

唐 梅, 龚明福, 管岑澜, 等. 峨眉山异叶天南星抗 MRSA 内生细菌的筛选[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 388–389.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.130

# 峨眉山异叶天南星抗 MRSA 内生细菌的筛选

唐 梅<sup>1</sup>, 龚明福<sup>1</sup>, 管岑澜<sup>1</sup>, 罗 燕<sup>2</sup>

(1. 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 614000; 2. 乐山师范学院工会, 四川乐山 614000)

**摘要:**从峨眉山采集异叶天南星(*Arisema heterophyllum* Blume)健康植株, 采用平板涂布法从其根、茎、叶各组织分离纯化内生细菌, 采用菌饼平板对峙培养法初步筛选抗甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的菌株, 采用牛津杯法进一步筛选抗性菌株。结果表明, 可以从峨眉山异叶天南星根、茎、叶各组织中分离得到 26 株内生细菌; 初筛结果显示, 26 株内生细菌对 MRSA 均有抗菌活性, 其中平均抑菌圈直径超过 12 mm 的有 12 株; 复筛结果显示, 12 株拮抗菌抗 MRSA 活性稳定, 与初筛结果无明显差异, 菌株 YG009、YJ009 抗 MRSA 活性最强, 与其他菌株存在极显著差异, 有开发抗 MRSA 新药的潜力。

**关键词:**异叶天南星; 内生细菌; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 峨眉山; 筛选

**中图分类号:** S567.23+9.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)07-0388-02

异叶天南星(*Arisema heterophyllum* Blume)为天南星科天南星属多年生草本植物, 全国各地均有分布, 主要以块茎入药<sup>[1]</sup>。相关研究结果表明, 天南星科药用植物在毒性、刺激性、药用成分、药理活性等很多方面的相似性可以达到 80% 以上<sup>[2]</sup>, 因此异叶天南星具有与天南星科药用植物相似的功效, 且对惊厥等疾病有较好治疗作用<sup>[3]</sup>。植物的内生菌(endophyte)是指在一定或全部阶段生活在健康植物组织内部的微生物, 普遍存在于高等植物中。内生菌由于长期生活在植物组织内部而与植物和谐生长, 能够产生与宿主植物所产生的相同或相似的活性化合物<sup>[4]</sup>。

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是临床上常见的 1 种毒性比较强的细菌<sup>[5]</sup>, 是金黄色葡萄球菌的 1 种, 但能够耐甲氧西林, 可引起多种化脓性疾病。MRSA 除了对甲氧西林有耐药性外, 还对临床上应用的多种抗生素具有耐药性, 所导致的感染呈暴发性或散发性流行, 治疗极其困难, 致死率极高, 成为全世界范围内抗感染的难题<sup>[6]</sup>。从药用植物中筛选出抗 MRSA 的内生细菌, 对于预防和控制由 MRSA 引起的感染具有重要意义<sup>[7]</sup>。本研究从采自峨眉山的异叶天南星的根、茎、叶组织中分离内生细菌, 采用牛津杯法测定内生细菌对 MRSA 的抑菌活性, 从中筛选抗 MRSA 活性强的菌株, 为抗 MRSA 新药筛选及峨眉山异叶天南星的保护及开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2013 年 8 月 5 日从峨眉山万年寺(海拔约 800 m)附近采集健康的异叶天南星植株, 采集后立即保存于袋内, 并迅速带

收稿日期: 2014-08-03

基金项目: 乐山师范学院科研项目(编号: Z1160)。

作者简介: 唐 梅(1971—), 女, 重庆人, 硕士, 副教授, 主要从事微生物分子生物学研究。E-mail: 764301686@qq.com。

通信作者: 龚明福, 博士, 教授, 主要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。

回实验室进行内生细菌的分离。MRSA 由峨眉山特色生物资源重点实验室提供。

### 1.2 内生细菌的分离

分别取健康异叶天南星的根、茎、叶 5~10 g, 用自来水冲洗表面的泥土等污物后用无菌水冲洗 3~5 次, 再分别用有效氯含量为 5% 的次氯酸钠消毒 2 min、75% 乙醇消毒 1 min、0.1% HgCl 消毒 5 min, 再用无菌水冲洗 3~5 次后放入无菌搅拌机中打浆, 粉碎的组织液置于无菌的三角瓶中备用。分别取最后 1 次冲洗液和粉碎的组织液各 1 mL, 稀释 10 000 倍, 涂布于 NA 平板培养基(蛋白胨 0.3%、牛肉膏 0.5%、NaCl 0.5%、葡萄糖 0.5%、琼脂 1.8%~2.0%、pH 值 7.0)上, 于 28 ℃ 下培养, 逐日观察。将挑取的单菌落划线纯化后接种至斜面培养基, 28 ℃ 培养 5~7 d, 之后于 4 ℃ 保藏菌种。

### 1.3 异叶天南星拮抗性内生细菌初筛

在 NA 平板上涂布接种 100 μL MRSA 培养液, 将异叶天南星内生细菌的菌饼(直径 7 mm)有菌面平整贴在平板表面, 28 ℃ 培养 2~3 d 后用十字交叉法测量抑菌圈直径, 即通过 2 次十字方位来测量同一抑菌圈的直径, 然后再将测得的 2 次数据求平均值, 即为该内生细菌抑菌圈的直径。以无菌的培养基饼(直径 7 mm)代替内生细菌接种作为对照, 每个处理重复 3 次。

### 1.4 异叶天南星拮抗性内生细菌复筛

为了获得抑菌能力较稳定、较强的菌株, 将初筛获得的活性菌株纯培养后制成菌悬液。在 NA 培养基上涂布接种 100 μL MRSA 培养液, 涂布均匀, 每个平板中等距离均匀插入 3 个牛津杯(直径 7 mm), 每个牛津杯接种同种活性菌株菌悬液 100 μL。28 ℃ 培养 2~3 d 后用十字交叉法测量抑菌圈直径。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, 每个处理重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 异叶天南星内生细菌的分离纯化

采用组织液涂布分离方法从异叶天南星健康植株的根、

茎、叶中共分离纯化得到 26 株内生细菌。其中从根中分离出 9 种菌株,编号依次为 YG001 – YG009;从茎中分离出 11 种菌株,编号依次为 YJ001 – YJ011;从叶中分离出 6 种菌株,编号依次为 YY001 – YY006。

2.2 抗 MRSA 内生细菌初筛结果

将分离纯化得到的 26 株异叶天南星的内生细菌制成菌饼,然后采用平板对峙法测定内生细菌对 MRSA 的抑菌活性。结果表明,26 株内生细菌对 MRSA 均有抑菌活性,但各菌株间抑菌活性存在较大差异(表 1),其中平均抑菌圈直径超过 12 mm 的菌株有 12 种,分别为 YG009、YJ009、YJ004、YJ002、YJ006、YJ003、YG001、YG008、YJ011、YJ007、YY003、YY001,选取这 12 株内生细菌进行复筛。

表 1 初筛内生细菌对 MRSA 的抑菌圈直径

菌株号	抑菌圈直径(mm)				标准差
	重复 1	重复 2	重复 3	平均值	
YG001	13.8	13.5	13.4	13.6bcBCD	0.21
YG002	8.5	8.5	8.0	8.3ijIJ	0.29
YG003	10.6	10.8	10.6	10.7fFG	0.12
YG004	10.0	10.2	10.4	10.2gGH	0.20
YG005	9.5	9.7	10.0	9.7ghH	0.25
YG006	11.2	10.8	11.2	11.1efF	0.23
YG007	10.2	9.8	10.2	10.1ghGH	0.23
YG008	13.8	13.6	13.2	13.5bcCD	0.31
YG009	14.2	14.4	14.2	14.3aA	0.12
YJ001	8.1	8.5	7.9	8.2jIJ	0.31
YJ002	14.0	14.2	14.4	14.2aABC	0.20
YJ003	13.9	13.8	14.0	13.9abABC	0.10
YJ004	14.6	13.9	14.2	14.2aAB	0.35
YJ005	9.8	9.5	10.1	9.8ghH	0.30
YJ006	14.3	13.9	14.1	14.1aABC	0.20
YJ007	13.2	13.0	13.2	13.1cdDE	0.12
YJ008	9.7	9.5	9.6	9.6hH	0.10
YJ009	14.2	14.4	14.2	14.3aA	0.12
YJ010	8.4	8.5	7.0	8.0jJ	0.84
YJ011	13.0	13.3	13.4	13.2cdDE	0.21
YY001	12.8	12.9	12.6	12.8dE	0.15
YY002	8.4	8.8	8.9	8.7iI	0.26
YY003	13.0	13.2	12.4	12.9dE	0.42
YY004	11.0	11.2	11.4	11.2eF	0.20
YY005	10.0	10.3	9.8	10.0ghGH	0.25
YY006	8.2	8.5	8.6	8.4ijIJ	0.21

注:同列数据后标有小写、大写字母不同者分别表示差异显著( $P<0.05$ )、极显著( $P<0.01$ )。表 2 同。

2.3 抗 MRSA 内生细菌复筛结果

对初筛中抑菌直径超过 12 mm 的 12 株菌株采用牛津杯法复筛,结果表明,12 株菌株对 MRSA 均具有较高的抑菌活性(表 2)。其中 YG009、YJ009 对 MRSA 的抑菌活性最强,与其他菌株差异极显著。各菌株抑菌活性与初筛结果无明显差异,表明各菌株抑菌活性相对稳定。

表 2 复筛活性菌株对 MRSA 病原细菌的抑菌圈直径

菌株号	抑菌圈直径(mm)				标准差
	重复 1	重复 2	重复 3	平均值	
YG001	14.0	13.8	13.9	13.9bB	0.10
YG008	13.8	14.0	14.0	13.9bB	0.12
YG009	14.5	14.4	14.8	14.6aA	0.21
YJ002	14.2	14.0	14.3	14.2bB	0.15
YJ003	14.2	13.8	13.9	14.0bB	0.21
YJ004	14.1	13.9	14.1	14.0bB	0.12
YJ006	14.2	13.9	14.2	14.1bB	0.17
YJ007	13.3	13.2	13.3	13.3cC	0.06
YJ009	14.6	14.8	14.4	14.6aA	0.20
YJ011	13.0	13.2	13.1	13.1cC	0.10
YY001	12.5	12.8	12.4	12.6dD	0.21
YY003	12.6	12.5	12.9	12.7dD	0.21

3 结论与讨论

本试验材料是从峨眉山海拔 800 m 左右的地方采集的天南星科健康植物异叶天南星,从根、茎、叶组织中共分离纯化得到 26 株内生细菌,这 26 株内生细菌对 MRSA 均有抑菌活性,但不同菌株抑菌活性存在差异。初筛中平均抑菌圈直径超过 12 mm 的菌株有 12 株,这 12 株菌株在复筛中仍然表现出较强的抑菌活性,其中 YG009、YJ009 对 MRSA 的抑菌活性最强,有进一步研究开发抗 MRSA 新药的潜力。

从健康植株异叶天南星根、茎、叶中分别分离得到内生细菌,植株不同组织部位的内生细菌对病原菌 MRSA 的抑菌效果不同,从初筛、复筛结果来看,异叶天南星根、茎分离得到的内生细菌对 MRSA 的抑菌活性更强,这与异叶天南星主要以根入药相吻合,同时表明茎可能也具有较好的药用价值。

不同内生细菌在初筛、复筛试验中对 MRSA 的抑菌活性相对稳定,表明这些内生细菌产生抗 MRSA 活性物质能力是可以稳定遗传的。

参考文献:

[1] 宋良科. 峨眉山天南星科药用植物资源研究[J]. 中国野生植物资源,2006,25(1):35 – 36,52.  
[2] 赵清,郭辉,崔桂华. 几种天南星科药用植物的相似性研究[J]. 河北医药,2009,31(21):2975 – 2977.  
[3] 孙红祥,叶益萍. 天南星类药材的综合质量评价[J]. 生物数学学报,2003,18(2):243 – 248.  
[4] 江曙,钱大玮,段金彪,等. 植物内生菌与道地药材的相关性研究[J]. 中草药,2008,39(8):1268 – 1272.  
[5] 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.  
[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] 王天昊,马朋林. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的管理:关注宿主[J]. 临床药物治疗杂志,2012,9(5):5 – 7.