

抗多重耐药金黄色葡萄球菌土壤放线菌筛选

陈国华¹, 何晓雯², 邵伟¹, 乐超银¹

(1. 三峡大学化学与生命科学学院生物技术中心, 湖北宜昌 443002; 2. 湖北省宜昌市中心医院检验科, 湖北宜昌 443003)

摘要 [目的] 从土壤中发现拮抗多重耐药金黄色葡萄球菌的放线菌。[方法] 将土壤稀释后在高氏一号培养基上划线分离放线菌, 并测试抗菌活性。[结果] 获得放线菌一株 B0602 具有很强的抗菌活性。[结论] 放线菌 B0602 可能开发出高活性的抗生素制品。

关键词 土壤放线菌; 多重耐药金黄色葡萄球菌; 放线菌筛选

中图分类号 S154.38⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)35-15369-01

Screening of Actinomycetes from Soil to Inhibit the Growth of Multi-resistant *Staphylococcus aureus*

CHEN Guo-hua et al (Biotechnology Research Center, College of Chemistry and Life Sciences, Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002)

Abstract [Objective] The aim was to screen the actinomycetes to inhibit the MRSA (multi-resistant *Staphylococcus aureus*) growth from soil. [Method] Gauze's medium No. 1 was used to separate actinomycetes which inhibited the growth of MRSA. [Result] One strain of actinomycete was isolated from soil, and this strain expressed high antibacterial activity against MRSA. [Conclusion] This actinomycete might produce some antibacterial agents which could cure the diseases caused by MRSA.

Key words Soil actinomycete; Multi-resistant *Staphylococcus aureus*; Screening of actinomycete

1929年, 科学家 Fleming 发现第一种抗生素——青霉素。半个多世纪以来, 抗生素的发现与应用成功地预防和治疗了微生物引起的疾病感染^[1]。但是, 抗生素的长期和广泛使用, 细菌由于进化而出现了耐药性的菌株。Monaghan 和 Barrett^[2] 在 2006 年指出, 感染具有耐药性菌株 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的平均机会已经达到 10.2%, 并且菌株 *M. tuberculosis* 和 *Staphylococcus aureus* 作为常见的病原菌很容易发生进化而产生耐药性。耐药病菌种类的扩散和细菌耐药性的增强给临床抗感染治疗带来极大的挑战。耐药性病菌的产生限制了现有抗生素的有效抑菌(杀菌)效果, 严重威胁着人类或其他生物的健康, 人类总是试图从不同的生物体上寻找新的抗菌物质来抵抗现实生活中给人类生命和健康造成威胁的各种病菌^[3-5]。

耐药菌株的出现限制了现有抗生素的临床效果, 寻找新型抗生素势在必行。放线菌囊括了一半以上的抗生素来源, 尽管如此, 在过去 50 多年的时间里, 被筛选过的土壤放线菌只占到其总量的 10^{-18} 左右, 还有巨大的开发空间, 近来还再次成为发现新型抗生素的亮点。该研究旨在筛选抗生素产生防线菌, 为具有潜力的药用新型抗生素发现和深入研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌和培养基 多重耐药金黄色葡萄球菌由湖北省宜昌市中心医院检验科提供。高氏一号培养基用于放线菌的分离和筛选, TSA 培养基用于金黄色葡萄球菌培养, 均购于广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 土样来源 分别从湖北宜昌周边山地不同生境采集。

1.3 土壤中拮抗放线菌的分离 采用稀释平板法分离各土样中放线菌, 在培养基中加入 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 重铬酸钾, 以抑制霉菌和细菌生长, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d。根据平板上的菌落特征, 挑取

差异放线菌菌落, 划线接种到高氏一号空白平板上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d, 作抗性筛选。

1.4 拮抗放线菌的筛选 放线菌对多重耐药金黄色葡萄球菌的抗菌活性测定采用划线法。将金黄色葡萄球菌接种于 TSA 培养基上, 在该带菌培养基上划线接种放线菌, 从而观察拮抗效果。

1.5 拮抗放线菌的发酵液抗菌测试 选择“1.4”中抑菌圈较大且边缘清晰的放线菌, 经纯化后接种到高氏一号培养基里, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d, 离心, 用上清液湿润灭过菌的干燥滤纸片(直径 6 mm), 采用纸片扩散法进行抗菌测试, 观察抗菌效果。

2 结果与分析

从 10 份土样中分离了 255 株放线菌, 获得拮抗菌株 3 株, 其中 1 株放线菌对多重耐药金黄色葡萄球菌的抑菌圈较大、边缘清晰, 在纸片扩散法测试中, 抑菌直径达 10 mm, 暂时称为放线菌 B0602, 见图 1。

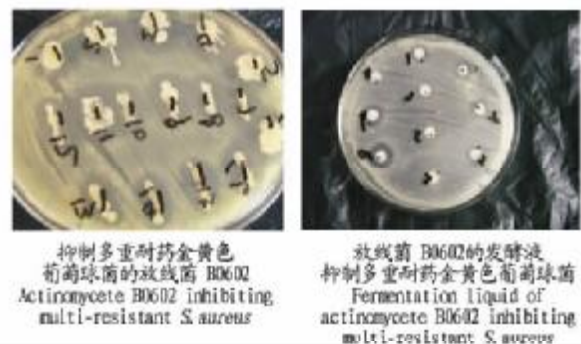


图 1 放线菌 B0602 抑制多重耐药金黄色葡萄球菌

Fig. 1 Inhibition of multi-resistant *S. aureus* by actinomycete B0602

放线菌是抗生素的主要来源, 2002 年, Castillo 等分离到一株链霉菌 *Streptomyces NRRL 30562*, 能产广谱抗生素 Munibicins A、B、C、D, 对人体多种病原菌均有良好的杀灭作用^[6]。刘灵芝等从土壤中筛选出一株能产生抗生素的放线

基金项目 三峡大学科研启动基金(0620060113); 湖北省教育厅科学研究计划(Q200713002)。

作者简介 陈国华(1970-), 男, 湖南永州人, 副教授, 从事病原微生物的防治研究。

收稿日期 2008-10-09

(下转第 15401 页)

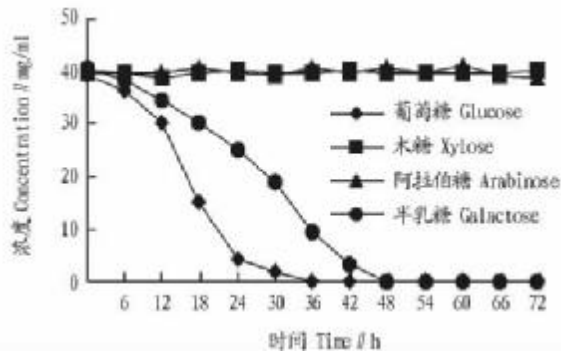
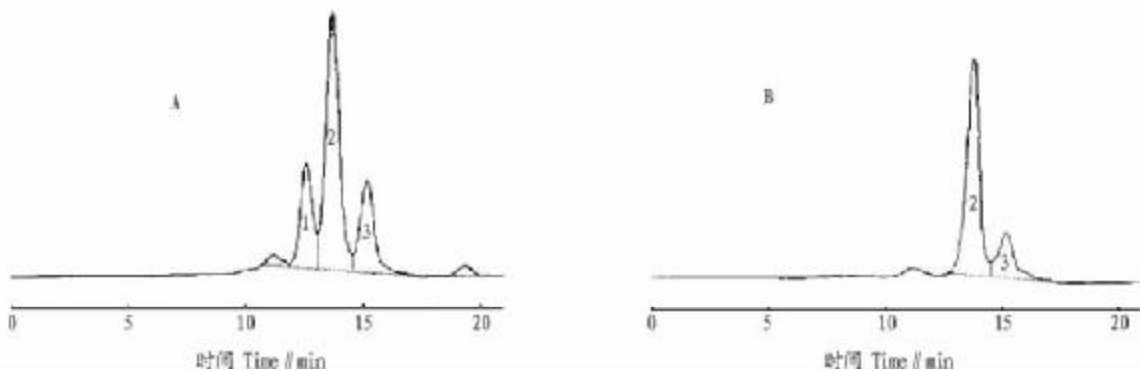


图1 发酵液中单糖变化

Fig.1 Variation curve of monosaccharides in fermentation solution



注:1 为葡萄糖,2 为木糖,3 为阿拉伯糖 + 半乳糖。

Note:1. Glucose;2. Xylose;3. Arabinose + galactose.

图2 木糖结晶母液(A)和木糖结晶发酵液(B)色谱

Fig.2 HPLC chromatogram of crystallization mother liquor of xylose (A) and its fermentation solution (B)

参考文献

- [1] 董丽辉,周晓云,张朝晖. 发酵玉米芯酶水解液生产木糖醇的研究[J]. 科技通报,2007,23(01):123-126.
- [2] WINKELHAUSEN E, PITTMAN P, KUZMANOVA S, et al. Xylitol formation by *Candida boidinii* in oxygen limited chemostat culture [J]. Biotechnology Letters, 1996, 18(7):753-758.
- [3] 江立强. 木糖醇在食品中应用现状及前景[J]. 江西食品工业, 2006(2):40-41.
- [4] 赵光辉,贺东海,王关斌. 分离木糖(醇)母液的研究[J]. 应用化工, 2005,34(3):194-195.
- [5] 刘法江,曲宗英. 利用木糖母液生产焦糖色素的工艺研究[J]. 中国调味品, 1998(4):54-58.
- [6] 李祥,杨军盛. 木糖母液的综合利用[J]. 中国食品添加剂, 2002(5):54-56.
- [7] 孙培冬,蔡宇杰,彭奇均. 模拟移动床分离木糖醇母液的条件优化[J]. 中国食品添加剂, 2003(6):73-75.
- [8] and the genomics future [J]. Biochemical Pharmacology, 2006, 7:901-909.
- [9] WALSH C, DUFFY G, O'MAHONY R, et al. Antimicrobial resistance in Irish isolates of verocytotoxinogenic *Escherichia coli* (E. coli)-VTEC [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 109:173-178.
- [10] THRELFALL E J, DAY M, DE PINNA E, et al. Drug-resistant enteric fever in the UK [J]. The Lancet, 2006, 367:1576.
- [11] 刘一江,黄乾明,杨洲平,等. 仙人掌抗菌肽的筛选、分离纯化及性质研究[J]. 四川农业大学学报, 2007, 25(3):271-276.
- [12] CASTILLO U F, STROBEL G A, FORD E J, et al. Mununabicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30 562, endophytic on *Kennedia nigricans* [J]. Microbiology, 2002, 148:2675-2685.
- [13] 刘灵芝,胡江春,陈锡时. 一株产抗生素链霉菌的研究初报[J]. 中国生态学报, 2007, 15(3):123-125.
- [14] WANG J, ZHU J H, HUANG Y L, et al. Screening for the strain highly producing antagonistic substance from *Bacillus subtilis* B47 by UV mutagenesis [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(4):68-72.
- [15] 陆亚华,时庭文,陈虹,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性及耐药基因研究[J]. 中华检验医学杂志, 2005(7):76-77.

(上接第 15369 页)

菌,经鉴定为放线菌科链霉菌属^[7]。该菌株对革兰氏阳性细菌有较强的抗性,对含芽孢细菌抑菌效果尤为明显。因此从土壤放线菌中发现抗耐药菌株新型抗生素极有可能。

3 小结

3株拮抗放线菌对多重耐药金黄色葡萄球菌具有一定的抑制作用,其中只有一株放线菌 B0602 的抑菌活性很强,具有开发潜力。因此,后续的工作是研究放线菌 B0602 产生的抗多重耐药金黄色葡萄球菌抗生素,可能发现抗多重耐药金黄色葡萄球菌的新型抗生素,进而为多重耐药金黄色葡萄球菌防治开创一条新途径。

参考文献

- [1] 中国药学会抗生素专业委员会. 抗生素科学的进展[J]. 中国药学杂志, 1997, 32(11):698-700.
- [2] MONAGHAN R L, BARRETT J F. Antibacterial drug discovery-then, now