

椰毒假单胞菌的电镜观察

谢念铭 王鲁平 郎淑慧

(中国药品生物制品检定所, 北京)

赵乃昕 马麦生

黄文哲

(潍坊医学院, 潍坊)

(北京儿童医院, 北京)

酵米面假单胞菌 (*Pseudomonas farinofermans*) 系从食物中毒的变质酵米面中分离到的病原菌, 它与椰毒假单胞菌 (*P. cocovenenans*) 为同种不同生物型, 与洋葱假单胞菌 (*P. cepacia*) 有许多共同点。电镜观察表明, 此 3 株假单胞菌在形态和结构上有以下共同特点: 菌体呈短杆状, $0.6-0.8 \times 1.5-2.0 \mu\text{m}$ 。细胞壁由肽聚糖层和外膜 (outer membrane) 构成。有时可见丝状体 (filaments), 甚至畸形细胞。无荚膜, 无菌毛 (pili), 一端有多根鞭毛。细胞质内有电子透明的聚- β -羟基丁酸盐 (PHB) 颗粒。核区内有电子致密体 (electron-dense bodies) 或层状体 (laminar bodies)。细胞表面可见到微细胞 (minicells)。均能产生细胞外“丝状物质”, 这一特点尚未见报道。

关键词 洋葱假单胞菌; 微细胞

酵米面是谷类经水泡发酵后磨成湿粉的食物, 但因食用变质酵米面而引起中毒者, 东北、西南等地均有报道。其病原菌经赵乃昕等研究鉴定, 被定名为酵米面假单胞菌, 并证明它与椰毒假单胞菌为同一个种, 仅在个别底物利用上稍有差异^[1]。按 Bergey 氏细菌鉴定手册, 有许多特点与洋葱假单胞菌相符^[2]。作者对这 3 株假单胞菌作了电镜观察。

材料与 方法

(一) 菌种培养

酵米面假单胞菌 T7707 菌株, 椰毒假单胞菌 NCIB 9450 菌株和洋葱假单胞菌 ATCC 13945 菌株 (以下简称 3 株假单胞菌), 均由山东省潍坊医学院收集, 均接种于马铃薯葡萄糖琼脂斜面, 放在 28°C 培养 $24-48\text{h}$ 。

(二) 标本制备

1. 负染: 将菌苔制成悬液, 滴在铜网

的载膜上, 用 1% 磷钨酸染色。

2. 镀膜: 将菌液滴在盖玻片上, 用 2% 戊二醛和 1% 四氧化锇双固定, 经临界点干燥后, 在真空中喷金镀膜。

3. 切片: 将经过固定的菌块, 用 Epon 812 包埋, LKB III 型超薄切片机和砧石刀切片, 醋酸氧铀和柠檬酸铅复染。

负染和切片标本用 H-600 透射电镜观察, 镀膜或投影标本用 JSM-840 扫描电镜观察。

结 果

3 株假单胞菌的形状和大小相似, 同为短杆状或稍弯曲, 两端钝圆, 长 $1.5-2.0 \mu\text{m}$, 宽 $0.6-0.8 \mu\text{m}$, 其中以洋葱假单胞菌偏粗。3 株菌均有菌丝体, 有的长达 $20 \mu\text{m}$ 以上, 偶然可见畸形细胞 (图版 I-1-3)。3 株菌均无荚膜, 负染标本可见到

本文于 1989 年 5 月 27 日。

细胞表面密布约 50nm 宽的曲折皱纹, 洋葱假单胞菌的细胞表面有时出现宽约 $0.15\mu\text{m}$ 的半透明圈(图版 I-4、5)。在镀膜和负染标本中, 可见到 3 株菌均产生微球体, 直径 $0.25-0.50\mu\text{m}$, 一般为 1—3 个, 有的已从杆状母细胞上脱落, 散布在其周围。超薄切片揭示, 此种微球体外被细胞壁, 内含细胞质(图版 I-6—8)。扫描电镜和透射电镜均可观察到 3 株菌细胞的一端常有鞭毛, 少者 1—3 根, 多则 7—9 根(图版 II-9—11), 均未见到菌毛。在 3 株菌的培养物中, 均存在着大量的“丝状物质”, 单根直径约 10nm, 呈网状分布并将细胞交织在其中, 许多单根的“丝状物质”可聚合成粗细不同, 长短不等的束, 有弯曲的也有挺直的(图版 II-12—14)。3 株菌的细胞内, 可见到积累的不同包含物, 有的是一些大小不同的电子透明泡, 直径 $0.14-0.20\mu\text{m}$, 游离在胞质中; 有的是 1—2 个电子致密体, 直径 $0.18-0.30\mu\text{m}$, 位于核区内。另外, 在酵米面假单胞菌的核区内, 偶然可见 1—2 个层状体, 直径 $0.15\mu\text{m}$ 左右(图版 II-15—17)。有的细胞内同时含有电子透明泡和致密体。但在 3 株菌的所有细胞内, 均未见到芽孢。

讨 论

文献记载酵米面假单胞菌为短小杆菌, 长 $1.5-2.0\mu\text{m}$, 宽 $0.3-0.4\mu\text{m}$ ^[1]。作者对负染和镀膜标本的电镜观察结果表明, 酵米面假单胞菌一般宽约 $0.6-0.8\mu\text{m}$, 比光学显微镜观测的结果为粗。这个差异可能有多种原因, 培养基成分和标本制作方法, 都是应考虑的因素之一。

培养物中丝状体细胞, 可能是细胞壁生长失调的细菌。每种细菌本有恒定的长度, 在它们的构成成分加倍后, 便分裂为两个相等的子细胞。革兰氏阴性细菌的分

裂, 依靠中隔(septum)的作用。细胞膜及其上面覆盖的肽聚糖层, 首先在细胞中央部位垂直向内生长, 形成具有双层肽聚糖的隔膜。然后, 这重迭的肽聚糖层便被凹入的外膜逐渐分开。当分隔全部完成后, 中隔劈开, 细胞一分为二^[3]。Higgins 等将细胞表面生长过程分为 4 个阶段: (1) 细胞壁表面增长; (2) 分隔(或形成横壁); (3) 子细胞分开; (4) 细胞壁增厚^[4]。由此推测, 丝状体的形成, 可能是由于细胞壁不断地呈直线生长, 外膜未反折凹陷, 因此不能进行分隔, 也就不能完成分裂而继续伸长。

畸形细胞可能是细胞壁缺陷形成的。各种细菌原有固定的形状, 坚硬的肽聚糖层是塑造和保持细菌形态的骨架结构。如果肽聚糖代谢被干扰, 或其结构遭破坏, 便会出现各种各样的畸形细胞。延长培养时间或施加抗菌素, 如青霉素, 都可产生畸形细胞^[5,6]。这里所见到的畸形细胞, 可能是个别衰老细胞的变异体。

微球体可能是细胞分裂不正常的产物。杆状细胞的分裂位置, 应在母细胞中央, 通常是分裂为两个相等的子细胞。这里观察到杆状母细胞表面形成的微球体, 其超薄切片表明, 它们外被细胞壁和细胞膜, 内含细胞质和核区, 具有一个细胞的基本构造。因此, 这种微球体实质上是微细胞。关于微细胞的产生, Teather 等提出可能是由于正常细胞, 使可扩散的“分裂因子”加倍后引起的。另一种可能是因为染色体于潜在的分裂位置上附着和复制后发生了移动, 导致细胞不能在中央分裂^[7]。

Deinema 等提出某种假单胞菌也能合成细胞外纤维素, 这似乎是产生絮结物的革兰氏阴性细菌的一个共同性能^[8]。根据 3 株菌的培养物的粘稠性和坚韧性, 以及其超薄切片中显示出来的“丝状物质”, 很

可能是纤维素。关于细菌产生纤维素的机理,还不很清楚。据文献报道,一个形成纤维素的木醋杆菌 (*Acetobacter xylinum*) 细胞,约有 50 个单独的合成位点,沿长轴组成一排,每一位点都产生纤维素微纤维。这些位点被设想为在脂多糖膜上呈一直线排列的小孔,孔径 $120-150 \text{ \AA}$ ^[9]。在生物合成纤维素的领域中,前驱物、中间产物和成品的聚合作用,仍是争论的问题。一般认为,第一步,葡萄糖在细胞内从游离的分子转化为聚葡萄糖 (polyglucosan), 并被输送出细胞外;第二步,此聚合物逐渐被联结,并定形成坚韧的纤维素微纤维,它使培养物非常粘稠^[10]。在琼脂培养基上,纤维素微纤维包围着分开的细胞群,培养 8 天后,菌落便消失在粘结性的覆盖物中,这对细菌的实际意义还不知道。

能否积累聚- β -羟丁酸盐颗粒作为细胞内碳的贮藏物,是假单胞菌属内菌种分群的主要内容之一。本文报道的 3 株假单胞菌都属于能积累聚- β -羟丁酸盐颗粒的细菌。此颗粒在电镜下呈现为电子透明或半透明区。

3 株菌的核区内都有包含物,其中的电子致密体,从形态和位置看有点像羧化

体 (carboxysome)^[11]。另外,在酵母面假单胞菌核区内的层状体,具有膜样结构,类似中间体 (mesosome), 在负染标本中也观察到了盘绕成球状的管形结构。据 Hoffman 报道,在绿脓假单胞菌细胞内也观察到了中间体^[12]。

参 考 文 献

- [1] 赵乃昕: 中华微生物学和免疫学杂志, 8(31): 151-155, 1988.
- [2] Krieg, N. R.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th ed., Vol. 1, Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 174-178; 658-661, 1984.
- [3] Burdett, I. D. J. et al.: *J. Bacteriol.*, 119: 1039-1056, 1974.
- [4] Higgins, M. L. et al.: *ibid.*, 118: 681-692, 1974.
- [5] Leive, L.: *Bacterial Membranes and Walls*, Marcel Dekker, New York, pp. 413-438, 1973.
- [6] Strominger, J. L.: *Johns Hopkins Med. J.*, 133: 63-81, 1973.
- [7] Teather, R. M. et al.: *J. Bacteriol.*, 118: 407-413, 1974.
- [8] Deinema, M. H. et al.: *Arch Mikrobiol.*, 78: 42-57, 1971.
- [9] Zaar, K.: *J. Cell Biol.*, 80: 773-777, 1979.
- [10] Colvin, J. R.: *Tappi.*, 60: 59-62, 1977.
- [11] Shiveiy, J. M.: *J. Bacteriol.*, 116: 1405-1511, 1973.
- [12] Hoffman, H. P. et al.: *ibid.*, 114: 434-438, 1973.

ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATIONS ON *PSEUDOMONAS COCOVENENANS*

Xie Nianming Wang Luping Lang Shuhui

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

Zhao Naixin Ma Maisheng

(Weifang Medical College, Weifang)

Huang Wenzhe

(Beijing Children's Hospital, Beijing)

A strain of food-poisoning bacterium has been isolated by Jin Jiexiang (1963) in China from the fermented cornflour that has gone bad. This pathogenic microorganism has been identified and named *Pseudomonas* by Zhao Naixin in 1988, which is the same species as *P. cocovenenans*. The characteristics of them were conformed to these of the species *P. cepacia* of section 2 of the genus *Pseudomonas*.

In view of the fact that the fine structures of the abovementioned three strains of *Pseudomonas* have not been described yet, we decided to observe them with electron microscope. Results indicate there are many things

in common among the three strains, such as: appearing short rods, 0.6—0.8 μm in diameter by 1.5—2.0 μm in length, one polar multiflagella; non-pili, non-capsules, non-endospores; containing intranuclear inclusions (electron-dense bodies or concentric laminae bodies), accumulating intracytoplasmic PHB granules; forming filaments, minicells and bizarrecells; producing extracellular cellulose-like materials by the three strains have not been reported previously.

Key words

Pseudomonas cepacia; Minicell