

多形类杆菌的电镜观察

谢念铭 童少清 王鲁平 张业彬 郎淑慧

(中国药品生物制品检定所 北京)

厌氧菌是人、畜体内正常菌群的重要组成部分。人的粪便中 99% 是厌氧菌^[1]。多形类杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) 为专性厌氧菌, 属脆弱类杆菌组, 革兰氏染色阴性, 一般为短杆形, 两端圆而浓染, 中间有不着色部分被认为是其特点, 有荚膜, 无芽胞, 无鞭毛, 不能运动。在含糖培养基上菌体呈多形性, 有丝状体。多形类杆菌能产生内毒素, 在脆弱类杆菌组中的抗原分型为血清型 A^[2], 因产生 β -内酰胺酶能破坏青霉素, 故对其耐药。所以, 研究多形类杆菌有一定的生物医学意义。

作者从无特定病原体 (SPF) 的 BALB/c-nu/+ 小鼠盲肠内容物中分离得 3 株多形类杆菌, 其生物学鉴定结果已报道^[3]。本文通过电镜观察, 发现了一个罕见现象, 即多形类杆菌能在细胞内产生环层小体 (Lamellar corpuscle) 并向细胞外释放。另外, 还证实了光学显微镜下所见到的不着色部分, 在电镜下是核区位置。

材料和方法

(一) 细菌的分离与鉴定

取 SPF 小鼠置厌氧箱内处死解剖, 采集盲肠内容物, 涂布于琼脂平板培养基上, 放 Gas Pak 罐内, 在 37℃ 培养 72h, 选形态不同的菌落作增菌培养。将纯化的菌株进行生物学鉴定, 获得了 3 株多形类杆菌。

(二) 电镜标本的制备

1. 负染标本: 取培养 72h 的细菌制成均匀悬液, 滴在铜网的载膜上, 以 1% 磷钨酸负染, 用 H-600 IV 型透射电镜观察。

2. 扫描电镜标本: 置细菌于盖玻片上, 加 2.5% 戊二醛, 放 4℃ 冰箱内固定 2h 以上, 用磷酸缓冲液浸洗。再用 1% 四氧化锇在室温固定 1h 和磷酸缓冲液浸洗。然后, 以系列乙醇脱水, 用系列乙酸异戊脂置换。最后进行临界点干燥和喷金镀膜, 用 JSM-840 扫描电镜观察。

3. 超薄切片标本: 取上法固定的细菌, 经乙醇脱水后, 用 Epon 812 包埋, 放 60℃ 聚合, 在 LKB III 型超薄切片机上用钻石刀切片, 将片子捞在 400 目无载膜铜网上, 用乙酸铀和柠檬酸铅双染, 透射电镜观察。

结果和讨论

在透射电镜下, 负染的多形类杆菌大小为 $0.46 \times 1.18 \mu\text{m}$, 常呈二联体。在扫描电镜下, 菌体表面有时可见球形小体 (图版 I-1), 有的菌体中部出现凹陷 (图 I-2), 有些菌体间存在着粘连小带。从细菌的切片可见菌体中部经常有一个比较透明的核区 (图版 I-3), 有时核区出现在菌体的一端, 或两端各有一个核区, 或多个核区间隔分布在一条很长的菌体中, 有的核区几乎占据了整个菌体。从切片中还可见到一个母细胞的侧面, 可以分裂产生一个微小细胞, 它具有自己的细胞膜和细胞壁 (图版 I-4)。个别菌体的细胞壁呈波浪形, 外膜多达 6 个致密层 (图版 I-5)。菌体四周有很多菌毛, 细长而稍弯曲, 还可见到明显的荚膜 (图版 I-6)。此外, 屡见菌体内存有 1—2 个环层小体, 无限制膜包围, 游离于细胞质中 (图版 II-7), 有的环层小体嵌在细胞膜和细胞壁内 (图版 II-8), 有的一半凸出在细胞外, 另一半仍留在细胞内 (图版 II-9), 有的完全被释放出细胞外, 但仍可看出它与细胞之间的联系 (图版 II-10)。有的两个环层小体, 一个已释放出细胞外, 另一个仍留在细胞内 (图版 II-11)。有的环层小体正处在细胞膜和细胞壁的突起中 (图版 II-12)。

在光学显微镜下, 多形类杆菌两端浓染, 中间有不着色部分被认为是其特点。作者在扫描电镜下也观察到该菌常有两端隆起而中部凹陷现象, 表明此部位内容物疏薄。从透射电镜看, 菌体在切片中的这个范围正好是核区所在, 无细胞质成

本文于 1987 年 11 月 17 日收到。

份,因此在光镜下不显染色反应。由于核区可以出现在细胞任何部位,光学显微镜的照片也表明不着色区域可以存在于菌体的不同部位^[4]。所以,仅提两端浓染,中间有着色部份为其特点似不够全面。

从一系列环层小体在菌体内外的不同位置来看,它们像是产生于细胞内,通过细胞膜和细胞壁,释放到细胞外,不像是外来的异物。从环层小体的结构来看,它是由微细颗粒连成的线条,盘绕而形成的髓鞘样构造,没有限制膜包被,游离在细胞质中,因此不同于连接着细胞膜的中间体(Mesosome)。环层小体的性质和功能尚不清楚,是酶类还是别的什么东西,有待进一步研究证实。细菌不具有内质网和高尔基体等重要细胞器,多形类杆菌是怎样产生环层小体的机理不明。释放环层小体的细胞,其细胞壁和细胞膜往往不够完好,细胞内的结构也较模糊,因此推测环层小体可能是衰老细胞的产物。

扫描电镜所见菌体表面的球形小体(直径300 nm)与超薄切片中的微小细胞(直径380 nm)大小相近,而比环层小体(平均直径142 nm)大的多。因此球形小体可能是微小细胞而不是环层小体。革兰氏阴性细菌的外膜通常只有2个致密层,含有脂多糖,即内毒素。多形类杆菌外膜增多达6个致密层,其内毒素含量是否也相应升高,有待生化测定后才能肯的。

参 考 文 献

- [1] 上海第一医学院: 厌氧菌感染及其微生物学检查法,上海第一医学院出版,上海,1983。
- [2] Romond, C. et al.: *Arch Roumaine Pathol. Exp. Microbiol.*, 31(3): 351—355, 1972。
- [3] 童少清等: 实验动物科学, 4(2): 46—49, 1987。
- [4] 光岡知足: 肠内菌の世界——嫌気性菌の分離と同定。pp. 71—72; 202—203, 蔵文社, 东京都, 日本, 1980。

ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATIONS ON *BACTEROIDES THETAIOAOMICRON*

Xie Nianming Tong Shaoqing Wang Luping Zhang Yebin Lang Shuhui

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing)

Three strains of *B. thetaiotaomicron* have been isolated from caeca of BALB/c-nu/+ mice of SPF. These *Bacteroides* are obligately anaerobic, Gram-negative, non-spore-forming and non-motil without flagella rods. A characteristic of staining is deep at ends and stainless at the medium of a rod. The isolation and identification of these strains has been reported in 1987.

This paper introduced only the results of EM observations. Under the SEM, the unstained area of rods is always showing a concavity, which is just a nucleoid in sections under the TEM. Many lamellar corpuscles have been found in cell plasma. Some of them have been secreted out of the cells. The chemical properties and physiological functions of them are unknown.

图 版 说 明

图 版 I

多形类杆菌的扫描电镜照片: 1. 示菌体偏端的球形小体 (SB) ($40,000\times$)。 2. 示菌体中央的凹陷 (↑) ($3,500\times$)。 透射电镜照片: 3. 示核区 (na) 和细胞质 (cp) ($28,000\times$)。 4. 示母细胞 (mc) 侧旁分裂产生一个微小细胞 (sc) 及其外膜 (e) 和内膜 (i) ($50,000\times$)。 5. 示波浪形细胞壁及其多层外膜 (ou) ($100,000\times$)。 6. 示周身菌毛 (pl), 内膜 (Δ), 外膜 (e) 和荚膜 (↑) ($70,000\times$)。

图 版 II

多形类杆菌超薄切片的透射电镜照片: 7. 示两个环层小体 (lc), 无限制膜, 游离在细胞质 (cp) 中 ($112,000\times$)。 8. 示一个环层小体 (lc) 嵌入细胞膜 (▲) 和细胞壁 (e) 内 ($84,000\times$)。 9. 示环层小体 (lc) 一半凸出菌体外, 另一半仍留在菌体内 ($140,000\times$)。 10. 示两个环层小体 (lc), 一个已释放出细胞外, 另一个仍留在细胞内 ($112,000\times$)。 11. 示环层小体 (lc) 已被释放到细胞外, 但仍可看出它与细胞间的联系 ($210,000\times$)。 12. 示一个环层小体进入了细胞壁 (e) 和细胞膜 (▲) 的突起中 ($112,000\times$)。