

# 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

刘佳<sup>1</sup> 谢秀丽<sup>2</sup> 牛天贵<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

2. 北京协和医院 检验科, 北京 100032)

**摘要** 为寻找一种对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)具有抑制作用的抗生素替代物,从568株芽孢杆菌中筛选出抑MRSA的芽孢杆菌5株,其中芽孢杆菌64-3的抑菌活性最强。生理生化特性鉴定和16s rDNA基因序列比对分析结果表明,菌株64-3为芽孢杆菌属枯草芽孢杆菌种(*Bacillus subtilis*)。该菌株菌体破碎物、菌悬液、发酵上清液和活菌对MRSA的抑菌效果表明,*B. subtilis* 64-3的发酵上清液对MRSA的抑制效果最好。*B. subtilis* 64-3产生的胞外抑菌物质对MRSA具有良好的抑制效果。

**关键词** 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;芽孢杆菌;抑菌;筛选;鉴定

中图分类号 Q93

文章编号 1007-4333(2007)06-0020-04

文献标识码 A

## Screening and identification for *Bacillus* of having inhibitory effect against MRSA

Liu Jia<sup>1</sup>, Xie Xiuli<sup>2</sup>, Niu Tianguai<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Beijing Concord Hospital, Beijing 100032, China)

**Abstract** Five strains out of 568 *Bacillus* isolates proved to have an antagonistic action toward methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Among the 5 strains, *Bacillus* strain 64-3 showed the best inhibitory effect against MRSA. Strain 64-3 was identified as *Bacillus subtilis* based on its morphological and physiological-biochemical properties in combination with 16s rDNA sequence analysis. Moreover, the cell-free extract, bacterial suspension and supernatant from strain 64-3 were used individually to examine their activity against MRSA. It was seen that the culture supernatant had the strongest action against MRSA compared with the other treatments. This implied that the metabolites produced by *B. subtilis* 64-3 had notable inhibition effect toward MRSA.

**Key words** MRSA; *Bacillus*; bacterial inhibition; Screen; identification

自甲氧西林被应用于治疗产β-内酰胺酶的金黄色葡萄球菌引起的感染不到2年的时间里,就发现了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)<sup>[1]</sup>。至今,其感染几乎遍及全世界,已成为医院院内感染的重要病原菌之一。MRSA表现为多重耐药性,对氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类、利福平均产生不同程度的耐药,唯对万古霉素敏感<sup>[2]</sup>;但自1996年日本报道了第1例对万古霉素敏感性降低的金黄

色葡萄球菌后,美国、法国、我国香港、韩国等国家和地区也相继有相关文献报道<sup>[3-4]</sup>。因此,寻找出一种能够抑制MRSA的抗生素替代物成为亟待解决的问题。目前我国多采用体外抑菌方法从中草药及其提取物中筛选抗MRSA的物质,其中黄芩、黄连等表现出较好的抑菌效果<sup>[5-6]</sup>;但中草药成分复杂,其抑菌机制分析较困难。已报道筛选出一株海洋放线菌,对MRSA有较好的抑制效果<sup>[7]</sup>。芽孢杆菌代谢可产生多种抑菌物质,已明确成分和结构的抑菌物质已

收稿日期:2007-04-06

作者简介:刘佳,硕士研究生;牛天贵,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事芽孢杆菌菌种资源研究,E-mail:niutianguai@163.com

被应用到临床医学、植物生防、畜牧业、食品保鲜等各领域,但关于抑 MRSA 的芽孢杆菌的筛选目前国内尚未见报道。

本研究以 5 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌为指示菌,从本实验室保存的芽孢杆菌中筛选抑耐甲氧西林葡萄球菌的芽孢杆菌,并进行相关抑菌试验。

## 1 材料

### 1.1 菌种

1) 指示菌。5 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA1、MRSA2、MRSA3、MRSA4、MRSA5)由北京协和医院临床分离。

2) 芽孢杆菌。568 株芽孢杆菌为本实验室保存,其中 343 株分离自头发,225 株分离自发酵食品。

### 1.2 培养基

MRSA 和芽孢杆菌液体培养基为肉汤培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,蒸馏水 1 000 mL,pH7.0~7.2。固体培养基在液体培养基基础上加入 1.5%~2.0%的琼脂。

## 2 方法

### 2.1 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 MRSA1、MRSA2、MRSA3、MRSA4、MRSA5 的菌种斜面上挑取一环接入 10 mL 肉汤培养基,放入 37℃ 摇床培养,转速 140 r/min,发酵 14 h,再用无菌水将菌液调整至  $10^9$  cfu/mL,放入 4℃ 冰箱备用。

芽孢杆菌发酵液的制备:从芽孢杆菌斜面挑取一环接入肉汤培养基,其他步骤同上。

### 2.2 抑 MRSA 芽孢杆菌的筛选

初筛采用点种法:在平板表面涂布刚培养好的指示菌液并晾干,从保藏芽孢杆菌的菌种斜面上挑取一环,点在已涂布指示菌的平板上,将平板置于 37℃ 培养箱培养 24 h,观察有无抑菌圈并记录结果。

复筛使用牛津杯法:在平板表面涂布刚培养好的指示菌液并晾干。在涂布好菌悬液的平板上放入牛津杯,吸取 100  $\mu$ L 的芽孢杆菌发酵液加入牛津杯,在超净工作台上吹干。将平板置于 37℃ 培养箱培养 24 h,使用卡尺测量抑菌圈直径。同时使用甲氧西林、苯唑青霉素药敏纸片法作为阴性对照,使用万古霉素作为阳性对照。药敏试验方法按照 NCCLS 规定的标准药敏方法进行<sup>[8]</sup>。

### 2.3 芽孢杆菌菌种的鉴定

生理生化鉴定按照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[9]</sup>进行。16s rRNA 序列测定由北京华大公司完成。

### 2.4 生长曲线的测定

种子液的制备同芽孢杆菌发酵液。发酵 12 h 后,分别取 200  $\mu$ L 种子液注入 10 mL 肉汤培养基。0~24 h,按 2 h 间隔采样测定,560 nm 下测定菌悬液的吸光度,取 3 次重复测定的平均值。

### 2.5 菌悬液、上清液、活菌及破碎物的制备<sup>[10-13]</sup>

菌悬液制备:从菌种保藏斜面挑取一环接入 50 mL 肉汤培养基,放入 37℃ 摇床培养,140 r/min,发酵 12 h,用无菌水将发酵液调至  $10^8$  cfu/mL,用于菌悬液抑菌效果测定。

上清液制备:将菌悬液于 4℃ 6 000 r/min 离心 10 min 后,上清液用于抑菌效果评价。

活菌和破碎物的制备:离心后的菌体用无菌水洗涤 2 次,将菌液调至  $10^8$  cfu/mL,分为 2 份,分别用于活菌抑菌效果测定和破碎物制备。破碎物的制备在冰浴条件下进行,细胞破碎仪功率 400 W,工作 5 s 休息 5 s,持续 1 h。制得的破碎物用于抑菌效果测定。

### 2.6 数据处理方法

使用 SAS Version8 软件对数据进行统计分析。

## 3 结果

### 3.1 抑 MRSA 芽孢杆菌初筛结果

从 568 株芽孢杆菌中筛选出抑 MRSA 的芽孢杆菌 5 株,编号为 67、68、97、64-3 和 64-7。其中菌株 67、68、97 分离自头发,菌株 64-3、64-7 分离自商品白菜辣腐乳。

### 3.2 抑 MRSA 芽孢杆菌复筛结果

抑菌圈直径测量结果见表 1。可以看出,甲氧西林和苯唑青霉素对 5 株 MRSA 均无抑制作用,万古霉素对其则均有抑制作用。对抑菌结果进行方差分析,结果表明:在  $\alpha = 0.05$  水平上,菌株 64-3 对 MRSA1 和 MRSA4 的抑制效果显著好于其他菌株;菌株 64-7 对 MRSA2 的抑制效果显著好于菌株 64-3、67、68,这 3 株菌株间没有显著性差异;菌株 64-3、64-7、67 对 MRSA3 的抑制效果显著好于其他 2 菌株,且三者间没有显著性差异;菌株 64-3、64-7 对 MRSA5 的抑制效果显著好于其他菌株,且二者间没有显著性差异。含菌量为  $10^8$  cfu/L 的芽孢杆菌 64-3 发酵液的抑菌效果与含 30  $\mu$ g 万古霉素的药敏纸片抑菌效果相当。

表1 抑 MRSA 芽孢杆菌复筛结果

Table 1 Results of screen for *B. spp.* against MRSA

菌株和药物	抑菌圈直径/mm				
	MRSA1	MRSA2	MRSA3	MRSA4	MRSA5
64-3	16.56	14.30	14.22	17.03	19.48
64-7	15.86	16.54	13.47	14.39	18.41
67	13.89	14.35	13.66	14.94	14.99
68	13.63	14.73	11.18	14.80	16.89
97	13.04	12.78	11.48	12.50	14.99
甲氧西林	0	0	0	0	0
苯唑青霉素	0	0	0	0	0
万古霉素	17.81	17.07	16.94	17.75	17.27

注:数据为3个平行的平均值。

综合考虑抑菌效果,选择菌株 64-3 作为下一步研究的目标菌株。

### 3.3 菌株 64-3 的菌体特征

菌株 64-3 为菌体杆状、芽孢中生或近端生的  $G^+$  芽孢杆菌。

### 3.4 菌株 64-3 的生理生化性质鉴定

根据生理生化鉴定结果可以初步鉴定芽孢杆菌 64-3 为枯草芽孢杆菌(表 2)。

表2 菌株 64-3 生理生化鉴定结果

Table 2 Physiological and chemical identification results of *B. spp.* 64-3

试验名称	结果	试验名称	结果
棉子糖发酵	+	明胶液化	+
葡萄糖发酵	+	淀粉水解	+
麦芽糖发酵	+	V-P 测定	+
甘露醇发酵	+	过氧化氢酶	+
乳糖发酵	+	葡萄糖产气	-
2%NaCl <sup>*</sup>	+	柠檬酸盐	+
5%NaCl <sup>*</sup>	+	石蕊牛奶还原	+
7%NaCl <sup>*</sup>	+	运动性	+
10%NaCl <sup>*</sup>	+	厌氧生长	-

注: \* 为体积分数; “+” 为阳性反应; “-” 为阴性反应。

### 3.5 16s rRNA 测序结果

将 *Bacillus spp.* 64-3 的 16s rRNA 序列送 GenBank 做 Blast 比较 (GenBank accession number 为 Accession EF472462), 与菌株 *B. subtilis* (Accession DQ401073) 同源性最高, 为 99.67%, 因此该菌株鉴定为枯草芽孢杆菌。该菌株基因序列如下。

```
GGGAATGGCGGCGTGTCTATAATGCAGTTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTT
AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTNGGATAACTCCGGGAAACC
GGGGTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCA
CTTACAGATGGACCCGCGGCCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGC
GTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGATGAA
GGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCT
TGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGAATTATTTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTTGAAAAGTGGGGAAGTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG
AATTCACGCTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC
TGGTCTGTAACGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGC
ATTAAGCACTCCGCCGTTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTaaATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGTCTTGACATC
CTCTGACAAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCAGAGTACAGGTTGGTGCATGGTTGTC
GTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGC
CAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGC
GAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
CTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
TTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAAGTCCGGTGAGGTAACCTTTTA
GGAGCCAGCCGCCAAGGTGGGACAGATGATGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGA
AGGTGCGGCTG
```

### 3.6 芽孢杆菌 64-3 菌悬液、上清液、活菌及破碎物的抑菌性能

从图1可以看出,芽孢杆菌 64-3 菌体破碎物对5株耐药金黄色葡萄球菌均无抑制效果,而芽孢杆菌 64-3 上清液、菌悬液和活菌对这5株菌均有抑制效果,但抑菌作用大小不同。方差分析结果表明:在  $\alpha=0.05$  的水平上,上清液、菌悬液和活菌对 MRSA1、MRSA2、MRSA3、MRSA4、MRSA5 的抑制效果有显著性差异,上清液对其抑菌效果显著好于菌悬液和活菌。因此可以推断,*B. subtilis* 64-3 的抑菌作用是由菌体生长分泌的胞外物质造成的,与胞内物质无关。

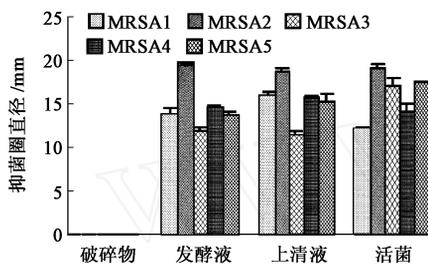


图1 芽孢杆菌 64-3 不同处理的抑菌活性

Fig. 1 Comparison of inhibitory effects of four different treatments

## 4 结论

本研究从 568 株芽孢杆菌中筛选出对 5 株 MRSA 均有抑制作用的菌株 5 株,其中菌株 64-3 对 MRSA 的抑制效果最好。经菌种鉴定确定,芽孢杆菌 64-3 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。抑菌试验结果表明,*B. subtilis* 64-3 的抑菌作用主要由胞外抑菌物质所致,与胞内物质无关。

枯草芽孢杆菌可以产生多种抑细菌或抑真菌类物质,一般认为枯草芽孢杆菌产生抗菌物质的途径分为核糖体途径和非核糖体途径合成 2 种。核糖体途径合成的抑菌物质包括枯草菌素 (subtilin)、Subtilosin 和酶类等物质;非核糖体途径合成的抑菌物质包括脂肽类、多肽类和其他多烯类等化合物<sup>[14]</sup>。*B. subtilis* 64-3 发酵后产生的抑菌物质属于何种类型,尚有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Barber M. Methicillin resistant *Staphylococci* [J]. J Clin Pathol, 1961, 14(4): 385-393
- [2] 赵旺胜. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的研究进展[J]. 临床检验杂志, 1999, 17(04): 249-251
- [3] Linares J. The VISA/GISA problem: therapeutic implications. Clin Microbiol Infect [J], 2001, 7(Suppl4): 8-15
- [4] Lecaillon E, Guedet P, Wooton M, et al. Endemic heteroresistant glycopeptide intermediate *Staphylococcus aureus* (HGISA) comprising unrelated clonal types and not associated with vancomycin therapy [J]. Pathol Biol (Paris), 2002, 50(9): 525-529
- [5] 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
- [6] 杨明炜, 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
- [7] 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
- [8] Wayne. National committee for clinical laboratory standards performances standards for antimicrobial susceptibility testing [P]. Ninth. Informational supplement. NCCLS documents M100-S9. Pennsylvania: NCCLS, 1999. 17-99
- [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
- [10] 李平兰, 马长伟, 江志杰, 等. 长双歧杆菌 T1F 菌株增强机体免疫活性研究 [J]. 微生物学通报, 2006, 33(02): 1-5
- [11] 程小冬, 李梅香, 杜璋璋. 超声波作用时间对地衣芽孢杆菌存活率的影响 [J]. 济宁医学院学报, 2003, 26(01): 40-41
- [12] 魏万勇, 苏智先. 应用超声波破碎苏云金芽孢杆菌试验 [J]. 四川蚕业, 2006, 34(02): 5-7
- [13] 祁伟, 吕星, 程玉谦, 等. 社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 [J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2007, 34(1): 55-58
- [14] 刘雪, 穆常青, 蒋细良, 等. 枯草芽孢杆菌代谢物质的研究进展及其在植病生防中的应用 [J]. 中国生物防治, 2006, (S1): 22-27