

一株抗 MRSA 内生细菌的鉴定及其活性物质

张守村^{1,2} 韩松¹ 黄晓艳¹ 梅文莉² 林天兴³ 龚明福^{1*}

- (1. 塔里木大学生命科学学院 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室 新疆 阿拉尔 843300)
- (2. 农业部热带农业生物技术重点实验室 中国热带农业科学院热带农业生物技术研究所 海南 海口 571101)
- (3. 乐山师范学院化学与生命学院 四川 乐山 634004)

摘要: 根据生理生化特征和 16S rDNA 序列, 对一株从新疆苦豆子 *Sophora alopecuroides* 中分离的、对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)具有较强拮抗作用的内生细菌菌株 KDNB6 进行鉴定; 并通过硅胶柱、凝胶柱层析从该菌发酵产物中分离纯化了抗 MRSA 的活性物质。结果表明菌株 KDNB6 各项特征与粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* 最为接近, 鉴定为 *S. marcescens*。从菌株 KDNB6 的代谢产物中分离到一个抗 MRSA 的活性成分。

关键词: MRSA, 内生细菌, 粘质沙雷氏菌, 苦豆子, 鉴定

Identification of endophytic bacteria KDNB6 from *Sophora alopecuroides* and antibacterial substance against MRSA

ZHANG Shou-Cun^{1,2} HAN Song¹ HUANG Xiao-Yan¹ MEI Wen-Li²
LIN Tian-Xing³ GONG Ming-Fu^{1*}

- (1. Key Laboratory of Protection & Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production Construction Corps, College of Life Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China)
- (2. Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China)
- (3. School of Chemistry and Life Sciences, Leshan Normal University, Leshan, Sichuan, 634004, China)

Abstract: An endophytic bacterium isolated from *Sophora alopecuroides* in Xinjiang, which had a conspicuous antagonistic effect on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), was studied and bioactive substances were separated and purified. Strain KDNB6 was identified as *Serratia marcescens* by its morphological, physiological and biochemical properties and 16S rDNA sequences. An anti-MRSA active component produced in fermentation broth was separated and purified by silica

gel column chromatography and sephadex gel column chromatography.

Keywords: MRSA, Endophytic bacteria, *Serratia marcescens*, *Sophora alopecuroides*, Identification

内生细菌广泛存在于植物的各种组织中, 由于植物组织内部稳定的生存环境, 使内生细菌具有抗菌、抗病毒、抗干旱、抗虫等多种生物学功能^[1]。自 Stierle 等人^[2]首次从短叶红豆杉的树皮中分离出能产紫杉醇的内生真菌以来, 人们已经形成共识: 植物内生菌是产生新的活性化合物的重要菌种来源。何红等^[3]从辣椒中分离出一株内生枯草芽孢杆菌, 该菌产生的环脂抗菌多肽对番茄青枯病菌和植物炭疽病菌等植物病原菌具有较强的抑制作用。

苦豆子 *Sophora alopecuroides* 是豆科多年生耐盐旱生草本植物, 抗逆能力强, 因含有多种单体生物碱而具有抗癌、提高免疫力等活性^[4]。基于植物内生菌可产生与宿主相同或相似的活性物质, 苦豆子内生细菌有可能产生与苦豆子体内相同或相似的生物碱而具有抑菌抗癌活性^[4-5], 或者与苦豆子植物较高的抗逆能力有关^[6-7]。

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)为医院内感染的重要病原菌^[8]。MRSA 在临床上表现为多重耐药性, 只对万古霉素敏感^[9], 已在美国、日本、法国、韩国等地相继报道, 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。解决 MRSA 耐药性问题, 即研发抗 MRSA 新的药物已经成为当今非常重要的任务。

我们从新疆药用植物苦豆子中分离到一株内生细菌, 该菌株不仅对至少 8 种植物病原真菌有较强的拮抗作用^[5], 而且有较强的抗 MRSA 活性。本文对该菌株进行了鉴定, 并对其抗 MRSA 活性物质进行初步研究, 以期开发新的抗 MRSA 的药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

菌株 KDNB6 由本课题组分离于新疆药用植物苦豆子, MRSA 由中国热带农业科学院热带生物技术研究所提供。

1.2 培养基

NA 培养基(g/L): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 20, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0-7.2。玉米蔗糖培养基(g/L): 玉米粉 60, KH₂PO₄ 3, 维生素 B1 0.1, 蔗糖 10, MgSO₄·7H₂O 1.5, 水 1 000 mL。维生素 B1 单独灭菌 15 min 后加入。

1.3 主要仪器与试剂

GOODLOOK-1000 型薄层色谱成像系统(上海科哲生化科技有限公司); PTC100 PCR 仪(美国伯乐公司); Sigma 3-18K 冷冻离心机(德国 Sigma 公司); Heidolph Laborota220L 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 集团); 柱层析硅胶和薄层层析硅胶板均为青岛海洋化工厂产品; 其他试剂均为分析纯级。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 形态特征: 采用营养琼脂平板于 28 °C 培养 48 h, 观察菌落形态。用光学显微镜观察菌体形状和大小。

1.4.2 培养特征和生理生化试验: 按照《伯杰细菌系统鉴定手册》^[10]与《常见细菌系统鉴定手册》^[11]提供的方法对菌株进行荚膜染色、芽孢染色、革兰氏染色试验、厌氧生长试验、葡萄糖产气试验、接触酶试验、氧化酶试验、苯丙氨酸试验、脲酶试验、V-P 测定试验、明胶液化试验、硝酸盐还原试验、糖醇类发酵试验、赖氨酸脱羧酶试验、ONPG 测定试验、硫化氢试验、吲哚试验、甲基红试验、柠檬酸利用试验、精氨酸双水解酶试验、丙二酸利用试验, 于 28 °C 培养 18-72 h 后观察记录特征。同时进行氧化酶、接触酶、脲酶、H₂S、甲基红、氨基酸利用、糖醇发酵、脱羧酶反应等实验。

1.4.3 分子生物学鉴定: 16S rDNA 序列测定按照《分子克隆实验指南》^[12]所提供的方法进行。用溶菌酶法^[13]提取基因组 DNA, 采用通用引物 R1492 (5'-ACGGCTACCTTACGACT-3')和 F27 (5'-AGAGT TTGATCCTGGCTCAG-3')^[14]进行 16S rDNA 扩增, 以菌株 KDNB6 基因组 DNA 为模板进行扩增(94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循

环; 72 °C 2 min)。扩增产物由上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 将所测序列在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)做 BLAST 后与相似性较高的相关菌株通过 ClustalX 进行多序列比对, 系统进化矩阵根据 Kimura 模型估算, 用 MEGA 4.0 (Molecular evolutionary genetics analysis)软件采用邻接法(Neighbor-Joining)聚类分析, 并构建系统发育树^[15], 以确定该菌株分类地位。

1.5 抗 MRSA 活性物质的提取及其活性测定

1.5.1 抗 MRSA 活性物质的提取分离: 将菌株 KDNB6 接种于 NA 培养基斜面活化, 按 5%接种量接种至 80 L 玉米粉蔗糖培养基, 25 °C、200 r/min 振荡培养 2 d, 再静置培养 5 d, 用纱布过滤, 滤液于 45 °C 下减压浓缩至 5 L, 先后用等体积的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各萃取 3 次, 最后剩余部分为水相, 各部分萃取物分别经减压浓缩后得到相应的提取物。采用生物活性测试方法^[16]测定各种提取物的抗 MRSA 活性。对活性提取物采用硅胶柱层析方法分离纯化抗 MRSA 活性成份^[17], 用活性跟踪法跟踪抑菌活性物质的去向, 用氯仿/甲醇系统展开, 采用高效薄层层析色谱(TLC)追踪斑点, 以浓硫酸/乙醇显色剂或紫外光显迹。将在同样的展开剂中颜色位置相同的斑点合并, 经硅胶柱层析和凝胶柱层析分离纯化, 得到活性化合物。

1.5.2 活性物质抗 MRSA 试验: 采用滤纸片扩散法(Kirby bauer method, KB 法)^[18]测定样品的抑菌活性。在 NA 培养基平板上均匀涂布 MRSA 培养液。用无菌镊子将滤纸片(直径 8 mm)平整地贴在平板表面。将样品用甲醇稀释至浓度为 10 g/L, 取待测样品 10 μL 加到滤纸片上, 待有机溶剂挥发完后用 KB 法测定对 MRSA 的抑菌效果, 同时将 10 μL 甲醇滴加到滤纸片上, 待甲醇完全挥发后测定对 MRSA 的抑菌效果, 以滴加 10 μL 甲醇的滤纸片作为空白对照, 37 °C 培养 24 h 后测量抑菌圈直径。

1.5.3 活性物质的硅胶板薄层层析: 对所分离到的活性成分进行硅胶板薄层层析。将点样后的硅胶板置入层析缸中展开, 展层剂为氯仿:甲醇=6:1 (V/V)。待层析结束后取出硅胶板, 用吹风机吹干, 用薄层

色谱成像系统观察, 以确定 R_f 值。

2 结果

2.1 菌种鉴定

2.1.1 形态特征: 菌株 KDNB6 在营养琼脂培养基上生长良好, 菌落红色, 表面光滑不透明, 边缘整齐, 稍凸, 菌株细胞呈短杆状, 无荚膜, 无芽孢, 革兰氏阴性菌。

2.1.2 培养特征和生理生化特性: 菌株在营养肉汤培养基里扩散性浑浊, 在厌氧生长、葡萄糖氧化发酵、接触酶、V-P 测定、明胶液化、硝酸盐还原、赖氨酸脱羧酶、ONPG 测定、柠檬酸利用、精氨酸双水解酶试验中显示阳性; 苯丙氨酸脱氨酶、脲酶、硫化氢、吲哚、甲基红(MR)、丙二酸利用试验显示阴性。糖醇类发酵试验中, 甘露醇、木糖、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、D-山梨糖、麦芽糖能被利用, 卫茅醇、棉籽糖、鼠李糖、半乳糖、阿拉伯糖不能被利用。

2.1.3 菌株 KDNB6 的 16S rDNA 分子鉴定: KDNB6 在 GenBank 的基因登录号为 HQ123464, 与 GenBank 中相似性较高的相关菌株构建的系统发育树见图 1。从图 1 可以看出, KDNB6 与粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* 最为接近, 综合该菌的形态特征、培养特征及生理生化性状测定结果, 将该菌鉴定为 *S. marcescens*。

2.2 活性物质纯化与抑菌效果及薄层层析结果

2.2.1 活性物质纯化与抑菌效果: 活性跟踪显示乙酸乙酯萃取液具有活性, 将乙酸乙酯萃取液经减压浓缩, 再进行硅胶柱层析, 以氯仿-甲醇梯度洗脱, 收集产物得到 Fragments.1-Fragments.10 共 10 个组分; 显示抑菌活性的 Fr.6 组分经硅胶柱层析[洗脱剂氯仿:甲醇=10:1 (V/V)]得到 3 组洗脱液(Fr.6.1-Fr.6.3); 其中具有活性的洗脱液 Fr.6.2 经硅胶柱层析[洗脱剂氯仿:甲醇=8:1 (V/V)], 再经过凝胶柱层析[洗脱剂氯仿:甲醇=1:1 (V/V)]洗脱, 得到化合物 1。对化合物 1 进行活性测试, 结果表明该化合物具有较强的抑 MRSA 效果(图 2), 对 MRSA 的抑菌圈直径达到 22.10 mm。

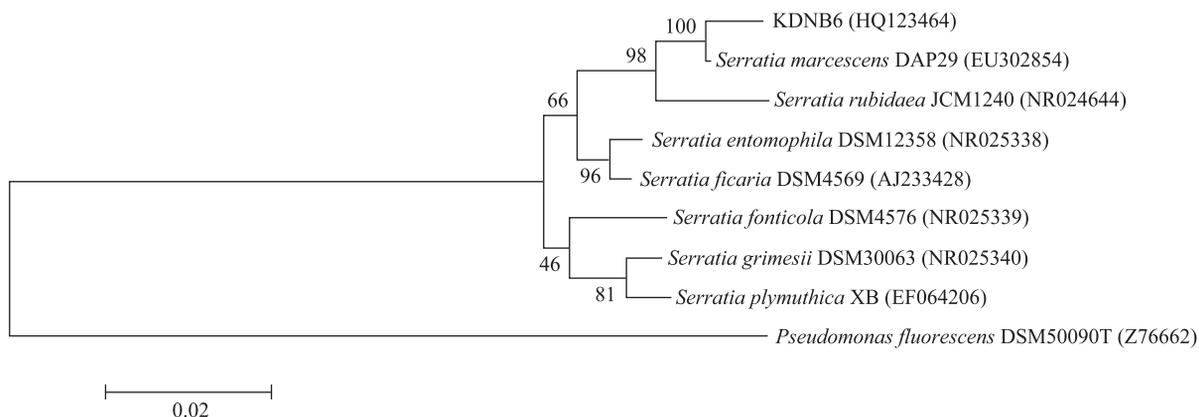


图 1 利用 16S rDNA 序列构建的 KDNB6 系统发育进化树状图

Fig. 1 Phylogenetic dendrogram based on 16S rDNA sequences of endophytic bacteria KDNB6

注: 图中分支上数字表示树形可信度, 括号内为 GenBank 登录号, 黑体为试验菌株。

Note: The figures on the branches indicate the reliabilities. GenBank accession numbers are in the parenthesis. The boldfaces are tested strains. The scale bar represents 0.02 substitutions per nucleotide position.

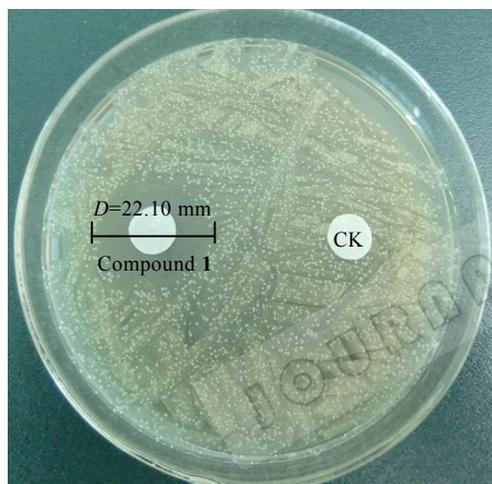


图 2 化合物 1 对 MRSA 的抑制效果

Fig. 2 Inhibitory effect of compound 1 against MRSA

注: CK: 阴性对照。

Note: CK: Negative control.

2.2.2 活性物质的薄层层析结果: 得到的化合物 1 为白色结晶, 在展开剂氯仿: 甲醇=6:1 中 R_f 值为 0.69, I 在薄层色谱成像系统中紫外光 254 nm 下观察为浅黄色斑点, 如图 3 所示。

3 讨论

S. marcescens 属于肠杆菌科中的一种杆状的革兰氏阴性细菌, 是医院中常见的感染性细菌, 最先由意大利的 Bizio 从腐败食物中发现^[19]。其发酵产

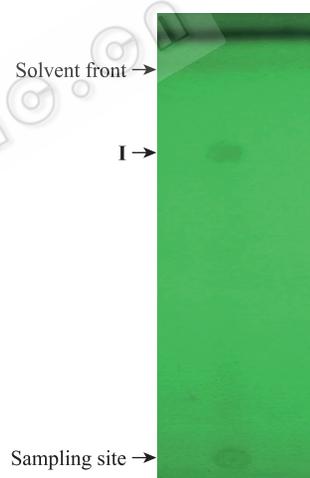


图 3 活性物质薄层层析结果

Fig. 3 TLC analysis of bioactive compound

物主要为灵菌红素^[20]、几丁质酶^[21]和 2,3-丁二醇^[22]等。其中灵菌红素是一种天然红色素, 因含有甲氧基吡咯的骨架结构而具有多种生物活性, 如抗细菌、抗真菌、抗疟疾、抗肿瘤和提高免疫力等生理活性。本文从 *S. marcescens* KDNB6 中分离获得一种抗 MRSA 的活性化合物, 该化合物是否为灵菌红素还有待通过实验证实。

MRSA 为医院内感染的重要病原菌, 目前用于抗 MRSA 的抗生素主要有头孢菌素类、甘氨四环素类、碳青霉烯类、糖肽类、脂肽类、十七糖酐、肽

聚糖合成的抑制剂等,这些抗生素主要阻碍细菌细胞壁的形成。刘佳等^[23]筛选到一株具有抗 MRSA 活性的枯草芽孢杆菌,该菌产生的胞外抑菌物质对 MRSA 有较好的抑制效果。Shin Dong-Yun 等^[24]从黑榆树 *Ulmus davidiana* var. *japonica* 中提取到一种抗 MRSA 的醌类化合物(Sesquiterpenoid quinone),其抗 MRSA 的效果与万古霉素(Vancomycin)相当。从 *S. marcescens* 的代谢产物中分离获得具有抗 MRSA 活性的物质尚未见文献报道。

参 考 文 献

- [1] 陈飞雪. 植物内生菌生物活性物质研究进展[J]. 生物学教学, 2010, 35(1): 4-6.
- [2] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Pacific yew*[J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216.
- [3] 何红, 蔡学清, 关雄, 等. 内生菌 BS-2 菌株的抗菌蛋白及其防病作用[J]. 植物病理报, 2003, 33(4): 373-378.
- [4] 秦学功, 元英进. 苦豆子生物碱的研究与苦豆子综合利用[J]. 中国野生植物资源, 2000, 19(4): 30-32.
- [5] 龚明福, 林世利, 贺江舟, 等. 苦豆子内生细菌的分离及拮抗菌的筛选[J]. 塔里木大学学报, 2006, 18(4): 68-69, 80.
- [6] 龚明福, 韦革宏, 刘江华, 等. 新疆苦豆子根瘤菌的数值分类研究[J]. 生物多样性, 2005, 13(1): 75-80.
- [7] 龚明福, 马玉红, 李超, 等. 苦豆子根瘤内生细菌分离及表型多样性分析[J]. 西北植物学报, 2009, 29(2): 408-411.
- [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] Linares J. The VISA/GISA problem: therapeutic implications[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2001, 7(4): 8-15.
- [10] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 李季伦, 译. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 729.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 358-364.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [13] Kieser T, Mervyn JB, Mark JB, et al. Practical Streptomyces Genetics[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [14] Devereux R, Hines ME, Stahl DA. Scything: characterization of natural communities of sulfate-reducing bacteria by 16S rRNA sequence comparisons[J]. Microbial Ecology, 1996, 32(3): 283-292.
- [15] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406-425.
- [16] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 204-208.
- [17] 林亲雄, 奚涛, 刘纯慧, 等. 海洋放线菌 M326 活性代谢产物的初步研究[J]. 中国海洋药物, 2006, 25(1): 44-47.
- [18] Hunfeld KP, Weigand J, Wichelhaus TA, et al. *In vitro* activity of mezlocillin, meropenem, aztreonam, vancomycin, teicoplanin, ribostamycin and fusidic acid against *Borrelia burgdorferi*[J]. Antimicrobial Agents, 2001, 17(3): 203-208.
- [19] 杨玉英, 曹涤非, 王璐璐, 等. 饮用纯净水中粘质沙雷氏菌的分离及其生物学特性研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2006, 18(5): 45-47.
- [20] Melvin MS, Tomlinson JT, Saluta GR, et al. Double-strand DNA cleavage by copper-prodigiosin[J]. J Am Chem Soc, 2000, 122(26): 6333-6334.
- [21] Hoster F, Schmitz JE, Daniel R. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 66(4): 434-442.
- [22] 杨云龙, 张燎原, 孙建安, 等. 粘质沙雷氏菌利用蔗糖和柠檬酸铵生产 2,3-丁二醇的研究[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(9): 41-44.
- [23] 刘佳, 谢秀丽, 牛天贵. 一株抑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.
- [24] Shin DY, Kim HS, Min KH, et al. Isolation of a potent anti-MRSA sesquiterpenoid quinone from *Ulmus davidiana* var. *japonica*[J]. Chem Pharm Bull, 2000, 48(11): 1805-1806.