抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株的筛选与鉴定

江娟，邹远军，张云玲，刘红，胡少南，郑一敏
（重庆理工大学药学与生物工程学院，四川重庆 400054）

摘要：通过对246株芽孢杆菌进行筛选，以期获得对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）具抑制作用的菌株，抑菌结果表明，对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌有抑制作用的菌株有5株，其中菌株1012-4的抑菌活性最强；为确定菌株种属，对优选菌株进行形态特征观察、生理生化特征鉴定以及API50 CHB鉴定，初步确定1012-4为枯草芽孢杆菌；为进一步确证菌株类型，实验采用了16S rDNA基因测序，序列结果表明，菌株1012-4为芽孢杆菌属枯草芽孢杆菌种；经反复确证，确定菌株1012-4为优势菌株，抗菌活性显著，为新型抗MRSA药物的研发提供了菌株来源。

关键词：耐甲氧西林金黄色葡萄球菌；芽孢杆菌；筛选；鉴定

文章篇号：1673-9078(2013)4-788-791

Screening and Identification of Strains with Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Activity

JIANG Juan, ZHOU Yuan-jun, ZHANG Yun-ling, LIU Hong, HU Shao-nan, ZHENG Yi-min
(College of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China)

Abstract: In this research, strains with antibacterial activity on *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*.246 tested strains was screened and identified, Antibacterial test results showed that five strains had antibacterial activity, among which strain 1012-4 showed the strongest activity. Morphological, physiological and biochemical characterization, as well as API50 CHB method, were adopted to determine the type of strain 1012-4. Preliminary results suggested that the stain 1012-4 was of *Bacillus subtilis* species. Through 16S rDNA gene sequence alignment, the strain 1012-4 was further identified as the genus *Bacillus* and *Bacillus subtilis* species. Verification test confirmed that, the strong antibacterial activity of strain 1012-4. This research provided new strain source for the research and development of new anti-MRSA drugs.

Key words: methicillin-resistant Staphylococcus aureus; bacillus; screening; identification

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*，MRSA）是引起医院感染的多重耐药菌[1]，几乎对所有β-内酰胺类抗菌药物耐药，甚至累及到红霉素、环丙沙星和庆大霉素。因为其具有毒性强、耐药广泛、疗效差、易于传播等特点[2]，MRSA感染与乙型肝炎、获得性免疫缺陷综合症被公认为世界三大最难解决的感染性疾病[3]。

傅若秋等人[4]采用96孔板培养法和涂片法测定发现仙鹤草醇提物，半枝莲水提物对MRSA有显著的杀菌作用。董燕等人[5]发现黄岑、夏枯草、连翘、黄连这四种清热类中药的水提液对MRSA有着较好的抗菌作用。虽在天然植物中能筛选出有效拮抗MRSA的物质，然而关于其成药性的研究尚且不够，临床应用得更少，还需进一步深入的研究。目前临床上仅有少数几种抗生素用于MRSA引起的感染，但疗效不甚确切，如何有效地治疗MRSA感染已成为各国研究的热点。万古霉素、去甲基万古霉素、达托霉素、利奈唑胺是临床上常用于治疗MRSA感染的药物。万古霉素、去甲基万古霉素治疗效果好，抗菌谱广，然而对肾，耳有一定的毒性，且已经出现VISA这一耐万古霉素的菌株；达托霉素很难引起和其他抗生素发生交叉耐药的问题，在杀灭细菌的同时并使细菌溶解，因而炎症反应相对较轻，但是据有关文献报导不良反应较多，常见的有胃肠道反应、注射部位反应、发热、头痛、皮疹等，临床试验中亦发现少数患者血液检验提示有肌肉损伤情况；利奈唑胺与其它抗菌药无交叉耐药现象，但作为一类新药，耐药机制尚不明确[6]。因此，寻求更加安全，有效，稳定，可控的治疗MRSA感染药物已是当务之急。

本研究采用5株不同的MRSA为指示菌，从重庆理工大学天然药物实验室保存的菌株中筛选抗MRSA菌株，以期获得优势菌株，并为新型抗MRSA药物的研

收稿日期：2012-11-26

基金项目：科技部重大新药创制专项（2010ZX09401-306-2-23）；重庆市科委项目（2009GJF10023）

通讯作者：郑一敏（1963-），男，教授，主要从事天然药物研究与开发

发提供菌株来源。

1 材料与方法

1.1 菌株

指示菌。5株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA-30、MRSA-31、MRSA-32、MRSA-34、MRSA-36）由重庆第三军医大学附属医院临床基地赠送。

供试菌株。246株芽孢杆菌为重庆理工大学天然药物实验室保存，主要分离来自发酵食品。

1.2 培养基

MRSA液体培养基为肉汤培养基，即牛肉膏3 g，蛋白胨10 g，氯化钠5 g，超纯水1000 mL，pH=7.0~7.2。芽孢杆菌液体培养基为GYM，即葡萄糖10 g，酵母膏5 g，硫酸镁0.5 g，氯化钠0.8 g，超纯水1000 mL。固体培养基为LB培养基：酵母膏5 g，蛋白胨10 g，氯化钠10 g，琼脂粉15~17 g，超纯水1000 mL，pH=7.0~7.2。

1.3 指示菌液和芽孢杆菌发酵液的制备

指示菌液的制备：分别从斜面上挑取一环菌种MRSA-30、MRSA-31、MRSA-32、MRSA-34、MRSA-36接入10 mL肉汤培养基中，于37 ℃，140 r/min摇床发酵培养24 h，调整菌液浓度为10^8 CFU/mL，于4 ℃冰箱保存备用。

芽孢杆菌发酵液的制备：将4 ℃冰箱保存备用的芽孢菌株，接种于LB斜面上，于37 ℃隔水式恒温培养箱中培养24 h，然后接种于LB液体培养基中，再于37 ℃隔水式恒温培养箱中培养24 h得发酵液。发酵液经8000 r/min离心10 min，弃去菌体，收集上清液。再经0.22 μm滤膜过滤除菌，即可得到测抗菌活性用发酵液，于4 ℃冰箱保存备用。

1.4 抗MRSA芽孢杆菌的筛选

初筛采用点种法：于LB平板表面涂布一层已培养好的指示菌液，待其晾干后，从保藏待筛的菌种斜面上用接种环挑取一环，点种穿刺于已涂布指示菌的平板上，于37 ℃隔水式恒温培养箱中培养24 h，依据有无抑菌圈来记录实验结果。

复筛采用琼脂扩散法。用直径为1.2 cm、厚1.0 cm的海绵圈代替打孔，将海绵圈浸入芽孢杆菌发酵液中，吸取发酵液至饱和后用镊子轻轻夹起此海绵圈，分别放置于添加MRSA的指示菌平板表面上。此平板放置于37 ℃恒温培养箱培养24 h后，通过观察抑菌圈直径大小来确定抗菌活性的强弱。每组数据重复3次。同时使用甲氧西林、苯唑青霉素作为阴性对照，使用万古霉素作为阳性对照。药敏实验方法按照NCCLS规定的标准进行[7]。

1.5 芽孢杆菌菌种鉴定

依照《伯杰氏细菌鉴定手册》（第八版）[8]和《常见细菌系统鉴定手册》[9]对相关生理生化反应指标进行测定，API50 CHB试验严格依据产品的说明书对1012-4菌株进行试验，测定结果送交梅里埃公司进行数据分析，16S rDNA序列测定由Takara公司完成。

2 结果与讨论

2.1 抗MRSA初筛结果

从246株芽孢杆菌中筛选出抗MRSA的芽孢杆菌5株，分别为1012-4、1012-67、1012-82、1012-149、1012-218。

2.2 抗MRSA复筛结果

表1 抗MRSA芽孢杆菌复筛结果

Table 1 The re-screening result of *Bacillus* with anti-MRSA activity

菌株药物	抑菌圈直径/mm				
	MRSA-30	MRSA-31	MRSA-32	MRSA-34	MRSA-36
1012-4	36.22	36.12	36.25	36.3	36.15
1012-67	32.1	27.89	30.16	30.25	28.22
1012-82	34.01	33.22	31.98	32.56	30.65
1012-149	29.32	28.98	30.85	30.24	29.53
1012-218	30.12	31.56	28.65	29.52	27.56
甲氧西林	0	0	0	0	0
苯唑青霉素	0	0	0	0	0
万古霉素	36.21	36.23	36.15	36.24	36.2

抑菌圈直径测量结果见表1。从表中可以看出，甲氧西林、苯唑青霉素对5株MRSA无抑制作用，万古霉素对其有较强的抑制作用。菌株1012-4抑菌效果显著好于其它4株，所以选择1012-4为后续研究的供试菌株，菌株1012-4发酵液与万古霉素、甲氧西林的抑菌效果见图1。



图1 琼脂扩散法检测菌株1012-4发酵液抑菌情况

Fig.1 The inhibition of strain 1012-4 in Agar diffusion method

2.3 菌株1012-4的形态特征

杆状，无荚膜，侧生鞭毛，能运动，革兰氏阳性细菌，内生孢子0.8×1.5~1.8 μm，位于菌体中央或稍偏，芽孢形成后菌体不膨大。单菌落为圆形或不规则

形，表面色暗，变厚，不透明，粘稠，起皱，培养时间超过 24 h 之后菌落颜色会变成奶油色或者褐色，表面干燥（图 2）。

2.4 菌株 1012-4 的生理生化特征

参照《伯杰氏细菌鉴定手册》（第八版）和《常见细菌系统鉴定手册》中有关芽孢杆菌的描述，初步确定菌株 10212-4 为枯草芽孢杆菌，主要生理生化指标见表 2。

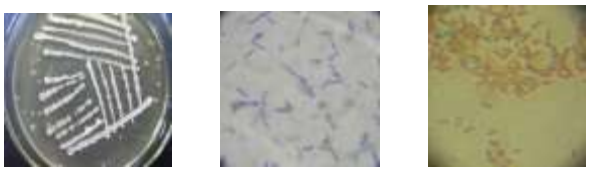


图 2 菌株 1012-4 主要形态特征

Fig.2 The major morphologica characteristics of strain 1012-4

表 2 菌株 1012-4 主要生理生化特征

Table 2 The major characteristics of strain 1012-4

特征	结果	特征	结果	特征	结果
严格好氧	-	D-木糖产酸	+	马尿酸盐水解	+
兼性厌氧或微好氧	+	D-甘露醇产酸	+	需要尿素盐	-
严格厌氧	-	葡萄糖产气	-	形成：吲哚	-
硝酸盐还原	+	明胶水解	+	pH=6.8 营养肉汤生长	+
接触酶	+	淀粉水解	+	pH=5.7 营养肉汤生长	+
0.001%溶菌酶生长	+	利用柠檬酸盐	+	7% NaCl 生长	+
芽孢圆形	-	酪氨酸水解	-	生长温度：3 ℃	-
V-P 测定	+	苯丙氨酸脱氢酶	-	30 ℃	+
L-阿拉伯糖产酸	+	卵黄卵磷脂酶	-	55 ℃	-

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性。

2.5 API50 CHB 结果

API 50 CHB 培养基是用来研究芽孢杆菌的 49 种糖。API 50 CHB 试验条的发酵作用的一种快速简便的培养基，用被测的微生物在培养基中制成菌悬液，接种试验条的每一个管。培养期间，糖发酵产酸，致使 pH 下降，以指示剂的颜色变化予以表示。结果组成该菌株的生化图谱，并用它来鉴定或分型，测定结果见表 3。

2.6 16S rDNA 测序结果

16S rDNA 序列是细菌分类的重要指标，通过测定菌株 16S rDNA 序列，并于 Genbank 数据中检索，发现其与枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）的相似度为 99%。因此鉴定 1012-4 菌株为枯草芽孢杆菌。该菌株基因序列如下：

gtcaccttcg gcggctggct cctaaaaggt tacctcaccg acttcgggtg ttacaaactc tcgtggtgtg acgggcggtg tgtacaaggc ccgggaacgt attcaccgcg gcatgctgat ccgcgattac tagcgattcc agcttcacgc agtcgagttg cagactgcga tccgaactga gaacagattt gtgggattgg cttaacctcg cggtttcgct gccctttgtt ctgcccattg tagcacgtgt gtagcccagg tcataagggg catgatgatt tgacgtcatc cccaccttcc tccggtttgt caccggcagt caccttagag tgcccaactg aatgctggca actaagatca agggttgcgc tcgttgcggg actwaaccca aacattctcc acgacacgag ctgacgacaa ccatgcacca cctgtcactc tgccccccgaa gagggacgtc ctatctctag gattgtcaga ggatgtcaag acctggtaag gttcttcgcg ttgcttcgaa ttaaaccaca tgctccaccg cttgtgcggg ccccccgtcaa ttcctttgag tttcagtctt gcgaccgtac tccccaggcg gagtgcttaa tgcgttagct gcagcactaa ggggcggaaa ccccctaaca cttagcactc atcgtttacg gcgtggacta ccagggtatc taatcctgtt cgctccccac gctttcgctc ctcagcgtca gttacagacc agagagtcgc cttcgccact ggtgttcctc cacatctcta cgcatttcac cgctacacgt ggaattccac tctcctcttc tgcactcaag ttccccagtt tccaatgacc ctccccggtt gagccggggg ctttcacatc agacttaaga aaccgcctgc gagcccttta cgcccaataa ttcccggaca acgcttgcca cctacgtatt accgcggctg ctggcacgta gttagccgtg gctttctggt ttaggtaccg tcaaggtgcc gccctatttg aacggcactt gttcttccct aacaacagag ctttacgatc cgaaaacctt tcatcactca cgcggcgttg ctccgtcaga ctttcgtcca ttgcggaaga ttccctactg ctgcctcccg taggagtctg ggccgtgtct cagtcccagt gtggccgatc accctctcag gtcggctacg catcgtngcc ttggtgagcc gttacctcac caactagcta atgcgccgcg ggtccatctg taagtggtag ccgaagccac cttttatgtc tgaaccatgc ggttcaaaca ancatccggt attagccccg gtttcccgga gttatcccag tcttacaggc aggttaccca cgtgttactc acccgtccgc cgctaacatc agggagcaag ctcccatctg tccgctcgac tgcatgtata gcagcga

3 结论

3.1 本研究从246 株菌株中筛选出 5 株菌株对 MRSA 具有较强的抑制作用，其中芽孢杆菌 10212-4 能够显著拮抗 MRSA 生长。通过对菌株 1012-4 进行形态特征观察和生理生化测定，并参照《伯杰氏细菌鉴定手册》（第八版）和《常见细菌系统鉴定手册》中有关

芽孢杆菌的描述，进行菌种鉴定，初步确定 1012-4 为枯草芽孢杆菌，随即进行的 API50 CHB 鉴定结果也证实上述结果。为进一步确证菌株 1012-4 的种属类别，本文进行了 16S rDNA 基因测序，16S rDNA 序列是细菌分类的重要指标，一般认为所鉴定菌株与标准菌株的序列同源性大于 95%，即可认为是同属菌株。实验结果表明，菌株 1012-4 与枯草芽孢杆菌的序列相似度达到 99%，因此最终确定 1012-4 为枯草芽孢杆菌。

表 3 API 50 CHB 测定结果

Table 3 The result of API 50 CHB test

管号	项目	结果	管号	项目	结果
0	0 对照		25	七叶灵	+
1	甘油	+	26	柳醇	+
2	赤癣醇	-	27	纤维二糖	+
3	D-阿拉伯糖	-	28	麦芽糖	+
4	L-阿拉伯糖	+	29	乳糖	+
5	核糖	+	30	蜜二糖	+
6	D-木糖	+	31	蔗糖	+
7	L-木醇	-	32	海藻糖	+
8	阿东醇	-	33	菊糖	-
9	β-甲基-D-木糖甙	-	34	松叁糖	-
10	半乳糖	+	35	棉子糖	+
11	葡萄糖	+	36	淀粉	-
12	果糖	+	37	糖原	+
13	甘露醇	+	38	木糖醇	-
14	山梨糖	-	39	龙牛儿糖	+
15	鼠李糖	-	40	D-松二糖	+
16	卫茅醇	-	41	D-来苏糖	-
17	肌醇	+	42	D-塔格糖	-
18	甘露醇	+	43	D-岩糖	-
19	山梨醇	+	44	L-岩糖	-
20	α-甲基-D-甘露糖甙	-	45	D-阿拉伯糖醇	-
21	α-甲基-D-葡萄糖甙	+	46	L-阿拉伯糖醇	-
22	N-乙酰-葡糖胺	+	47	葡萄糖酸盐	-
23	苦杏仁甙	+	48	2-酮基-葡萄糖酸盐	-
24	熊果甙	+	49	5-酮基-葡萄糖酸盐	+

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性。

3.2 随着抗生素的滥用，由 MRSA 引起的重症感染人群呈直线上升，现有药物已不能满足临床需要，从微生物来源筛选新的抗 MRSA 药物是当前研究的热点之一，本课题研究发现 1012-4 菌株发酵液抑菌活性与当前主流药物万古霉素相当，经多批次重复试验，发现具有良好的稳定性，该菌株的发现为新型抗 MRSA 药物的研发提供了菌株来源，为后续的发酵工艺及物质基础研究提供指导思路，具有广阔的市场开发前景。

参考文献

[1] 陈方圆,马笑雪,蔡景钰,等.多重耐药性金黄色葡萄球菌(MRSA)的临床药物治疗及耐药机制研究[J].微生物学杂志,2010,1(1):71-74

[2] 乔文涛,综述,王金良,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药特点和快速检测[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,2001,22(2):91-92

[3] 马翔宇,易龙,宋治远.医源性 MRSA 感染及其防治研究进展[J].临床医学,2003,23(5):53

[4] 傅若秋,余琼,孟德胜,等.21 种中草药提取物对 MRSA 的抗菌作用研究[J].中国药房,2011,43:4056-4058

[5] 董燕,王仙园,周红,等.中草药对 MRSA 临床株的抑菌作用研究[J].护理研究,2008,4(22):36-38

[6] 赵博,陈取,杜志成,等.万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺、达托霉素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌抗菌活性及药物优弊的研究[J].中国实用医药,2011,6(18):242-243

[7] Wayne. National committee for clinical laboratory standardsperformances standards for antimicrobial susceptibility testing [P]. Ninth. Informational supplement. NCCLS documents M100-S9. Pennsylrania: NCCLS, 1999, 17-99

[8] Nakayma S, Takahashi M, HimiM, et al. Isolation of new variants of surfactin by a recombinant Bacillus subtilis [J]. Applied Microbial Biotechnology, 1997, 48：80-82

[9] 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