

哈氏噬纤维菌生活史中形态的变化

韩文彬, 徐正学, 苏婧, 卢雪梅*, 高培基

(山东大学, 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要 【目的】研究哈氏噬纤维菌 *Cytophaga hutchinsonii* 在生活史中细胞形态的变化。【方法】利用光学显微镜、荧光显微镜和电子扫描显微镜对哈氏噬纤维菌生活状态进行详细观察。【结果】发现在饥饿状态下, 长杆状菌体开始逐渐弯曲, 菌体两端靠近成环形, 环形菌体又进一步盘绕收缩成微小球形, 微小球形体在一定条件下能像生孢噬纤维菌的小孢囊一样萌发形成长杆状菌。另外还观察到哈氏噬纤维菌特殊的类核分裂现象。【结论】首次对哈氏噬纤维形成环形菌体和类似小孢囊的微小球形体的过程进行详细描述, 为进一步揭示其形态变化与纤维素降解能力之间的关系提供依据。

关键词: 哈氏噬纤维菌; 生活史; 类核; 显微镜

中图分类号 Q939 **文献标识码**: A **文章编号** 0001-6209(2009)01-0018-05

噬纤维细菌是一类能降解纤维素的长杆状的滑动细菌, 最初被 Krzemienierska 归类为粘细菌目, 定名粘球噬纤维菌(*Cytophaga Myxococcoides*)^[1]。到1942年, Stanier 才根据其是否产生孢囊将这类细菌分为噬纤维菌(*Cytophaga*)和生孢噬纤维菌(*Sporocytophaga*)两个属^[2]。噬纤维菌属在土壤、淡水和海洋中都广泛存在, 是纤维素类多糖物质的主要降解者^[3]。其中哈氏噬纤维菌(*Cytophaga hutchinsonii*)具有极强的纤维素降解能力, 能在贫瘠的环境中迅速彻底地降解结晶纤维素, 它没有类似厌氧纤维素降解菌的纤维小体结构, 也检测不到外切纤维素酶活力和葡萄糖类水解产物^[4], 其独特的结晶纤维素降解体系至今仍是一个谜。生孢噬纤维菌具有复杂的生活史, 国内外多位学者对其孢囊形成以及其形态变化与纤维素降解的关系进行了描述和研究^[5-8]。但是对于噬纤维菌的生活史却缺乏研究。本文以噬纤维菌属的代表菌株哈氏噬纤维菌(*Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406^T)为研究对象, 利用光学显微镜、荧光显微镜和电子扫描显微镜对其

生活状态进行详细观察, 描述了其独特的多形态变化的规律, 并对其特殊的类核分裂特点进行探讨。本研究为初步揭示其形态变化与纤维素降解能力的关系提供重要依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 哈氏噬纤维菌(*Cytophaga hutchinsonii*) ATCC 33406^T 由美国威斯康辛大学 Mark J McBride 教授惠赠。

1.1.2 Stanier 微晶培养基: 每升含 1 g KNO₃, 1 g K₂HPO₄ · 3H₂O, 0.2 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.1 g CaCl₂, 0.02 g FeCl₃ · 6H₂O, 加 0.5% 的微晶纤维素, pH7.0 ~ 7.5。固体培养基加琼脂 10 g。

1.1.3 主要试剂和仪器: CMC-Na、荧光染料 Hoechst33342 购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 微晶纤维素购自德国 Merck 公司; 日本 Olympus BX51 显微镜; 日本 Nikon 公司 E600 荧光显微镜; 日本电子 JSM-6700F 场发射扫描电子显微镜。

基金项目: 国家自然科学基金(30670063); 山东省科学技术发展计划(2007GG30002020)

* 通信作者。Tel: +86-531-88364384 转 8201; Fax: +86-531-88565610; E-mail: luxuemei@sdu.edu.cn

作者简介: 韩文彬(1982-)男, 辽宁凤城人, 硕士研究生, 主要从事纤维素降解微生物的研究。E-mail: alan_han@126.com

收稿日期: 2008-05-29; 修回日期: 2008-10-03

1.2 哈氏噬纤维菌菌体纤维素内切酶(carboxymethyl cellulase, CMCase)活力的测定

取 500 μL 哈氏噬纤维菌菌体悬液与 1000 μL pH4.8 含 1% 的 CMC-Na 的醋酸缓冲液混合, 40 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min, 离心除去菌体, 用 DNS 法^[9]测上清还原糖产量。

1.3 哈氏噬纤维菌结晶紫染色光学显微镜观察

取 PY2 液体培养基中的哈氏噬纤维菌菌体, 结晶紫染色 90 s, 显微镜观察。

1.4 Hoechst33342 染色荧光显微镜观察

配成浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Hoechst33342 贮液, 放于棕色瓶中并用铝铂包好, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置。染色时染色液的终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 避光染色 60 min, 在荧光显微镜上以激发波长 355 nm 观察。

1.5 扫描电子显微镜(SEM)样品制备及观察

取不同时期菌体的培养物, 放入 2.5%(V/V)戊二醛固定 8~10 h, 酒精梯度脱水, 完全干燥的样品离子溅射喷金, 扫描电镜观察。

2 结果

2.1 哈氏噬纤维菌的生长过程中特殊的形态变化

2.1.1 光学显微镜观察

哈氏噬纤维菌在 Stanier 微晶液体培养基中, 用光学显微镜直接观测菌体形态的变化。在生长前期, 菌体呈现比较均一的长杆状, 在微晶纤维素颗粒周围聚集较多, 说明其对纤维素底物有一定的黏附能力。培养 3~4 d 后, 随着培养时间的延长, 呈球/环形的菌体逐渐增多, 培养 8~9 d 后, 则多数细菌变为球/环形。(图 1-A)。有时还

能观察到非常微小的球形颗粒, 其直径与哈氏噬纤维菌的直径相当, 大约 0.3 μm ~0.4 μm , 由于其径度接近光学显微镜的最大分辨率, 在光镜下不易观察到。图 1-B 是培养 8 d 的哈氏噬纤维菌结晶紫染色的照片, 可以清晰地看到长杆菌两头相接形成的环状菌体, 这种特殊的形态在细菌中十分罕见。哈氏噬纤维菌培养到 8~9 d 后, 绝大多数细菌均能进入环形的状态, 具有一定的规律性, 并非偶然现象。

收集一定体积的各培养阶段的哈氏噬纤维菌培养液, 离心收集菌体, 蒸馏水洗涤两次。再用蒸馏水定溶到相同体积, 测定菌体的纤维素内切酶(CMCase)活力, 结果表明, 随着杆状菌体的减少, CMCase 活力迅速降低, 以球形/环形的菌体为主时几乎检测不到 CMCase 活力。说明只有杆状菌体具有纤维素降解能力。

2.1.2 荧光显微镜观察

经过 Hoechst33342 对核物质进行染色后, 在荧光显微镜下观察, 发现环状菌体中间并非是空的, 而是有大量核物质, 因此在荧光显微镜下呈现球形的荧光斑(图 1-C)。说明哈氏噬纤维菌这种特殊的环状结构并不是菌体的简单环化, 而是由环化的菌体和中间的核酸物质一起形成的特殊结构。采用对多糖进行染色的特殊方法能将中间的成分固定并着色, 推测环形菌体是被粘多糖和核酸包裹成的球形体。

2.1.3 电子显微镜观察

为了详细观察哈氏噬纤维菌球形/环形的菌体形态, 对菌体进行了电镜观察。培养到 9 d 的哈氏噬纤维菌, 取样、固定、酒精梯度

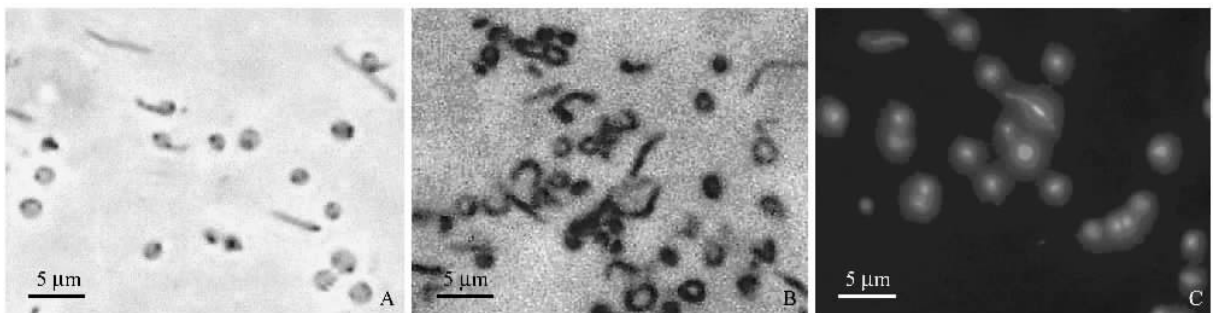


图 1 哈氏噬纤维菌球/环状态的光学显微镜观察(培养 9 d)

Fig.1 Sphere and/or ring form of *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406^T under light microscope.

A: Phase Contrast Microscope(1000 \times); B: Staining with crystal violet(1000 \times); C: Fluorescence microscope(1000 \times).

脱水后, 在扫描电子显微镜下观察, 可以观测到哈氏噬纤维菌生长过程中的多种形态, 包括长杆菌、环形菌体和微小球形体, 以及由长杆菌向环形菌体过渡和由环形菌体向微小球形体过渡的中间状态(图 2)。但是由于在电镜样品制备过程中的反复乙醇的洗涤脱水, 围绕菌体表面的多糖成分已被除去, 所以无法观测到。根据以上观察, 我们推测哈氏噬纤维

菌在培养后期饥饿状态下形态的变化过程如下: 在饥饿时, 长杆状菌体开始逐渐弯曲, 先形成月芽形, 菌体两端逐渐靠近最后闭合形成环形, 环形菌体又进一步盘绕收缩, 逐渐浓缩形成微小球形体, 微小球形体在一定条件下能像孢子一样出芽萌发, 最后又形成杆状细菌。这是首次在哈氏噬纤维菌中观测到这种特殊的菌体形态变化过程。

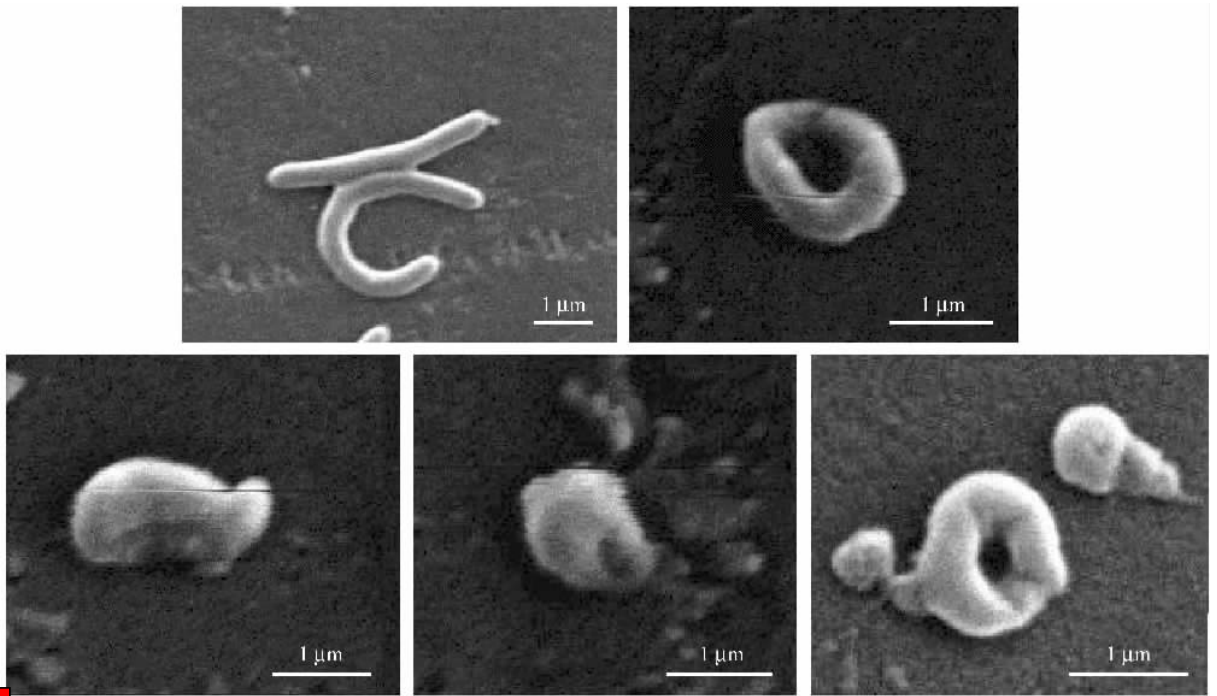


图2 扫描电镜下哈氏噬纤维菌球/环形菌和微小球形体的形成和萌发过程(20000×)

Fig.2 The formation and germination of the tiny spherical form of *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406^T under scanning electron microscope(20000×).

2.2 球/环形菌体生物活性检测

将球形/环形的哈氏噬纤维菌分别接种在 Stanier 微晶平板、Stanier 滤纸(Waterman)平板和液体培养中,发现环形菌体失去了在纤维素为培养基上生长的能力。在某些条件下,球/环形哈氏噬纤维菌又能恢复生长活力,比如添加适量的复杂营养物(0.5%酵母膏和2%蛋白胨)。新长出的菌体全部为长杆菌,其降解纤维素的性能也与原菌株完全一致。因此我们认为哈氏噬纤维菌的杆菌状态是其利用纤维素底物的有效状态,哈氏噬纤维菌在纤维素表面生长时变得更加细长的现象也支持了这一推断(图3)。另外,哈氏噬纤维菌外球/环形菌体的性质

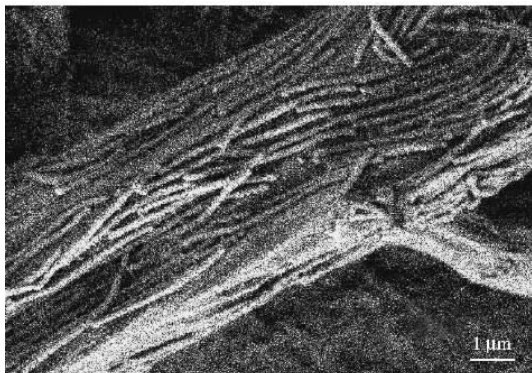


图3 生长在纤维素上的哈氏噬纤维菌形态(5000×)

Fig.3 *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406^T growing on cellulose(5000×).

与活的未培养状态的细菌非常相似^[10],在这种状态下菌体丧失了利用纤维素的能力,少量的有机物营养物能促进其恢复生长活性。

在培养后期哈氏噬纤维菌中出现一些微小的球形体,样品经多层滤纸过滤除掉长杆菌后,培养到新的培养基中,微小的球形体消失,长出大量杆菌。由于微小球体在光学显微镜下不易观察,尚无法证实生长的现象是由微小球体萌发形成,还是由培养物中个别长杆菌的生长造成的。不过我们已通过电镜观察捕捉到微小球体萌发成杆菌时的状态,从一个侧面证实微小球形体也是一种活菌的存在形式。

2.3 哈氏噬纤维菌在生长过程中类核的动态变化

对培养2d处于指数生长期的哈氏噬纤维菌的类核进行荧光染色观察,发现哈氏噬纤维菌的类核呈球形,染色明显,很多菌体存在两个类核,也有个别菌体里有3个类核或4个类核。其中3个类核的形成过程如图4所示,首先一个类核复制成两个类核(图4-a),接着两个类核逐渐分离(图4-b),然后发生分离的两个类核中的一个开始进行复制(图4-d),形成3个类核(图4-d),最后两个类核中的另一个类核也开始进行复制(图4-e)。菌体中出现4个类核是由于在已经完成类核复制但没有发生细胞分裂的菌体中,两个类核同时又发生了的第二轮复制。菌体中3个类核的出现则是由于两个类核中的一个进行了第二轮复制。

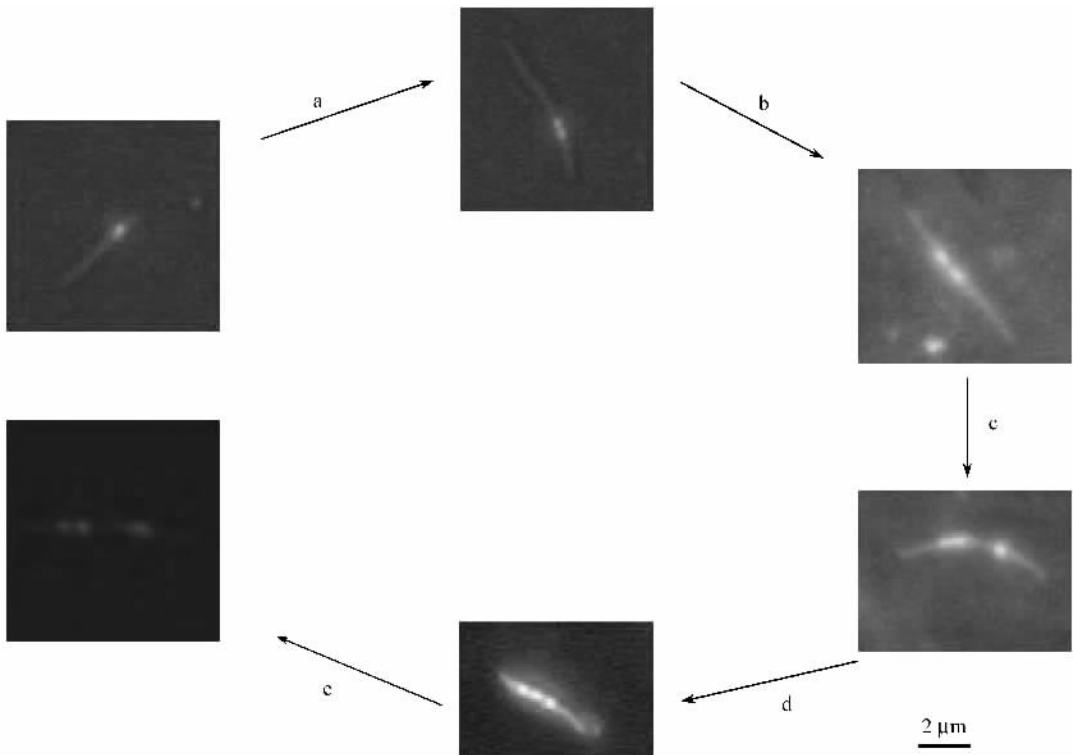


图4 哈氏噬纤维菌形成3个类核的过程

Fig.4 The formation process of the cell of *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406^T with three nucleoids.

3 讨论

细菌生长到衰亡期时常出现菌体形状和大小异常的现象,菌体呈现出多种形态或畸形,并出现自溶现象,使许多胞内的代谢产物和胞内酶向外释放,但是衰亡期细胞形态的变化往往没有一定规律,呈现多种不规则形态。而哈氏噬纤维菌在培养到8~9 d后,决大多数细胞都呈球形/环形的状态,显示出其内在的规律性。在这种状态下菌体丧失了利用纤维素的能力,少量的有机物营养物质能促进其恢复生长活性。哈氏噬纤维菌球/环形菌体的性质与活的未培养状态的细菌非常相似,因此我们推测哈氏噬纤维菌存在活的未培养状态。有研究报道某些海洋类噬纤维菌能够产生大约0.2 μm的微小菌体,并证明微小菌体仍具有重新生长的活性,可能为菌体的一种休眠状态^[11]。哈氏噬纤维菌在培养后期出现的微小球体可能也是一种休眠状态。

哈氏噬纤维菌这些新的形态变化与生孢噬纤维菌有许多形似之处。生孢噬纤维菌在培养后期能形成大量小孢囊(microcysts),然而对其孢囊的形成过程始终不甚清楚。最近国内有研究者用STM观察到在孢囊形成过程中可能存在孢囊环的中间状态,但是尚未发现从孢囊环到小孢囊的中间过程^[7]。这个现象与我们观察到的哈氏噬纤维菌的环形中间状态正好吻合。在本文的研究中,我们观察到环形菌

是通过盘绕浓缩最后形成了球形菌体,这对完善哈氏噬纤维菌的生活史,澄清生孢噬纤维菌小孢囊的形成过程都有一定的参考价值。Stanier曾根据能否产生孢囊将噬纤维菌和生孢噬纤维菌分列为两个属^[2]。我们的研究则发现噬纤维菌在一定条件下也能形成类似小孢囊的具有活性的微小球体,说明两个属间有更为密切的关系。但是噬纤维菌的微小球体与生孢噬纤维菌的小孢囊也存在明显的差别。首先,在目前的培养条件下,微小球体的形成并不普遍,其形成的条件和规律尚不清楚。而生孢噬纤维菌在培养4 d后能形成大量小孢囊。其次,微小球体的直径与长杆菌的直径相似,大约0.3 μm~0.4 μm,由于接近光学显微镜观测极限,不易观测到。而小孢囊比杆状菌体的直径要大一倍,大约为0.7 μm~1.0 μm^[7-8]。最后,小孢囊具有一定的耐热性,而我们并未发现微小球体有耐热的特点。

关于原核生物类核的复制及细胞分裂的研究主要在大肠杆菌中进行,研究发现大肠杆菌中有多种机制保证新复制形成的起始位点不重新启动复制,在一个细胞周期中染色质通常只复制一次,类核分裂后都会紧接着进行细胞分裂^[12]。所以一般情况下,一个细胞里只有1~2个类核。在快速生长的细胞中,类核的复制周期有时会出现重叠,从多个复制起始位点进行复制,有时会出现4个类核的现象^[13],但是在自然状态下尚未见有关出现3个类核

的报道。哈氏噬纤维菌在指数期生长状态下出现 3 个类核的现象, 到底是因为个别菌体的突变, 还是因为其细胞分裂中两个类核的第二轮复制存在一定的不同步性, 还有待进一步的研究证实。总之, 哈氏噬纤维菌菌体细胞细长, 在指数分裂期类核浓缩成球形, 比较容易进行观测, 是研究类核复制以及筛选抑制核酸复制的药物的理想试验材料。

参考文献

- [1] Krzemieniewska H. Le Cycle évolutif de Spirochaeta Cytophaga Hutchinson et Clayton. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 1930, 7 : 507 - 519.
- [2] Stanier RY. The cytophaga group : a contribution to the biology of Myxobacteria. *Bacteriological Reviews*, 1942, 6 : 143.
- [3] Phraeus G. Studies in the cellulose decomposition by *Cytophaga*. *Symbolae Botanicae Upsalienses*, 1947, IX : 2.
- [4] Chang WT, Thayer DW. The cellulase system of a *Cytophaga* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 1977, 23(9) : 1285 - 1292.
- [5] Grace JB. The life cycle of Sporocytophaga. *Journal of General Microbiology*, 1951, 5 : 519 - 524.
- [6] 刘东波, 张影, 陈珊, 等. 生孢噬纤维细菌的滤纸纤维素的降解过程研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)* 2003, 43(6) : 776 - 780.
- [7] 王禄山, 高培基, 时东霞, 等. 生孢噬纤维粘菌生活史的新阶段. *中国科技论文在线* (<http://www.paper.edu.cn/>) 2005 年 12 月 15 日.
- [8] 齐飞, 张颖舒, 高培基. 生孢噬纤维细菌的分离纯化和鉴定. *山东大学学报(Journal of Shandong University)*, 1999, 34 : 484 - 487.
- [9] 尹建雄, 卢红, 谢强, 等. 3,5-二硝基水杨酸比色法快速测定烟草水溶性总糖、还原糖及淀粉的探讨. *云南农业大学学报(Journal of Yunnan Agricultural University)* 2007, 22 : 829 - 833.
- [10] 徐怀恕, 黄备, 祁自忠, 等. 霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)的细胞形态研究——活的非可培养状态细胞. *青岛海洋大学学报(Journal of Qingdao Ocean University)*, 1997, 2 : 187 - 190.
- [11] Hosam EE, Sato M, Naganuma T. Viable *Cytophaga*-like Bacterium in the 0.2 μ m-Filtrate Seawater. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, 24(4) : 618 - 622.
- [12] Boye E, Lobner-Olesen A, Skarstad K. Limiting DNA replication to once and only once. *EMBO Reports*, 2000, 1 : 479 - 483.
- [13] Skarstad K, Boye E, Steen HB. Timing of initiation of chromosome replication in individual *Escherichia coli* cells. *The EMBO Journal*, 1986, 5 : 1711 - 1717.

Morphologic changes in the life cycle of *Cytophaga hutchinsonii*

Wenbin Han, Zhengxue Xu, Jing Su, Xuemei Lu*, Peiji Gao

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract [**Objective**] To study the morphological changes of *Cytophaga hutchinsonii* cell during its life circle. [**Methods**] *Cytophaga hutchinsonii* cell was observed under light microscope, fluorescence microscope and scanning electron microscope. The nucleoids in the cell were stained with fluorescent dye Hoechst33342 and examined by fluorescence microscopy. [**Results**] We discovered that under starvation conditions, the long, flexible rod cell of *Cytophaga hutchinsonii* would bend and turn into circular cell. The circular cell failed to produce carboxymethyl cellulase. Some of the circular cells might further wind around and turn into tiny spherical cells. The tiny spherical cell similar to the microcyst of sporocytophaga could germ into long flexible rods again under certain circumstances. When growing cultures to logarithmic phase of cell growth, *Cytophaga hutchinsonii* cell with three nucleoids in it was occasionally observed, which indicated that the two strands of DNA might act differently in the initiation of DNA replication. [**Conclusion**] This is the first detailed description of the formation process of circular cell and tiny spherical cell in the life circle of *Cytophaga hutchinsonii*. The result will help to further reveal the relation between morphologic change and cellulose degradation ability of the strain.

Keywords : *Cytophaga hutchinsonii* ; life cycle ; nucleoid ; microscope

(本文责编 : 王晋芳)