

## 蜜蜂螺原体南京分离株 M10 形态的多样性

阮康勤<sup>1</sup>, 于汉寿<sup>1,2\*</sup>, 张晶<sup>2</sup>, 纪燕玲<sup>1</sup>, 王志伟<sup>1</sup>, 陈永萱<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 2. 南京农业大学生物学实验中心, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 为进一步了解蜜蜂螺原体的生长、生殖及致病特点, 以分离自患“爬蜂病”蜜蜂体内的螺原体菌株 M10 为研究对象, 测定了其生长曲线, 利用透射电镜观察其不同生长期的形态。结果表明: 在 R-2 培养基中, 不同生长期的蜜蜂螺原体 M10 形态差异很大, 但其形态变化又具有一定的规律性。延滞期的 M10 以粗短的形态为主; 在对数期和稳定期, M10 具有丰富的形态多样性, 如芽状、分支状、串珠状等; 到达衰亡期, M10 则变得细长, 菌体自身及菌体之间极易缠绕并聚集成团。此外, 观察到 M10 具有尖端结构和纤毛状结构, 大多数菌体具有“一尖一圆”结构, 纤毛状结构长度差异显著。本研究首次描述了不同生长期蜜蜂螺原体的形态变化, 发现螺原体纤毛状结构最长可达 1 860.5 nm, 并首次在人工培养基中发现螺原体具有类似纤毛接合现象。

**关键词:** 螺原体; 生长曲线; 形态多样性; 尖端结构; 纤毛状结构

中图分类号: Q939.34 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030(2007)03-0058-05

## Morphological polymorphy of spiroplasmas isolated from honeybee in Nanjing

RUAN Kang-qin<sup>1</sup>, YU Han-shou<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Jing<sup>2</sup>, JI Yan-ling<sup>1</sup>, WANG Zhi-wei<sup>1</sup>, CHEN Yong-xuan<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture,  
2. Life Science Laboratory Center, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** To clarify spiroplasmas growth, division and pathogenicity, the growth curve of spiroplasmas isolated from honeybee infected by spiroplasma M10 was determined and the morphology of different growth stages were observed by transmission electron microscopy with negative-staining method. The result showed that abundantly polymorphic forms of M10 were observed in liquid culture medium R-2 with aging. M10 appeared wide and short during the lag phase. During the exponential and stationary phases, M10 showed abundant polymorphy such as bud-shaped, branched, bead-like, while became long and congregated in the death phase. Additionally, the tip structures and pili-like structures were also examined, most helices possessed one tip structure and one blunt end. The length of pili-like structures varied significantly and the longest was 1 860.5 nm. For the first time, the morphological polymorphy of spiroplasmas isolated from honeybee on all growth stages were studied, and the phenomenon of conjugating like between two microbes *in vitro* was existed.

**Key words:** spiroplasma; growth curve; morphological polymorphy; tip structures; pili-like structures

螺原体 (spiroplasma) 是一种螺旋状、无细胞壁, 能独立生活和自我复制的最简单的一类原核生物, 它的基因组非常小 (780~2 220 kb)<sup>[1]</sup>。螺原体没有细胞壁和鞭毛, 仅靠单层膜包裹整个细胞, 常作为研究运动的模式生物<sup>[2-3]</sup>。目前发现的螺原体有 34 个血清组, 其中血清组 I 有 9 个亚组, 血清组 VIII 和 XVI 各有 3 个亚组, 但仅 36 个种给予拉丁名并被详细描述<sup>[4]</sup>。螺原体主要存在于昆虫体内、植物体内和植物花表面, 它和宿主的关系可分为共生、致病和互生 3 种<sup>[4]</sup>。1976 年, 在美国 Maryland 州首次发现由意蜂螺原体 (*Spiroplasma melliferum*) 引起的一种蜜蜂病害——螺原体死亡病 (spiroplasmosis); 此后, 在法国发现引起蜜蜂“五月病” (May disease) 的蜜蜂螺原体 *S. apis*, 这两种病害给蜜蜂养殖造成较大的损失<sup>[5-6]</sup>。

国内陈永萱等<sup>[7]</sup>于 1988 年首次从患“爬蜂病”的蜜蜂体内分离到螺原体, 并对其基本生物学性状

收稿日期: 2006-10-16

基金项目: 南京农业大学引进人才基金项目 (804052)

作者简介: 阮康勤, 硕士研究生。\* 通讯作者: 于汉寿, 副教授, 从事植物微生物研究, E-mail: yuhans@njau.edu.cn,

Tel: 025-84395531。

及血清学特性作了详细的研究，初步鉴定为第1血清组第2亚组成员，并通过微量注射法证明从蜜蜂体内分离的螺原体对蜜蜂高度致病<sup>[8]</sup>；董桂林等<sup>[9]</sup>利用淋巴细胞杂交瘤单抗技术获得蜜蜂螺原体单克隆抗体，从而提高ELISA法检测螺原体的灵敏度和特异性；郭永红等<sup>[10]</sup>发现红霉素、四环素、土霉素对蜜蜂螺原体有较强的生长抑制和致死作用。

由于螺原体属于特殊的微生物资源，个体极小，无法用普通光学显微镜进行观察，且螺原体对营养要求苛刻，分离培养较一般细菌困难，故国内对蜜蜂螺原体研究停留于生物学特性及血清学特性阶段，形态学研究几乎空白。虽然国外有关螺原体形态多样性的报道较多，但主要集中在玉米螺原体 (*S. kunkelii*) 及柑桔螺原体 (*S. citri*)，对蜜蜂螺原体的形态多样性研究很少，而且在培养过程中螺原体形态变化的相关报道也较少。本研究以从患“爬蜂病”蜜蜂体内分离得到的螺原体菌株 M10 为研究对象，利用透射电镜观察处于不同生长期的螺原体的形态，为进一步了解其生长和生殖的基本规律及其致病特点提供重要的依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 蜜蜂螺原体的分离及纯化

分离所用培养基是由 C-3G 简化后的 R-2 培养基<sup>[7]</sup>。主要成分是 PPLO broth (1.5%，Difco 公司)、胎牛血清 (体积分数 15%)、蔗糖 ( $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和酚红，pH 7.2~7.4。

从蜂箱前采集不能飞翔、只能爬行的蜜蜂进行分离。整个蜜蜂用  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  次氯酸钠表面消毒 3~5 min，再用无菌水洗涤 4 次，用无菌的镊子将蜜蜂从腹部扯开，取出内脏，在 5 mL 的 R-2 培养基内碾碎，并浸泡 3 min；用孔径  $0.45 \mu\text{m}$  的微孔滤膜加压过滤；取 0.5 mL 滤液置于含 1.5 mL 新鲜培养基的指形管中，于 30 °C 静置培养；逐日观察培养基颜色变化，并用暗视野显微镜 (Olympus BH-2 型) 观察验证<sup>[7]</sup>。用梯度稀释法对分离菌株进行纯化<sup>[4]</sup>。

### 1.2 蜜蜂螺原体的计数及生长曲线的测定

螺原体的计数采用直接计数法。取  $5 \mu\text{L}$  菌液于载玻片上，小心盖上  $18 \text{ mm} \times 18 \text{ mm}$  的盖玻片，用暗视野显微镜在 1 500 倍下直接计算螺原体的数目。1 500 倍下每个视野的实际面积为  $0.0154 \text{ mm}^2$ ，盖玻片面积为  $324 \text{ mm}^2$ 。因此每毫升菌液中所含的螺原体数为：每一视野的螺原体数目乘以常数  $4.21 \times 10^6$  ( $324/0.0154/0.005$ )。计数时，若菌体过多或成团，可事先做一定程度的稀释或振荡使菌体散开。每视野内的菌体数取随机 5~10 个视野内菌体的平均数。

取 2 mL 新鲜培养基置于指形管中，接种生长 36~48 h 的培养菌液，使接种后的螺原体为 1 个菌体/视野，30 °C 培养；每 12 h 取出  $5 \mu\text{L}$  检查活动菌体数，连续检查 3~4 d。每次 3 个重复。

### 1.3 蜜蜂螺原体的形态观察

取 0.5 mL 处于不同生长期的螺原体培养液，用等体积  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  戊二醛 (内含  $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液，pH 7.3~7.5) 固定，于 4 °C 静置 1~3 d；吸 1 滴固定后液体置于铜网上，静置 2 min；用滤纸吸干溶液，用  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  磷钨酸钠溶液 (pH 7.0) 染色 40 s，再用滤纸吸干，风干后用透射电子显微镜 (南京农业大学生命科学实验中心天美电镜技术合作示范实验室，Hitachi H7650 型) 观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 蜜蜂螺原体的分离及纯化

4 至 5 月间，常有蜜蜂在蜂箱前不能飞翔，只能爬行，翅膀微卷并下垂，呈现严重的病态，不久就会死亡。有病态的蜜蜂中大多能分离出螺原体，分离率高达 85%。将其中一个分离物 M10 作为研究对象，用梯度稀释法进行纯化。

### 2.2 螺原体 M10 的培养

M10 在 R-2 培养基中的生长明显地分为 4 个生长期：接种 12 h 内，菌体数量无明显增加，为延滞期；12 h 后，菌量呈直线上升，为对数期；48 h 后达到生长高峰，并可维持 24 h，为稳定期；72 h 后，死亡菌体数迅速增加，到达衰亡期 (图 1)。

### 2.3 不同生长期螺原体 M10 的形态多样性

M10 在延滞期菌体形态较为粗短, 菌体长度为  $1.85 \sim 5.12 \mu\text{m}$  (平均  $(3.56 \pm 1.50) \mu\text{m}$ ), 直径为  $57.0 \sim 148.1 \text{ nm}$  (平均  $(126.2 \pm 35.7) \text{ nm}$ ), 以 2~3 个螺旋居多, 不规则形态较少 (图 2)。

对数期, M10 菌体仍较为粗短, 菌体长度为  $2.50 \sim 4.88 \mu\text{m}$  (平均  $(3.81 \pm 0.85) \mu\text{m}$ ), 直径为  $78.1 \sim 370.4 \text{ nm}$  (平均  $(195.6 \pm 53.3) \text{ nm}$ ), 多样性显著, 主要有芽状、分支状、串珠状, 菌体末端及中间有大小不一的球状突起 (图 3)。

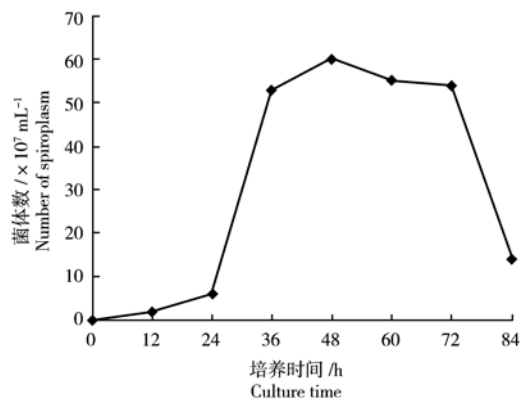


图 1 M10 在 R-2 培养基中的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of M10 in R-2 medium

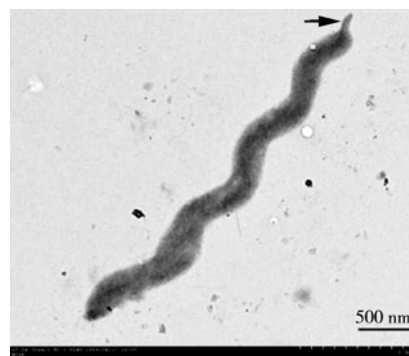


图 2 M10 在延滞期的负染透射电镜照片

Fig. 2 Electron micrographs of M10 in the lag phase

箭头示螺原体的尖端结构 Note the tip structure (arrow)

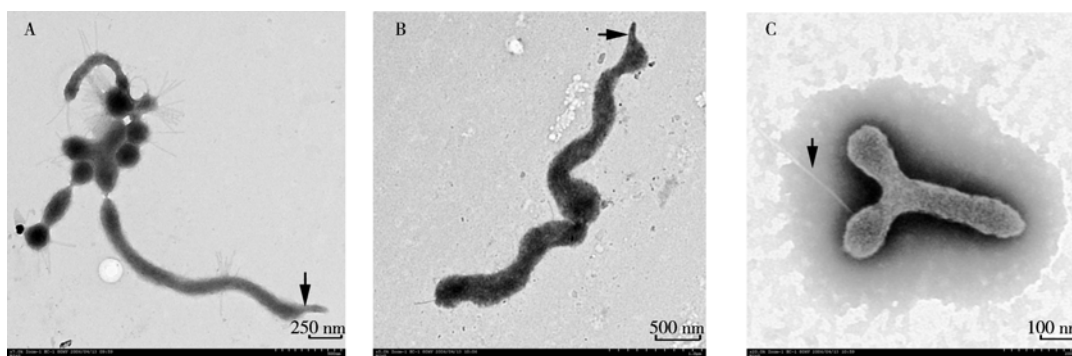


图 3 M10 在对数期的负染透射电镜照片

Fig. 3 Electron micrographs of M10 in the exponential phase

A: 顶端及中部的球状突起; B: 分支状结构; C: 芽状结构。箭头表示尖端结构, 无尾箭头表示纤毛状结构。

Showing various morphologies including globular parts of the helix (A), branched (B), budded structures (C). Note the tip structure (arrows) and pili-like structure (arrowheads).

到达稳定期后, 菌体逐渐变长, 菌体长度为  $0.89 \sim 10.92 \mu\text{m}$  (平均  $(5.38 \pm 2.67) \mu\text{m}$ ), 直径为  $62.5 \sim 307.7 \text{ nm}$  (平均  $(191.9 \pm 72.5) \text{ nm}$ ), 螺旋数显著增加, 形态多样性同对数期, 串珠状、分支状及球状突起等结构较多 (图 4)。

进入衰亡期, 菌体变得极其细长, 菌体长度为  $2.27 \sim 11.88 \mu\text{m}$  (平均  $(6.14 \pm 2.75) \mu\text{m}$ ), 直径为  $37.0 \sim 162.8 \text{ nm}$  (平均  $(86.8 \pm 30.4) \text{ nm}$ ), 形态多样性减弱, 菌体自身及菌体之间极易缠绕, 并聚集成团 (图 5)。

### 2.4 螺原体的尖端结构及圆端结构

大多数 M10 具有 1 个不同于菌体其他部位的尖端结构和圆端结构, 少数菌体具有 2 个圆端结构 (图 2 至图 4), 尖端结构长  $109.4 \sim 250.0 \text{ nm}$  (平均为  $(184.1 \pm 41.4) \text{ nm}$ ), 最宽处直径为  $55.6 \sim 156.3 \text{ nm}$  (平均为  $(86.0 \pm 27.7) \text{ nm}$ ); 圆端结构长  $120.4 \sim 593.8 \text{ nm}$  (平均为  $(373.2 \pm 151.2) \text{ nm}$ ), 最宽处直径为  $92.6 \sim 463.0 \text{ nm}$  (平均为  $(284.3 \pm 112.8) \text{ nm}$ )。

### 2.5 螺原体的纤毛状结构

利用透射电镜能观察到大多数 M10 具有纤毛状结构, 该结构可着生于螺原体表面的任何位置, 包括尖端结构、圆端结构及芽状结构, 多数纤毛细且直, 长度差异显著 (图 3 至图 5), 在  $93.8 \sim 1860.5$

nm 之间变化, 直径为 7.4 ~ 9.4 nm, 在 2 个菌体之间偶尔发现有类似纤毛接合现象 (图 5 - C)。

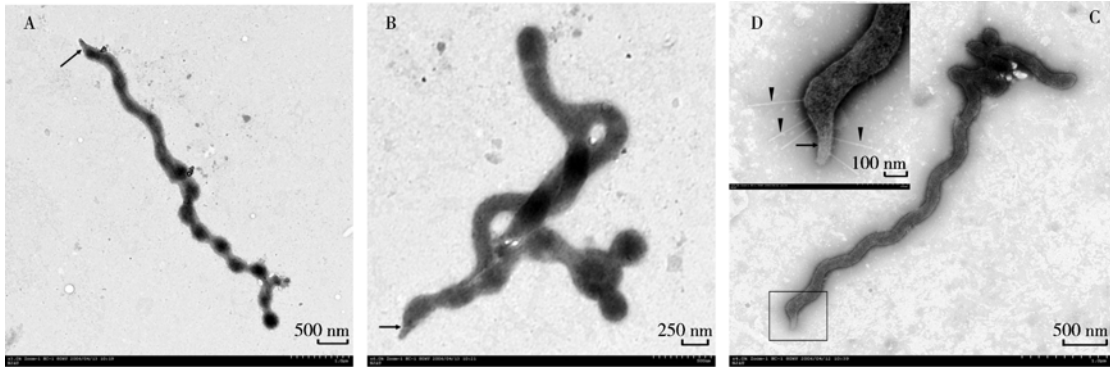


图 4 稳定期的 M10 负染电镜照片

Fig. 4 Electron micrographs of M10 in the stationary phase

A: 串珠状结构; B: 缠绕的分支状结构, 末端有球形突起; C: 顶端缠绕的螺旋形态及其尖端结构的局部放大 (D)。箭头表示尖端结构, 无尾箭头表示纤毛结构。

Possessing various morphologies including bead-like (A), branched (B) and helical (C) forms. Inset (at higher magnification): tip structure (D). Note the tip structure (arrows) and pili-like structure (arrowheads) of M10.

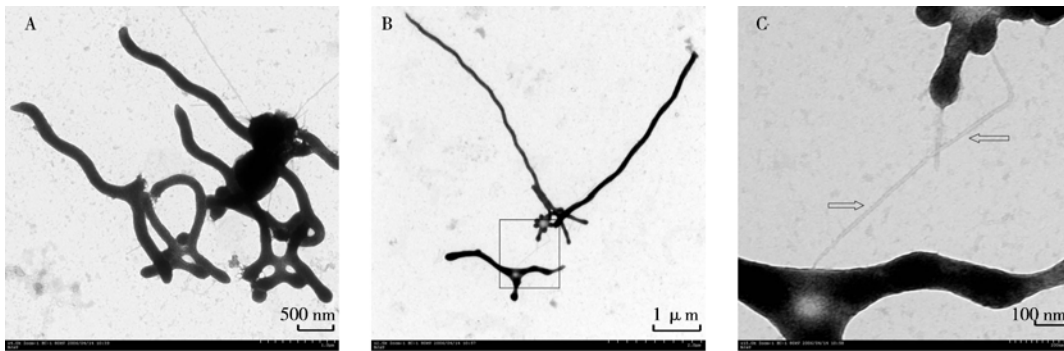


图 5 螺原体衰亡期的负染电镜照片

Fig. 5 Electron micrographs of M10 in the decline phase

A: 多个菌体相互缠绕; B: 不同菌体之间的纤毛发生接合及其局部放大 (C)。空心箭头表示发生类似接合现象的两根纤毛。

Presenting congregating morphologies (A). Note pili appearing to conjugate between two spiroplasmas (B) and the higher magnification of conjugating-like position (C, hollow arrows).

### 3 讨论

本研究选择南京前湖附近蜂群的螺原体分离物 M10 进行试验, 第 1 次系统研究了不同生长期蜜蜂螺原体的形态变化, 详细描述了蜜蜂螺原体的特殊结构, 并首次在人工培养基中发现螺原体具有纤毛接合现象。根据形态学、生物学特性及 16S rDNA 分析 (GenBank 序列号: DQ452377), 初步鉴定菌株 M10 为 *Spiroplasma melliferum*, 属于第 1 血清组第 2 亚组。通过饲喂菌液等途径发现 M10 对意大利蜂 (*Apis mellifera*) 具有较强的致病性 (另文发表)。

本研究发现 M10 在培养过程中具有丰富的多样性, 但其形态变化又具有一定的规律性, 原因除螺原体缺乏细胞壁以外, 在对数期和稳定期, 螺原体增殖迅速, 芽状、分支状、球状突起、串珠状可能都与螺原体的多种生殖方式有关<sup>[11]</sup>; 进入衰亡期, 营养物质的缺乏及 pH 的下降开始抑制螺原体的生长, 菌体变得细长, 从而易聚集成团<sup>[12]</sup>。

本研究中, 大多数蜜蜂螺原体 M10 具有尖端结构, 呈“一尖一圆”状, 具有 2 个圆端结构的较少, 这与 Garnier 等<sup>[11]</sup>的研究结果一致。螺原体 M10 是蜜蜂的病原菌, 尖端结构可能与螺原体侵入宿主细胞以及在宿主细胞中的定位有关。在感染 *S. kunkelii* 的叶蝉的中肠组织中, *S. kunkelii* 的尖端结构通常垂直于上皮细胞的质膜, 并能迫使质膜向内形成杯形凹陷, 甚至能穿透中肠上皮细胞的致密板<sup>[13-14]</sup>。螺原体 M10 的尖端结构与致病性的关系还需对感染螺原体的病蜂作进一步的病理学研究证明。

本研究发现蜜蜂螺原体 M10 也具有纤毛状结构, 并具有类似纤毛接合现象。这些纤毛状结构类似于细菌的 IV 型纤毛, 在细菌的扭曲运动及对宿主细胞的侵染并导致病变的过程中, IV 型纤毛都起着一定作用<sup>[15]</sup>, 除此之外, 它还与原核生物的基因重组作用(转化、接合、转导)相关<sup>[16]</sup>。

有关螺原体尖端结构及纤毛状结构的本质及其功能方面的结论还有赖于分子生物学方面的详细研究。目前, 柔膜菌纲的基因组测序工作正在进行, 而 *S. kunkelii* 的测序工作已接近尾声 (<http://www.genome.ou.edu/spiro.html>), 这无疑会大大加快人们对编码相关基因寻找, 从而从基因角度去解决相关问题<sup>[4]</sup>。

(致谢: 在螺原体的分离培养方面, 得到南京师范大学顾伟老师的热情帮助; 在电镜样品的制作及照片的拍摄过程中, 得到了南京农业大学生命科学实验中心胡冰老师的大量帮助, 在此表示真诚的感谢! 感谢以张晶、周秀文为首的 SRT 项目小组的热情帮助!)

#### 参考文献:

- [1] Carle P, Laigret F, Tully J G, et al. Heterogeneity of genome sizes within the genus *Spiroplasma* [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45: 178-181
- [2] Trachtenberg S. Shaping and moving a *Spiroplasma* [J]. J Microbiol Biotechnol, 2004, 7: 78-87
- [3] Shaevitz J M, Lee J Y, Fletcher D A. *Spiroplasma* swim by a processive change in body helicity [J]. Cell, 2005, 122: 941-945
- [4] Regassa L B, Gasparich G E. Spiroplasmas: evolutionary relationships and biodiversity [J]. Frontiers in Bioscience, 2006, 11: 2983-3002
- [5] Clark T B. Honeybee spiroplasmosis, a new problem for beekeepers [J]. American Bee Journal, 1978, 118: 18-23
- [6] Mouches C, Menara A, Tully J G, et al. *Spiroplasma apis*, a new species from the honeybee (*Apis mellifera*) [J]. Ann Inst Microbiol (Paris), 1983, 134A: 383-397
- [7] 陈永萱, 薛宝娣, 郭永红. 蜜蜂螺原体基本性状的研究 [J]. 中国科学: B 辑, 1988, 31(2): 815-820
- [8] 董秉义, 陈永萱, 许少玉, 等. 蜜蜂及植物花螺原体对蜜蜂的致病性及其血清学关系 [J]. 南京农业大学学报, 1993, 16(2): 37-41
- [9] 董桂林, 郭景荣, 陈永萱. 蜜蜂螺原体单克隆抗体的制备及其基本性状研究 [J]. 南京农业大学学报, 1990, 13(1): 43-47
- [10] 郭永红, 陈永萱. 三株螺原体对抗生素敏感性的体外测定 [J]. 微生物学通报, 1989, 16(4): 194-196
- [11] Garnier M, Clerc M, Bové J M. Growth and division of *Spiroplasma citri*: elongation of elementary helices [J]. Journal of Bacteriology, 1984, 158(1): 23-28
- [12] Patel K R, Mayberry-Carson K J, Smith P F. Effect of external environmental factors on the morphology of *Spiroplasma citri* [J]. Journal of Bacteriology, 1978, 133(2): 925-934
- [13] Özbek E, Miller S A, Meulia T, et al. Infection and replication sites of *Spiroplasma kunkelii* (Class: Mollicutes) in midgut and Malpighian tubules of the leafhopper *Dalbulus maidis* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2003, 82: 167-175
- [14] Ammar E D, Fulton D, Bai X D, et al. An attachment tip and pili-like structures in insect-and plant-pathogenic spiroplasmas of the class Mollicutes [J]. Arch Microbiol, 2004, 181: 97-105
- [15] Merz A J, So M, Sheetz M P. Pilus retraction powers bacterial twitching motility [J]. Nature, 2000, 407: 98-101
- [16] Merz A J, Enns C A, So M. Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque formation in epithelial cells [J]. Molecular Microbiology, 1999, 32(6): 1316-1332

责任编辑: 夏爱红