

形态受培养温度影响的绿脓杆菌菌株

丛延广 刘俊康 袁泽涛 徐启旺

(第三军医大学生物波研究中心 重庆 400038)

摘要:从临床分离的一株绿脓杆菌表现出特殊性状,该菌在 37°C 培养时保持正常的短杆状,在 25°C 培养过夜则形成丝状形态,且不产生绿脓色素。当延长培养时间至 72h 以上或提高培养温度至 37°C,则丝状体开始逐渐断裂形成正常的短杆状菌体,并出现绿脓色素。初步研究表明,该现象与营养条件无关,菌群的生长密度可以影响这一现象,紫外线的照射有促进作用,同时绿脓色素的缺失不是丝状体形成的原因。

关键词:绿脓杆菌,丝状体,温度

中图分类号:Q935 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)02-0076-05

A STRAIN OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* WITH TEMPERATURE-SENSITIVE FORMATION OF FILAMENTS

CONG Yan-Guang LIU Jun-Kang YYAN Ze-Tao XU Qi-Wang

(Research Center of Biological Wave, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract: A strain of *P. Aeruginosa*, which was separated from clinical environment, shows a special characteristic. It keeps normal short rod shape when cultured at 37°C, however, it forms filament without pyocyanin producing when cultured at 25°C overnight. The filaments will divide and form short rods, simultaneously, produce pyocyanin when culture time is prolonged to over 72h or culture temperature is raised to 37°C. The preliminary study indicates that this phenomenon has nothing to do with nutritive conditions and could be influenced by inoculating density and irradiating with ultraviolet rays. The absence of pyocyanin was not the cause of filamentous formation by the test results.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Filament, Temperature

本实验室分离出一株形态受培养温度影响的绿脓杆菌,该菌在 25°C 培养时会形成丝状菌体。由于该菌在细菌断裂机制、菌群生态以及细菌致病性方面的研究可能有重要意义,本实验室对其一些基本性质进行了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源:从本校附属西南医院烧伤科分离。该菌在营养琼脂平板上生长,菌落扁平、湿润,边缘呈锯齿状,为粘液型菌落,有水溶性色素渗入培养基,呈蓝绿色,有金属光泽及生姜味。4°C 不生长,42°C 仍能生长,可在 SS 平板上生长。革兰氏染色呈阴性反应,无芽孢,有鞭毛。生化鉴定反应(见表 1)符合绿脓杆菌特征。应用绿脓杆菌分型血清进行血清分型,确定为血清型 8 型。其产生的蓝绿色色素可溶于氯仿并被提取,紫外灯照射下,不发荧光。

综合以上特征,可确定该株细菌为假单胞菌属中的绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*),血清型 8 型。

表 1 生化鉴定实验结果比较

	葡萄糖	氧化酶	枸橼酸盐	麦芽糖	精氨酸	甘露醇	木糖	硝还原实验	动力实验	赖氨酸	尿素	鸟氨酸	硫化氢	乳糖
短杆菌	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
丝状体	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-

1.1.2 培养基:绿脓杆菌选择培养基(DPA 培养基):1000mL 含蛋白胨 20g,硫酸钾 10g,氯化钾 1.4g,甘油 9g,硫酸铁 0.05g,pH7.2,加琼脂 15g,制成固体培养基。血液琼脂(含无菌脱纤维羊血 80g/L)、普通营养琼脂、LB 培养基。

1.1.3 生化鉴定用微量生化管:浙江省军区后勤部卫生防疫检验所生产。

1.1.4 绿脓杆菌分型血清:购自卫生部成都生物制品研究所。

1.1.5 紫外灯:强度为 100 μ w/cm²。

1.1.6 透射电子显微镜(JEM2000-EX, Japan)。

1.2 方法

1.2.1 常规革兰氏染色:光镜观察。

1.2.2 丝状体菌体结构透射电镜观察:将获得的绿脓杆菌丝状体悬液经 pH7.4 的 Hanks 液离心洗涤 3 次,取沉淀用戊二醛固定;PBS 漂洗,锇酸再固定;丙酮脱水,渗透;树脂包埋;进行超薄切片,铅铀染色;在 JEM2000-EX 透射电镜下观察。

1.2.3 生化实验:采用微量生化管,分别接种丝状体与短杆菌,再分别置 25°C 和 37°C 孵箱培养 12h 后观察结果。

1.2.4 血清学分型比较:按试剂盒标准操作进行。

1.2.5 不同培养基培养情况比较:将该株绿脓杆菌点种在 4 种培养平板上,分别为普通营养琼脂平板、DPA 平板、LB 平板以及血液琼脂平板,每种平板 2 块,一块置 25°C 条件下,一块置 37°C 条件下,培养过夜后观察。

1.2.6 接种方式的影响:采用两种接种方式。一种是点种法,即用接种针沾取少许菌苔,在 DPA 平板上均匀点种 5 点。一种是密划线法,用接种环沾取少许菌苔,在 DPA 平板上密密地划线接种。

1.2.7 气体条件的影响:将该株绿脓杆菌点种在 DPA 平板上,分别在普通空气环境中、5% 二氧化碳以及厌氧条件下于 25°C 进行培养,12h 后比较 3 种气体条件下的培养情况。

1.2.8 光线条件的影响:将菌苔点种于 DPA 平板上,用 100 μ W/cm² 强度的紫外线照射 15min 后放置 25°C 条件下培养过夜后观察,与普通光照条件下培养情况比较。

1.2.9 绿脓色素对丝状体断裂的影响:按 Watson 的方法提取绿脓色素^[1],将提取的绿脓色素按 10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴ g/L 的 4 种浓度加入 DPA 平板上,再点种该株绿脓杆菌,于 25°C 培养 12h 后观察结果。

2 结果

2.1 一般培养特点

在 25°C 培养过夜后可有菌落形成,与 37°C 条件下同时间培养的相比,菌落明显小,且无绿脓色素产生,涂片观察可见绝大多数菌体呈细长的纤丝状,在 25°C 条件下延长培养时间至 72h 以上,可见一部分丝状体有逐渐断裂的现象。而该菌在 37°C 条件下培养,则均为短杆菌。

光镜下观察绿脓杆菌丝状体革兰氏染色仍为阴性,长度是普通短杆菌的几倍到几十倍,见图 1、图 2。电镜观察显示丝状体菌体边缘平滑,形态纤细无分支,结构整体性好,无破损现象,胞体内没有中隔,见图 3。

2.2 生化实验结果

结果显示,该株绿脓杆菌在两种温度条件下主要生化反应是一致的。

2.3 血清分型鉴定结果

丝状体的血清分型抗原没有改变,为血清 8 型。

2.4 不同培养基培养比较

4 种平板上都能出现同样的现象,即在 37°C 培养时保持正常的短杆状形态,而在 25°C 培养时则形成丝状形态,且不产生绿脓色素。

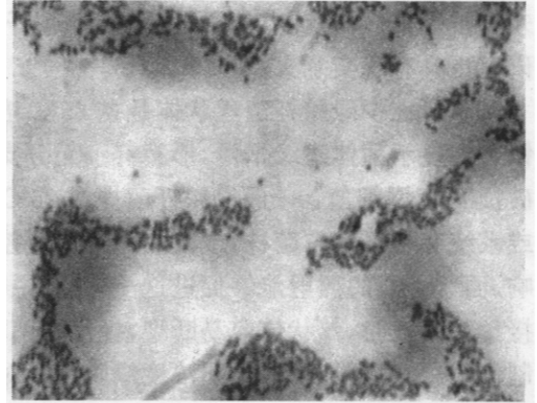
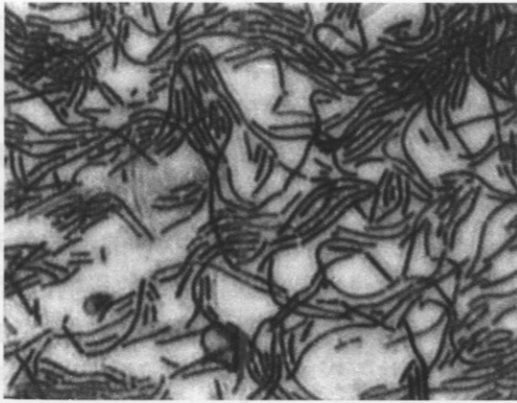


图1 绿脓杆菌丝状体形态(革兰氏染色,光镜×1000) 图2 绿脓杆菌正常形态(革兰氏染色,光镜×1000)

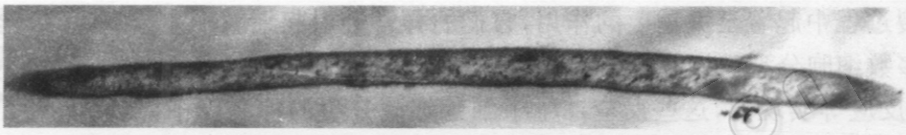


图3 绿脓杆菌丝状体菌体结构(电镜,×12000)

2.5 接种方式的影响

采用点种法在 25°C 培养的菌落中丝状体数量比密划线法培养的菌落增多,且长度更长。这表明该菌的接种密度对丝状体的形成有影响。

2.6 气体环境的影响

在空气中、5%二氧化碳以及厌氧环境条件下于 25°C 分别进行培养,得到的结果是一致的。

2.7 光线的影响

经紫外线照射的平板过夜培养获得的细菌与普通光照条件下培养的细菌相比,形态更加细长,基本看不到短杆菌。

2.8 绿脓色素对丝状体断裂的影响

各浓度绿脓色素对丝状体的断裂没有影响。

3 讨论

变化赋予生物更强的适应力。细菌具有极强的适应力,就因其具有多变性、多样性,这其中包括形态的多变。丝状体是杆菌较常见的一种形态变化,而本文研究的绿脓杆菌在较低温度下形成丝状体,却是一种罕见的现象。在一般的培养过程中或是在自然环境中,某些细菌如变形杆菌、枯草杆菌、绿脓杆菌以及某些厌氧菌等也形成丝状体,但其变化并不表现出温度敏感性。

多种因素可以诱导细菌形成丝状体,包括物理、化学以及生物学的因素,如低剂量的生长抑制剂(抗生素、抗代谢剂、消毒剂)、生长速率的迅速提高、氧的缺乏、紫外线及 X 线照射、表面生长以及某些离子如镁离子的缺失等等均可引起细菌形成丝状形态^[2-6]。研究表明丝状体的形成不是简单的反应,而是涉及多基因、多产物的复杂过程^[7,8]。关于温度因素,国外对某些

大肠杆菌株在低温时会形成丝状体有报道^[2],研究主要集中在细菌分裂机制方面。绿脓杆菌尚未见报道,国内也无此方面的研究,绿脓杆菌作为临床上一种重要的机会致病菌,其丝状体的研究更具有现实意义。

本研究中绿脓杆菌丝状体是在 25°C 培养获得的,长度是普通短杆菌的几倍到几十倍。电镜观察显示菌体边缘平滑,形态纤细无分支,结构整体性好,无破损现象,说明该菌不属于胞壁破损的 L 型细菌。一般绿脓杆菌株在 25°C 培养无此现象,说明该菌株决定菌体断裂的关键酶或系统有别于其它菌株,或其表达受温度控制。初步研究显示营养条件对丝状体的形成并无影响。而紫外线的照射能够促进这一现象,说明除了温度,紫外线也是丝状体形成的影响因素。而接种密度大时,丝状体容易断裂,提示在菌群中某些细菌释放的物质可以解除低温对断裂的抑制作用。平板中加入的不同浓度绿脓色素对丝状体的断裂并无影响,说明绿脓色素产生被抑制不是丝状体形成的原因。绿脓杆菌血清分型抗原是脂多糖成分,血清型没有改变表明,丝状体脂多糖的产生没有质的变化。

对大肠杆菌细胞周期的研究已确定 FtsZ、FtsA、FtsI(PBP3)、FtsQ 及 EnvA 等 5 种蛋白在菌体分裂过程中起着至关重要的作用,它们的异常会引起细胞不能分裂,导致丝状体的形成。而大多数细胞分裂被抑制是通过诱导压力反应系统(Stress-response system)如 SOS 反应、热休克反应等实现的,这些反应产生了细菌细胞分裂的抑制因子,从而抑制了细胞的断裂^[9]。

因抗生素原因(尤其是 β -内酰胺类抗生素)导致杆菌形成丝状体也是一种常见的现象,其形成原因是这些抗生素与细菌胞膜上青霉素结合蛋白(Penicillin binding protein, PBP)中的 PBP₁ 和或 PBP₃ 结合,抑制了内肽酶的活性,影响细胞中隔的合成,细胞分裂受阻,但菌体仍能伸长,形成丝状体,同时这些抗生素高浓度时会抑制糖苷酶的活性,使外周胞壁产生缺损^[10]。这些丝状体即所谓“L 型”,又称胞壁缺损细菌。这些长丝体与单纯因为分裂被抑制而形成的丝状体有很大的区别,差异主要体现在形成的原因、机制以及生物学特点。区别的关键是周胞壁的完整情况,后者由于其周胞壁的完整性而更应被看作一个完整的特殊细胞(含多个核质)。

丝状体在细菌断裂机制、菌群生态以及细菌致病性等方面均有研究价值,而目前为止,研究尚不深入,其中一个原因就是缺少合适的能自发产生丝状体的菌株。本研究中的绿脓杆菌菌株在形成丝状体时,表现出可控性(温度控制)和自发性(不需用特殊试剂)的特点。因此,对绿脓杆菌丝状体的研究尤其在菌群生态和致病性研究等方面会发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Watson D, Macdermot J, Wilson R, *et al.* Eur J Biochem, 1986, 159(2): 309~313.
- [2] Yasuda T, Nagata T, Ohmori H. J bacteriol, 1996, 178(13): 3854~3859.
- [3] Jensen R H, Woolfolk C A. Appl Environ Microbiol, 1985, 50(2): 364~372.
- [4] McCoy W F, Bryers J D, Robbins J, *et al.* Can J Microbiol, 1981, 27: 910~917.
- [5] Walker J R, Ussery C L, Allen J S. J Bacteriol, 1973, 113(3): 1326~1332.
- [6] Wright J B, Costerton J W, McCoy W F. J Ind Microbiol, 1988, 3: 139~152.
- [7] Corton J C, Ward J E, Lutkenhaus J. J Bacteriol, 1987, 169(1): 1~7.
- [8] Sassanfar M, Roberts J W. J Mol Biol, 1990, 212: 79~96.
- [9] Donachie W D. Annu Rev Microbiol, 1993, 47: 199~230.
- [10] 戴自英主编. 实用抗菌药理学. 上海: 上海科学技术出版社, 1992, 12~14.