

幽门螺杆菌形态变化及生长特性 ——一种改良布氏肉汤的作用

何 瑶¹, 胡品津¹, 贾宗剑²

(1. 中山医科大学附属第一医院消化内科, 广东 广州 510080; 2. 中山大学生命科学院, 广东 广州 510275)

摘要:【目的】观察幽门螺杆菌形态变化及生长特性;探讨改良布氏肉汤对幽门螺杆菌的作用。【方法】光镜下观察冻存及培养于哥伦比亚平板上的菌株在暴露于空气中不同时间段的形态变化;在暴露于空气后不同的时间段将菌株分别经改良布氏肉汤及哥伦比亚平板进行传代培养。【结果】暴露于空气中冻存菌株 0.7 h 后失去生长能力, 0.8 h 开始出现球形菌, 66.5 h 全部球形样变;平板上菌株于 1.9 h 开始出现球形菌, 8.2 h 后失去生长能力, 33.2 h 全部球形样变, 84.3 h 后完全失去尿素酶活性;采用改良布氏肉汤, 冻存菌株冻融后 22.4 h 及平板上菌株暴露于空气后 56.4 h 仍能复苏生长;球形样变细菌经改良布氏肉汤培养后, 部分细菌重新恢复弧状或 S 形。【结论】改良布氏肉汤培养基能使发生球形样变的幽门螺杆菌重新生长。

关键词: 螺杆菌, 幽门/生长和发育; 培养基, 条件性

中图分类号: Q 93-335; R 37 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)03-0202-03

Morphological Transformation and Growing Character of *Helicobacter Pylori* ——Role of an improved broth medium

HE Yao¹, HU Pin-jin¹, JIA Zhong-jian²

(1. Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China;

2. Department of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract:【Objective】Observing morphological changes and growing characters of *Helicobacter pylori* (Hp); Studying the role of an improved broth medium in Hp growth. 【Methods】Frozen and plate-cultured Hp strains were exposed to air, and then were observed for morphological changes under light microscope and growing characters at different exposure time. Culturing the Hp strains which had already been exposed to air for a different time with the improved broth medium and Columbia plate respectively.【Result】When exposed to air, frozen strains were observed losing their growing capacity on Columbia plate in 0.7 hour, beginning to change into coccal shape in 0.8 hour, and completely transforming into coccal form in 66.5 hours. As to the Hp strains cultured on Columbia plate, they were observed beginning to change into coccal shape in 1.9 hour, losing growing capacity on Columbia plate in 8.2 hours, completely transforming into coccal form in 33.2 hours, and wholly losing urease activity in 84.3 hours. Cultured with the improved broth medium, the frozen and plate-cultured strains could be revived after exposed to air for 22.4 and 56.4 hours respectively. A portion of coccal form bacteria could be reverted to spiral or “S” shape after cultured with the improved broth medium. 【Conclusion】The improved broth medium could revive *Helicobacter pylori* from its transformed coccal form.

Key words: *Helicobacter pylori*/growth & development; cultured media, conditioned

幽门螺杆菌(Hp)是一种革兰氏染色阴性、光镜下常呈弧形或 S 形的细菌。它在各种含琼脂的培养基上于微需氧、适当湿度、37℃环境时能稳定而缓慢地生长, 通常需要 3~5 d 甚至更长时间才能

形成针尖样半透明的小菌落。当培养时间过长或暴露于空气中一定时间后, 它可变为球形, 同时丧失尿素酶活性及传代后的生长能力, 而被认为是“衰老”的细菌^[1]。临床及科研中常因胃活检标本

收稿日期: 2000-02-03

作者简介: 何 瑶(1967-), 女, 广东广州人, 博士生, 主治医师。

©1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

运送过程耗时过长,而不能培养出幽门螺杆菌,冻存菌株冻融时间过长而不能获得复苏。一种改良的布氏肉汤培养基被认为可使幽门螺杆菌快速生长,并能使发生球形样变后的细菌重新恢复弧状及尿素酶活性^[2]。本研究观察冻存的幽门螺杆菌和哥伦比亚平板上的幽门螺杆菌暴露于空气中不同时间后的形态变化、尿素酶活性及传代后生长特性,并采用该改良布氏肉汤对发生球形样变、丧失尿素酶活性及在哥伦比亚培养平板上传代生长特性的菌株进行“再生培养”,期望能发现一种对临床及科研有帮助的培养基。

1 材料与方 法

1.1 初步实验

冻存(以含 300 mL/L 甘油的心脑浸液保存于一80 °C冰箱中半年)和培养于哥伦比亚平板上的幽门螺杆菌各 6 株,均自然暴露于空气中。分别于不同的时间段(0、10、20、30、40、60 min 及 2、3、4、6、8、10、14、18、26、34、48、60、72 h)对各株菌进行革兰氏染色,于光镜下观察其形态变化,以尿素酶试验检测其尿素酶活性,并将其转种于哥伦比亚平板培养,观察培养结果。

1.2 改良布氏肉汤配制

25 g/L 胰蛋白胨, 7.5 g/L 酵母浸出物, 0.4 μmol/L CuSO₄, 0.35 μmol/L ZnSO₄, 0.36 μmol/L FeSO₄, 0.24 μmol/L MnSO₄, 20 mmol/L Tris base (pH8.5)。上述混合液经高压高温灭菌后加入 5 μL 无菌过滤的 1 mol/L MgCl₂。冷却后置于 4 °C 冰箱保存。使用前临时加入 10 mL/L 的红细胞溶解产物和 20 mL/L 的胎牛血清。并于幽门螺杆菌培养条件下(微需氧、37 °C)平衡 12 h。

红细胞溶解产物的配制:采集经 ELISA 检测为幽门螺杆菌阴性的健康人全血(枸橼酸抗凝),以 5 000 r/min,半径 86 mm 离心 10 min,弃上清,沉淀以生理盐水洗涤 2 次,以 2 倍体积的灭菌蒸馏水溶解,以 20 000 r/min,半径 86 mm 离心 15 min,保留上清,并以 0.22 μm 大小孔径的滤器过滤,用屈光计测定蛋白浓度,调整蛋白浓度至 80 g/L,于一20 °C 冰箱保存。

1.3 改良布氏肉汤培养

选用与初步实验时相同的冻存及培养于哥伦比亚平板上的幽门螺杆菌各 5 株,根据初步实验结果,在菌株暴露于空气后不同的时间段(40 min、1、

5、10、15、24 h 及 2、3、4、5、6 d)将其转种于改良布氏肉汤中培养,同时观察经改良布氏肉汤培养后的幽门螺杆菌形态。改良布氏肉汤培养的具体方法如下:冻存及平板上细菌以 PBS 缓冲液洗涤 2 次,将洗涤后细菌重悬于 2 mL 改良布氏肉汤培养液中(使用 6 孔培养板),盖上盖子以防污染。将上述培养板置于密闭产气袋中(能产生 H₂ 及 CO₂ 的混合气体,形成幽门螺杆菌生长所需的微需氧环境),于 37 °C 摇床中(转速为 150 r/min)培养 8 h。将上述培养后产物 200 μL 转种于哥伦比亚培养平板上,适当条件培养 3~5 d,观察结果。

2 结 果

当暴露于空气中时,冻存菌株能于哥伦比亚平板上获得复苏的最长暴露时间为 0.7 h,而于改良布氏肉汤中能复苏生长的最长时间则为 22.4 h,两者相比差异有显著性($P < 0.01$);对于平板上培养菌株而言,两者分别为 8.2 和 56.4 h,差异亦有显著性($P < 0.05$)。见表 1~3。

表 1 冻存菌株形态变化及传代生长能力
Table 1 Morphological change and growing capacity of frozen strains t/h

Strain	Bacteria beginning	All bacteria	Losing growing
	to transform into coccal form	transforming into coccal form	capacity on plate
1	0.7	60	0.7
2	0.7	65	0.7
3	0.7	70	0.7
4	0.8	70	0.7
5	0.8	72	0.7
6	1	72	0.7
\bar{x}	0.8	66.5	0.7

表 2 平板上菌株形态变化、传代生长能力及尿素酶活性
Table 2 Morphological change, growing capacity and urease activity of plate-cultured strains t/h

Strain	Bacteria begin-	All bacteria	Losing growing	Losing
	ning to trans- form into coc- cal form	transforming into coccal form	capacity on plate	urease activity
1	1.7	29	5	72
2	1.7	32	7	78
3	1.7	32	7	84
4	2	34	9	84
5	2	36	10	92
6	2	36	11	96
\bar{x}	1.9	33.2	8.2	84.3

表3 改良布氏肉汤作用下菌株暴露于空气后能传代生长的最长时间

Tabl 3 The longest time for bacteria still being able to grow in the improved broth medium after exposed to air

Strain	t/h	
	Frozen strains	Plate-cultured strains
1	24	24
2	15	48
3	15	144
4	48	48
5	10	18
\bar{x}	22.4	56.4

经改良布氏肉汤培养后的幽门螺杆菌进行革兰氏染色后于光镜下观察,可见到大部份细菌呈弧状或S形。

3 讨论

幽门螺杆菌可引起胃炎及消化性溃疡,并使消化性溃疡复发率显著增加,而越来越多的证据表明其与胃癌的发生亦密切相关^[3]。要对幽门螺杆菌进行致病机制、耐药性监测等方面广泛深入的研究,必须能成功分离培养、保存、复苏及运送幽门螺杆菌,因此,适宜的培养条件是十分重要的。已报道幽门螺杆菌能生长于各种营养丰富的培养基中,如布氏肉汤、心脑浸液、MH肉汤、哥伦比亚等培养基^{4,5},但报道的多为新鲜分离、传代或复苏后立即传代的菌株,而对“衰老”细菌^[1]的作用如何,报道不多。

本实验观察到,当暴露于空气中,冻存和平板上菌株形态变化均为:弧状或S形、短棒状、球形,并失去了在哥伦比亚平板上生长的能力及尿素酶活性。在平板上菌株尚可见到细菌破裂溶解现象。细菌这种生长能力的丧失可能由于细菌“衰老”^[1]或死亡而引起。观察到的冻存菌株在发生冻融后短时间内即失去复苏生长能力,而此时细菌基本仍保持球形的现象,这可能与保存液中含有甘油,张力大,因而对菌体可能具有“固定”作用有关。

改良布氏肉汤能成功地将已失去尿素酶活性、发生球形样变、且失去于哥伦比亚平板上复苏或传代生长能力的菌株回复为弧状或S形菌,并能重新

于哥伦比亚平板上生长。Andersen等发现^[2]改良布氏肉汤中的各种阳离子,尤其是镁离子对幽门螺杆菌生长是必需的,红细胞溶解产物则能提供更适宜的幽门螺杆菌生长条件。本实验测定经平衡后的改良布氏肉汤的pH值为8.46,而Andersen等报道^[2]幽门螺杆菌在该培养基中生长时,可不断自行调节pH值使其维持在较稳定的8.5左右,适宜的pH值可能亦为幽门螺杆菌能获得“复苏”的原因之一。

对临床上采用幽门螺杆菌根除治疗后,复查细菌已阴性,但一段时间后又可发生同一菌株的“再感染”的现象,或许可认为是幽门螺杆菌在药物作用下发生球形样变逃避了药物的杀灭作用,当条件适宜时,则重新恢复弧状并生长,因而是“复发”而不是“再感染”。本实验发现球形幽门螺杆菌在适当条件下仍能回复弧状或S形,并重新获得生长能力的现象在一定程度上反映了这种可能性。

某些学者认为胃癌患者中幽门螺杆菌分离率较胃炎及消化性溃疡低的原因可能与癌变组织和附近组织中定植的细菌发生球形样变有关,在该种情况下尝试以改良布氏肉汤进行分离培养可能会有所帮助。

参考文献:

- [1] Jervis R C. Helicobacter. In: Murray P R, Baron E J, Pfaller M A, et al. Manual of clinical microbiology[M]. 6th ed., Washington: ASM Press 1995. 492~498.
- [2] Andersen A P, Elliott D A, Lawson M, et al. Growth and morphological transformations of Helicobacter pylori in broth media[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(11): 2918.
- [3] Parsonnet J, Friedman G D, Daniel M S, et al. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma[J]. N Engl J Med, 1991, 325(16): 1127.
- [4] Walsh E J, Moran A P. Influence of medium composition on the growth and antigen expression of Helicobacter pylori[J]. J Appl Microbiol, 1997, 83(1): 67.
- [5] Shahamat M, Mai U E H, Paszko-Kolva C, et al. Evaluation of liquid media for growth of Helicobacter pylori[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(12): 2835.

(编辑 黄小延)