD14	11.667 ± 1.258 3b
KLXD15	11.667 ± 0.577 4b
KLXD16	8.333 ± 0.288 7a
KLXD17	17.333 ± 0.251 7c
KLXD18	7.507 ± 0.178 6a
KLXD19	8.333 ± 0.763 8a
KLXD20	11.507 ± 0.253 3b
KLXD21	18.507 ± 0.178 6c
KLXD22	12.667 ± 0.357 3b
KLXD23	6.333 ± 0.208 2a
KLXD24	17.333 ± 0.251 7c
KLXD25	7.333 ± 0.057 7a

注:同列数据后不同小写字母间表示差异显著(P < 0.05)。

2.3 拮抗性雪胆内生细菌 ERIC-PCR 分析

对 25 株拮抗性雪胆内生细菌进行 ERIC-PCR 扩增,结果表明,供试菌株 ERIC-PCR 图谱多呈现 3 ~ 5 条条带,其分布各不相同,其大小范围 100 ~ 1 500 bp(图 1),说明不同菌株在分子水平上存在差异。

用 DPS 软件系统采用类平均连锁法(UPGMA)对这些菌株的 ERIC-PCR 结果进行聚类分析,得到树状图(图 2)。从图 2 可以看出,在遗传距离为 0.71 时,所有供试菌株聚在一起;在遗传距离为 0.50 时,供试菌株进一步被划分为 4 个 ERIC 群和 1 个独立成群的菌株,4 个 ERIC 群分别命名为 I、II、III、V,每个群的菌株数依次为 6、8、5、5 株,中心菌株分别为 KLXD01、KLXD08、KLXD12、KLXD10。

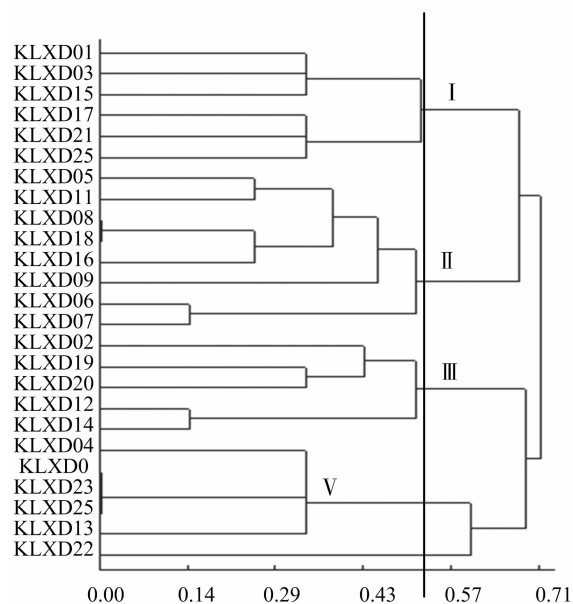
3 结论与讨论

雪胆植物内生细菌非常丰富,笔者从雪胆中分离到 30 株内生细菌。ERIC-PCR 结果显示,具有抗 MRSA 活性的 25 株菌株在遗传距离为 0.50 时被分为 4 个 ERIC 群和 1 个独立成群。

目前,我国以采用体外抑菌法从中草药及其提取物中筛



图1 拮抗性雪胆内生细菌ERIC-PCR指纹图谱



I~V为ERIC群编号；坐标轴上的数值为遗传距离

图2 拮抗性雪胆内生细菌ERIC-PCR指纹图谱数值分类树状图

选抗 MRSA 的物质为主,其中黄芩、黄连等表现出较好的抑菌效果<sup>[15-17]</sup>,但中草药成分复杂,分析其抑菌机制比较困难。多株已筛选出的放线菌对 MRSA 具有较好的抑制效果<sup>[11,18-19]</sup>。张守村等从苦豆子内生细菌中筛选到 1 株抗 MRSA 活性较强的菌株<sup>[20]</sup>。从其他药用植物内生细菌中筛选抗 MRSA 菌株还鲜见报道。雪胆抗菌谱广,其内生细菌抗 MRSA 活性强,笔者从雪胆中分离到 30 株内生细菌,有 25 株菌株具有较强的抗 MRSA 活性,其中雪胆内生细菌 KLXD06 的抗 MRSA 活性最强,有生产抗 MRSA 活性药物的潜力,但该菌株的系统发育地位还需要进一步确定。

#### 参考文献:

- [1] 陶朝阳,易杨华,林厚文,等. 雪胆根抗肿瘤活性成分研究[J]. 第二军医大学学报,1999,20(5):337-338.
- [2] 李亮,朱玲,刘蓉,等. 雪胆素的药理学试验[J]. 四川生理科学杂志,2005,27(3):135.
- [3] 田仁荣,陈剑超,张高红,等. 雪胆素 A 和 B 的体外抗 HIV-1 活性:英文[J]. 中国天然药物,2008,6(3):214-218.
- [4] 施亚琴,杨培全,台云梅,等. 反相高效液相色谱法测定不同采收

期长果雪胆中雪胆甲素的含量[J]. 中国中药杂志,1996(5):20-21.

- [5] 刘艳丽,李笑然,范金胤,等. 雪胆胃肠丸对胃溃疡的作用实验研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(2):301-302.
- [6] 陈夏静,伍怡颖,匡文娟,等. 雪胆素片抗炎镇咳作用的实验研究[J]. 四川生理科学杂志,2009,31(4):153-154.
- [7] 杨群芳,王贤英. 中药雪胆及其制剂的研究进展[J]. 中国药业,2003,12(9):76-77.
- [8] Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, et al. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2002, 292(2): 67-74.
- [9] Liñares J. The VISA/GISA problem: therapeutic implications [J]. Clin Microbiol Infect, 2001, 7(Suppl): 8-15.
- [10] 张小青,易婷,林春婵,等. 医院感染现患率调查与分析[J]. 中华医院感染学杂志,2005,15(12):1352-1354.
- [11] 刘佳,谢秀丽,牛天贵. 一株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)芽孢杆菌的筛选与鉴定[J]. 中国农业大学学报,2007,12(6):20-23.
- [12] 徐琳,徐佳洁,刘巧莉,等. 西北部分地区苦马豆根瘤菌的遗传多样性[J]. 生物多样性,2009,17(1):69-75.
- [13] 马溪平,邱媛,徐成斌,等. 制药废水处理系统微生物群落动态变化的 ERIC-PCR 指纹图谱分析[J]. 辽宁大学学报:自然科学版,2008,35(2):158-161.
- [14] 唐启义,冯明光. DPS 数据处理系统:实验设计、统计分析 & 数据挖掘[M]. 北京:科学出版社,2007.
- [15] 汪雅萍,陈同钧. 十一种中草药对细菌的体外抑菌作用分析[J]. 上海医学检验杂志,1999,14(4):206-207.
- [16] 杨明伟,陆付耳,徐丽君,等. 20 种清热解毒中药对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌体外抑菌的初步观察[J]. 中国药师,2006,9(2):141-142.
- [17] 左国营,王根春,徐贵丽,等. 30 种中草药提取物体外抗 MRSA 的筛选研究[J]. 中国现代应用药学,2006,23(4):293-295.
- [18] 黄惠琴,吕家森,张开山,等. 一株抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的海洋放线菌的鉴定及系统发育分析[J]. 中国海洋药物,2004,23(6):23-26.
- [19] 高正航. 霸王岭土壤抗 MRSA 活性放线菌的筛选及菌株 Gda031/Gda0305 发酵工艺的优化[D]. 儋州:华南热带农业大学,2006.
- [20] 张守村,韩松,黄晓艳,等. 一株抗 MRSA 内生细菌的鉴定及其活性物质的初步研究[J]. 微生物学通报,2011,38(6):860-864.