

多杀性巴氏杆菌生物被膜扫描电镜研究

杨辑¹, 赵晟楠², 刘金超¹

(1. 华南理工大学分析测试中心, 广东广州 510640; 2. 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广东广州 510530)

摘要 [目的]利用扫描电镜研究多杀性巴氏杆菌生物被膜的独特结构。[方法]在扫描电镜生物样品制备常规方法和改进方法的基础上,对从广东病鸡分离出的3株多杀性巴氏杆菌的表面形貌进行比较。[结果]改进方法较常规方法更明显地获得了细菌生物被膜三维立体结构观察的效果。[结论]扫描电镜可观测到多杀性巴氏杆菌生物被膜直观的三维构象,为细菌生物被膜的进一步研究提供了直观依据。

关键词 多杀性巴氏杆菌;细菌生物被膜;扫描电镜;菌株

中图分类号 S182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)17-07556-02

Scanning Electron Microscopic Observation on the Biofilms of *Pasteurella multocida*

YANG Ji et al (Analytical and Testing Center, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640)

Abstract [Objective] Scanning electron microscope (SEM) was used to observe the unique structure of the biofilm of *Pasteurella multocida*. [Method] Three strains of *Pasteurella multocida* isolated from diseased chickens of Guangdong were treated with conventional method and improved method of biological sample preparation for SEM. Then their surface morphology was detected by SEM. [Result] Using the improved method is more obvious to observe the three-dimensional structures of bacterial biofilm than using the conventional method. [Conclusion] SEM can detect the three-dimensional structures of bacterial biofilm. It provides an intuitive basis for further studies of *Pasteurella multocida*'s biofilm.

Key words *Pasteurella multocida*; Bacterial biofilm; Scanning electron microscope (SEM); Bacterial strain

多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*) 是引起多种动物巴氏杆菌病 (又称出血性败血症) 的病原菌, 主要使动物发生出血性败血症或传染性肺炎。多杀性巴氏杆菌为细小的球杆状或短杆状菌, 两端钝圆, 近似椭圆形, 大小为 (0.5~2.5) $\mu\text{m} \times (0.2 \sim 0.6) \mu\text{m}$, 不形成芽胞, 不运动, 无鞭毛, 为革兰氏染色阴性的需氧兼性厌氧菌。多杀性巴氏杆菌为害畜禽最为严重, 可使鸡、鸭等发生禽霍乱, 使猪发生猪肺疫, 使各种牛、羊、兔、马以及许多野生动物发生败血症。

细菌生物被膜 (Bacterial biofilm) 也称生物膜, 是指细菌在生长过程中为适应生存环境而附着于惰性或活性实体表面而形成的由细菌及其分泌的含水聚合性基质 (主要为胞外多糖) 等所组成的膜样多细菌复合体^[1]。自然界中 99% 的细菌存在于生物被膜中, 仅 1% 以自由浮游的方式存在^[2]。已有研究表明细菌生物被膜的存在与其致病的严重程度相关^[3]。

目前, 电子显微镜是观察细菌生物被膜的重要工具。扫描式电子显微镜的电子束不穿过样品, 仅在样品表面扫描激发出次级电子而成像, 图像有很强的立体感, 在生物被膜研究初期提供了直接形象的外观资料^[4]。笔者在研究多杀性巴氏杆菌生物被膜的过程中, 应用扫描电镜对从病鸡分离出的 3 个菌株的表面形貌进行比较, 观察了菌落在生物被膜中的聚集现象。考虑到在制样过程中细菌经过繁琐的洗涤和离心过程, 有可能破坏生物被膜的原有形态, 笔者对此方法做了改进, 以为细菌生物被膜的结构研究提供有效方法。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 多杀性巴氏杆菌的培养。从广东省病鸡中分离出 3

个多杀性巴氏杆菌的菌株 PA-12、PA-34 和 PA-47。在 pH 为 7.2~7.4 的大豆酪蛋白琼脂培养基 (TSA) 平板上培养 24 h, 培养温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.1.2 试剂。①25% 戊二醛溶液; ②0.1 mol/L PBS 缓冲液; ③2% 四氧化钨溶液; ④30%、50%、70%、85%、95%、100% 浓度梯度的乙醇溶液; ⑤乙醇/叔丁醇 (1:1) 混合溶液; ⑥纯叔丁醇。

1.2 试验方法

1.2.1 常规方法。①制备 2.5% 戊二醛溶液和 1% 四氧化钨溶液; ②固体培养基中培养 20 h 左右, 旺盛生长的菌体, 在菌落表面滴几滴戊二醛固定液, 轻刮菌落。将菌液吸入 2 ml 容量的 PE 管, 以 8 000 r/min 的转速离心 5 min 后, 去上清换入新鲜戊二醛固定 2 h, 0.1 mol/L PBS 缓冲液清洗 3 次; ③用 1% 钨酸再固定 4 h, 0.1 mol/L PBS 缓冲液洗 3 次; ④使用 30%、50%、70%、85%、95% 的乙醇脱水 2 次, 每次 20 min; ⑤用乙醇/叔丁醇 (1:1) 混合溶液处理 20 min; ⑥在纯叔丁醇中处理 20 min 彻底置换出乙醇; ⑦取少量菌液滴在玻璃片上, 用液氮快速冷冻后放入 Cressington108 型真空镀膜仪中抽真空 6 h; ⑧喷金 3 min, 置于高分辨扫描电镜 LEO1530VP 下进行观察。

1.2.2 改进方法。在常规方法的基础上, 将新鲜菌液稀释到合适浓度, 以下各步骤用 0.1 mol/L PBS 缓冲液清洗 2 次, 3 000 r/min 转速离心。戊二醛和钨酸的固定时间分别延长至 4 h。其余步骤同常规方法。

2 结果与分析

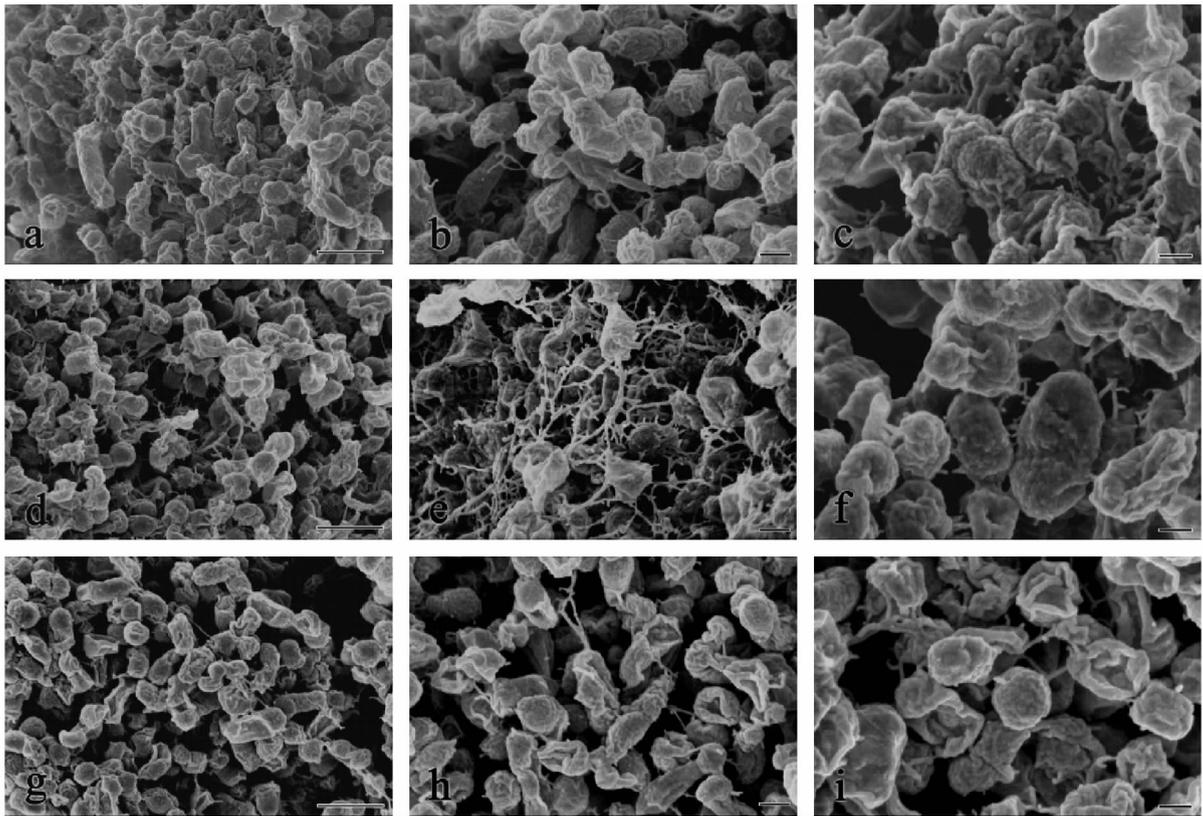
常规方法处理样品后, 经扫描电镜观察发现多杀性巴氏杆菌呈短杆状或球杆状, 菌体长短不一, 菌体表面有隆起和凹陷, 形成明显的皱褶。在堆状的微菌落中, 菌与菌之间有丝状物连接 (图 1)。菌体表面还有少量大小不一的颗粒

作者简介 杨辑 (1984 -), 男, 广东河源人, 助理实验师, 硕士, 从事微生物学和电子显微技术方面的研究, E-mail: yjscut@126.com。

收稿日期 2013-04-27

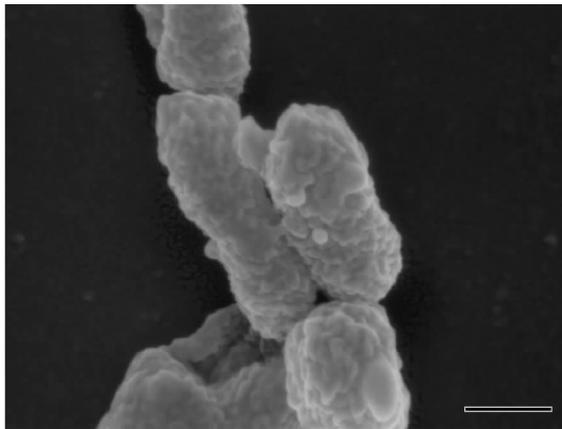
样物质,这种颗粒能从菌体表面脱落下来(图2)。从图1可以看出,3个多杀性巴氏杆菌株的表面形态无明显差异,其中

菌株 PA-34 的丝状物较多,菌株 PA-12 和 PA-47 的丝状物较少;3个菌株的生物被膜的网状或片状结构均不明显。



注:a~c:PA-12;d~f:PA-34;g~i:PA-47。a、d、g:Bar=1 μm;b、e、h:Bar=300 nm;c、f、i:Bar=200 nm。

图1 多杀性巴氏杆菌 PA-12、PA-34 和 PA-47 常规方法处理后的扫描电镜观察结果



注:Bar=300 nm。

图2 多杀性巴氏杆菌 PA-34 的菌体表面电镜观察结果

从图3可以看出,改进方法处理样品后3个多杀性巴氏杆菌株周围均有凹凸不平的粘液样物质,借助其使细菌相互连接形成大片生物被膜。其中,PA-34菌体为浓厚的粘液样物质紧密包绕,形成大片的网状结构,而PA-12和PA-47菌体也依附在稀疏的生物被膜上。由于在电镜制样过程中经历了脱水、干燥等繁琐处理,因此可以推测在生物被膜中细菌之间在未经过处理前充满了粘液。

3 结论与讨论

生物被膜的形成是细菌为适应自然环境而采取的策略,

是细菌的一种本能。任何细菌在成熟条件下都可以形成生物被膜^[5]。生物被膜中的细菌具有极强的耐药性,感染部位的细菌一旦形成了生物被膜,对抗生素的耐药性是游离状态的500~1 000倍以上^[6],并可逃避宿主的细胞免疫反应和体液免疫反应,成为临床上难治性感染的重要原因之一^[7]。成熟的细菌生物膜中含有15%左右水合物和85%左右基质。细菌自身能分泌聚合性基质,成分包括胞外多糖、糖蛋白和磷脂,包裹在细菌群落外。聚合性基质除了屏障作用外,还可以抑制中性粒细胞趋化、抵抗吞噬细胞吞噬,对细菌生物膜中细菌的存活非常重要。细菌定植在基质中后,开始生长、繁殖,形成在形似“蘑菇”的亚单位,在细菌群落之间存在着充满环境液体的内隙,这是细菌获得营养和排除代谢废物的通道,维持着膜内细菌生存需要^[8]。

笔者使用扫描电子显微镜观察多杀性巴氏杆菌3个不同菌株的生物被膜,用常规的细菌制样方法观察到细菌聚集在生物被膜中,菌体之间相互以粘稠的纤维状粘液丝相连。考虑到细菌在电镜制样过程中经历了频繁清洗和脱水等步骤,有可能破坏生物被膜的原始形貌。为最大限度反映生物被膜的真实形态,对常规制样方法进行了精简和改进,结果表明改进方法后更明显观察到成片的生物被膜网状结构。与文献报道相似,即具有三维结构的成熟细菌生物被膜,内有基质包被的球形和椭圆形结构及水通道。同一种属的不

(下转第7560页)

离子 $M(\text{Ag}^+、\text{Mg}^{2+}、\text{Fe}^{3+})$ 与 Acr 相互作用的 Stern-Volmer 曲线方程呈现出较好的线性关系,其相关系数 r 分别为 0.997 5、0.998 5 和 0.998 1,表明随着猝灭剂 $[M]$ 的增大,吡啶黄的荧光强度逐渐减弱。

2.3 结合常数和结合位数的测定 对于 Acr 和 M 的作用机理推测如下: $\text{Acr} + M \rightleftharpoons [\text{M}(\text{Acr})]$

Acr 中 2 个氨基上的 N 原子和吡啶环上的 N 原子提供孤对电子与 M 形成配位键,并且形成 1:1 的配位方式(图 9)。

荧光强度与猝灭剂的关系可由结合常数表达式^[3]推导出以下公式:

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_A + n \lg[M] \quad (2)$$

根据图 8 计算出金属离子 $M(\text{Ag}^+、\text{Mg}^{2+}、\text{Fe}^{3+})$ 与 Acr 的结合方程和结合常数。从表 1 可以看出,金属离子 M 与 Acr 的结合方程线性较好,根据公式(2)计算出结合位数 n

表 1 $M(M = \text{Ag}^+、\text{Mg}^{2+}、\text{Fe}^{3+})$ 与 Acr 结合相关方程

离子	$F_0/F = 1 + K_A \tau_0 c_q$	r	$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_A + n \lg[M]$	r	n	K_A
Fe^{3+}	$F_0/F = 1.062 83 + 0.190 5c_q$	0.997 5	$\lg[(F_0 - F)/F] = 1.938 1 + 0.670 7 \lg[M]$	0.997 3	0.670 7	86.72
Mg^{2+}	$F_0/F = 1.125 8 + 0.960 3c_q$	0.998 5	$\lg[(F_0 - F)/F] = 3.010 0 + 0.879 1 \lg[M]$	0.997 8	0.879 1	1.02×10^3
Ag^+	$F_0/F = 0.968 4 + 0.086 95c_q$	0.998 1	$\lg[(F_0 - F)/F] = 4.704 9 + 1.175 6 \lg[M]$	0.999 0	1.175 6	5.07×10^4

3 小结

采用荧光光谱法研究了吡啶黄与金属离子 $M(\text{Ag}^+、\text{Mg}^{2+}、\text{Fe}^{3+})$ 之间的相互作用,结果表明 $M(\text{Ag}^+、\text{Mg}^{2+}、\text{Fe}^{3+})$ 对吡啶黄的荧光产生明显的荧光猝灭作用。计算了它们之间的结合常数、结合位点数,结果表明吡啶黄分别与 Ag^+ 和 Mg^{2+} 形成了 1:1 的配位化合物, Fe^{3+} 与吡啶黄的配位能力较弱,吡啶黄荧光猝灭现象主要是 Fe^{3+} 与吡啶黄通过分子间的

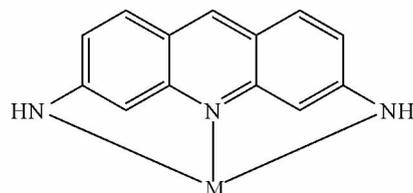


图 9 $[\text{M}(\text{Acr})]$ 的结构

分别为 0.670 7、0.879 1 和 1.175 6。这表明 $\text{Mg}^{2+}、\text{Ag}^+$ 与 Acr 的结合位数 n 靠近 1,且结合常数 K_A 较大,从而验证了图 4、图 6 荧光峰红移的现象。而 Fe^{3+} 与 Acr 配位的能力较弱,结合常数最小,可能性更多的是 Fe^{3+} 与 Acr 之间的碰撞导致吡啶黄荧光强度的减小,从而验证了图 1 和图 2, Acr 与 Fe^{3+} 混合液的荧光峰并没有发生红移。

碰撞所致。

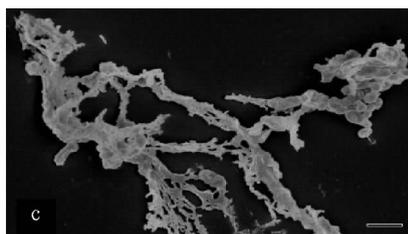
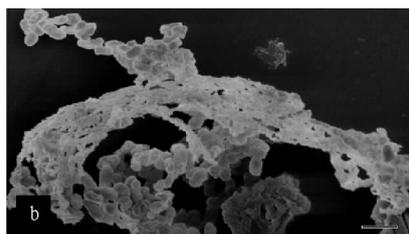
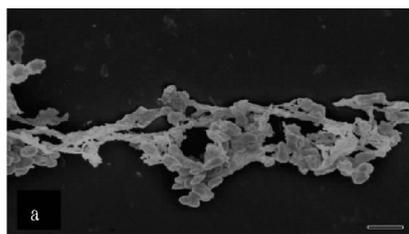
参考文献

- [1] 徐红,黄亚勋,刘红.吡啶黄素盐酸盐-肝素体系的共振瑞丽散射光谱及其分析应用[J].化学研究与应用,2010,22(9):1170-1173.
- [2] BRAUN A M, MAURETTE M T. Photochemical Technology [M]. New York: Oliveros, E. Wiley, 1991: 41.
- [3] 冯喜增,金瑞祥,何锡文,等.各种离子对血卟啉与牛血清蛋白相互结合反应的影响研究[J].高等学校化学学报,1996,17(6):866-869.

(上接第 7557 页)

同种类细菌产生生物被膜的程度也有所差异,可能与细菌的致病性有关。笔者通过扫描电镜观测到多杀性巴氏杆菌生

物被膜直观的三维构象,图像立体感强,为细菌生物被膜的研究提供了直接的外观形态参考。



注:a. PA-12; b. PA-34; c. PA-47。Bar = 1 μm 。

图 3 多杀性巴氏杆菌 PA-12、PA-34 和 PA-47 改进方法处理后的扫描电镜观察结果

参考文献

- [1] BENDOUAH Z, BARBEAU J, HAMAD W A. Biofilm formation by staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis [J]. Oto laryngol Head Neck Surg, 2006, 134(6): 991-996.
- [2] SANDERSON A R, LEID J G, HUNSAKER D. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis [J]. Laryngoscope, 2006, 116(7): 1121-1126.
- [3] BROWN M R, BARKER J. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms [J]. Trends in Microbiol, 1999, 7(1): 46-50.
- [4] STICKLER D, MORRIS N, MORENO M C, et al. Studies on the formation of crystalline bacterial biofilms on urethral catheters [J]. Eur J Clin Micro-

- biol Infect Dis, 1998, 17: 649-652.
- [5] COSTERTON J W, STEWART P S, GREENBERG E P. Bacterial biofilms: a common cause of Persistent infections [J]. Science, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [6] SANCLEMENT J A, WEBSTER P, THOMAS J, et al. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis [J]. Laryngoscope, 2005, 115: 578-582.
- [7] COSTERTON J W, CHENG K J, GEESEY G G, et al. Bacterial biofilms in nature and disease [J]. Annu Rev Microbiol, 1987, 41: 435-464.
- [8] COSTERTON J W, STEWART P S. Battling biofilms [J]. Science, 2001, 285(1): 74-81.