

• 论 著 •

铜绿假单胞菌对葡萄球菌的抑制作用观察^{*}徐令清, 易思婷, 温伟洪, 钟国权, 王欢, 李介华[△]

(广州医科大学附属第六医院/广东省清远市人民医院检验科 511518)

摘要:目的 观察铜绿假单胞菌对葡萄球菌的抑制作用,为治疗葡萄球菌感染的药物研发提供新线索。方法 收集临床分离出来的 49 株不重复铜绿假单胞菌,通过琼脂打孔法、十字交叉划线法和共孵育试验检测铜绿假单胞菌对葡萄球菌的抑制作用;通过检测不同浓度铜绿假单胞菌内毒素水平,研究内毒素与其抑制葡萄球菌生长是否存在相关性。结果 通过琼脂打孔法筛选出抑制作用强的 PA2224 菌株和 PA2288 菌株,无抑制作用的 PA2503 菌株和 PA2142 菌株。十字交叉划线法和共孵育试验提示铜绿假单胞菌代谢产物可抑制葡萄球菌生长。铜绿假单胞菌菌液浓度与内毒素水平呈正相关。内毒素水平高低与铜绿假单胞菌抑制作用无相关性。结论 部分铜绿假单胞菌对葡萄球菌属有较强抑制作用,其代谢产物有机会被制成杀菌药物应用于临床中,对临床上葡萄球菌属感染可能有很好的应用价值。内毒素与抑制作用无相关性。

关键词:铜绿假单胞菌; 葡萄球菌; 抑制作用; 内毒素

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.05.007 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)05-0615-03

Observation on inhibitory effect of *Pseudomonas aeruginosa* against *Staphylococci*[†]XU Lingqing, YI Siting, WEN Weihong, ZHONG Guoquan, WANG Huan, LI Jiehua[△]

(Department of Clinical Laboratory, Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University/Qingyuan Municipal People's Hospital, Qingyuan, Guangdong 511518, China)

Abstract: Objective To observe the inhibitory effect of *Pseudomonas aeruginosa* against staphylococci to provide a new clue for the drug research and development in treating *Staphylococci* infection. **Methods** Forty-nine clinically isolated no-repeat strains of *Pseudomonas aeruginosa* were collected and their inhibitory effect against *Staphylococcus aureus* was observed by using the agar-well diffusion method, cross-streaking method and co-culture method. Whether having correlation between endotoxin and its inhibition against *Staphylococcus* was investigated by detecting the endotoxin level in different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa*. **Results** The strains PA2224 and PA2288 with strong inhibitory effect and PA2503 and PA2142 strains without inhibitory effect were screened by using the agar-well diffusion method. The cross streak method and co-incubation experiment suggested that the metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* could suppress the growth of *Staphylococci*. The bacterial solution level of *Pseudomonas aeruginosa* was positively correlated with endotoxin. There was no correlation between the endotoxin level and the inhibitory effect of *Pseudomonas aeruginosa*. **Conclusion** Partial *Pseudomonas aeruginosa* have stronger inhibitory effect upon staphylococcus, their metabolites have a chance to be made into bactericides and be applied in clinic, which may have very good application value in *Staphylococci* infection. Endotoxin has no relation with inhibitory effect.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus*; inhibition; endotoxin

铜绿假单胞菌是临床重要的致病菌,能引起伤口和创面感染、呼吸道感染、泌尿道感染及败血症^[1]。它分布广泛,土壤、水和空气中均有存在。有研究报道称铜绿假单胞菌的代谢产物对其他病原微生物有抑制作用^[2-3],故本文研究其对葡萄球菌的抑制作用,以期发现葡萄球菌感染的新治疗方法。现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 2016 年 1—6 月从本院住院及门诊患者送检标本中分离出的不重复铜绿假单胞菌 49 株,以及葡萄球菌 50 株,包括金黄色葡萄球菌 25 株[其中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)12 株],头状葡萄球菌 5 株,表皮葡萄球菌 5 株,溶血葡萄球菌 5 株,腐生葡萄球菌 2 株,人葡萄球菌 5 株,松鼠葡萄球菌 1 株,沃氏葡萄球菌 2 株。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25913。所有菌株均由全自动细菌鉴定药敏系统 phoenix100(美国 BD 公司)及 API 鉴定板条(法国梅里埃公司)鉴

定到种。

1.2 仪器与试剂 MH 琼脂平板(郑州安图生物工程股份有限公司,批号 X20160701B),血琼脂平板(郑州安图生物工程股份有限公司,批号 X20160713A),API 鉴定板条(法国梅里埃公司),全自动细菌鉴定药敏系统 phoenix100(美国 BD 公司),MB-80 微生物快速动态监测系统,革兰阴性菌脂多糖检测试剂盒(北京金山川科技有限公司)。

1.3 方 法

1.3.1 琼脂打孔法 在 MH 培养基上均匀打 6 个孔(注意不要戳穿培养基底部),然后将金黄色葡萄球菌 ATCC25913 调成 0.5 个麦氏浊度的菌悬液并涂布于 MH 培养基上,同时将铜绿假单胞菌制成 0.5 个麦氏浊度的菌悬液,吸取 3 μ L 均匀涂在孔中,35 $^{\circ}$ C 孵育 48~72 h 后,观察结果。同时做两组,观察两组结果,抑菌圈直径取平均值。此为第 1 次初筛。由第 1 次初筛的结果选出各 7 株抑制作用强和无抑制作用的铜绿假

* 基金项目:广东省清远市科学技术局产业技术与研究开发专项资金资助项目(2014A005)。

作者简介:徐令清,男,主管技师,主要从事临床微生物检验研究。 [△] 通信作者, E-mail: jiehua_li@126.com。

单胞菌进行第 2 次初筛,方法同样使用琼脂打孔法,并测试两组,连续 7 d 量取抑菌圈大小并记录结果,观察在两种孵箱中抑菌圈大小有无差异。根据第 2 次初筛的结果,选出抑制作用最强菌株(PA2224、PA2288)和无抑制作用菌株各 2 株(PA2503、PA2142)。将这 4 株铜绿假单胞菌分别作用于 50 株葡萄球菌,方法为琼脂打孔法。

1.3.2 十字交叉划线法 根据文献[3]将上一步选取的 4 株铜绿假单胞菌菌株和选取的 4 株葡萄球菌(包括 MRSA、沃氏葡萄球菌、溶血葡萄球菌和表皮葡萄球菌各 1 株)分别在血平板上分纯培养 18~24 h,制成 0.5 个麦氏浊度菌悬液,取 30 μL 铜绿假单胞菌的菌悬液至 MH 培养基上,用灭菌的接种环任意直径划宽为 1 cm 的划痕,然后放至 35 ℃ 培养 18~24 h。用无菌刀片移除 MH 培养基上的菌苔,将上述 4 株葡萄球菌的菌悬液用无菌棉签蘸取用刀片处理过的划痕做垂直相交划线。将培养基放至 35 ℃ 培养 18~24 h 后,观察结果。

1.3.3 LB 培养基中共孵育试验 在无菌 EP 管装入 1 mL LB 液体培养基,取上述 PA2224、PA2288、PA2503、PA2142 中的一种与金黄色葡萄球菌 ATCC25913 菌悬液各 50 μL 加入 EP 管中,100 r/min 35 ℃ 振荡孵育 24 h,取混悬液涂片,干燥后进行革兰染色镜检。另取各 50 μL 金黄色葡萄球菌 ATCC25913、PA2224 悬液放至 1 mL LB 液体培养基中振荡孵育 24 h 作为对照。

1.3.4 内毒素测定 有抑制作用菌 PA2224、PA2288 和无抑制作用菌 PA2503、PA2142 各制成 10 个麦氏浊度和 1 个麦氏浊度菌悬液。内毒素测定采用 MB-80 微生物快速动态检测系统及试剂盒,用动态浊度法对其进行检测。各取 600 μL 菌悬液 1 650 r/min,离心 8 min。取上清液 100 μL 于样品处理液并混匀。恒温加热 10 min,冷却 5 min 后吸取 200 μL 的样品处理液加入到反应主剂中,溶解混匀后使用微量加样器将上述样本全部转移至标准玻璃反应管中(不能产生气泡),立即插入 MB-80 微生物快速动态检测系统中进行反应,待反应结束后由标准曲线自动计算出内毒素水平。整个操作过程注意避免微生物及细菌污染。

2 结 果

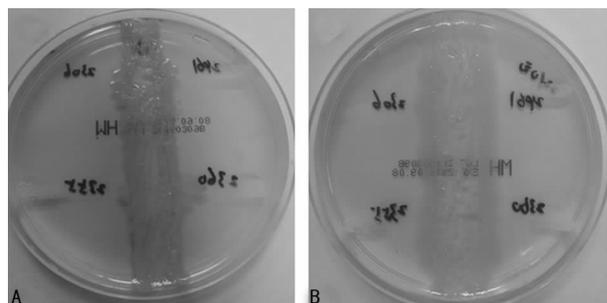
2.1 琼脂打孔法 通过 49 株铜绿假单胞菌对金黄色葡萄球菌 ATCC25913 第 1 次筛查发现,有较强抑制作用 7 株,分别为 PA2178、PA2224、PA2790、PA2481、PA2272、PA2288、PA2366;无抑制作用 7 株,分别为 PA2127、PA2168、PA2163、PA2142、PA2210、PA2503、PA2673。进行第 2 次筛查发现 PA2224 和 PA2288 抑制作用最强,而 PA2503 和 PA2142 两次筛查均无抑制作用。琼脂打孔法显示,PA2224 和 PA2288 对 50 株葡萄球菌均具有明显抑制作用。

2.2 十字交叉划线法 PA2224 和 PA2288 呈现明显抑制现象,见图 1。PA2503 和 PA2142 均无抑制作用。

2.3 共孵育试验 无抑制作用的 PA2503 和 PA2142 培养基取 10 μL 涂片经革兰染色后,镜下大量革兰阴性杆菌和革兰阳性球菌,见图 2A 及图 2B。有抑制作用的 PA2224 和 PA2288 的 LB 液体培养基中取 10 μL 涂片后革兰染色,发现存在大量的革兰阴性杆菌和极少量的革兰阳性球菌,见图 2C 及图 2D。

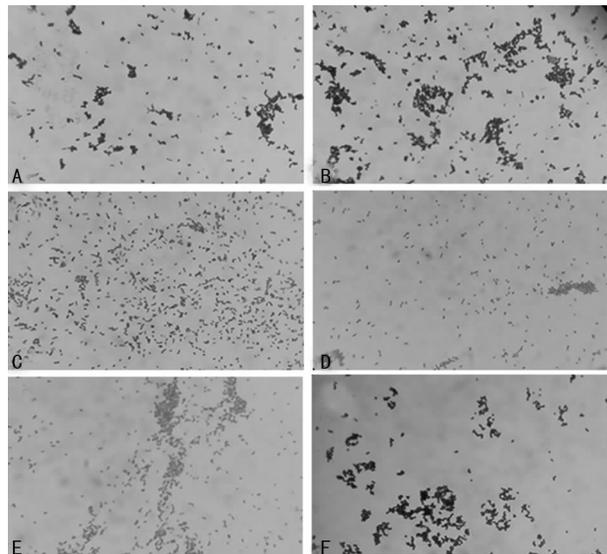
2.4 内毒素试验 内毒素水平与菌液浓度呈正相关。上述 4 株铜绿假单胞菌的内毒素水平高低与其对葡萄球菌抑制作用无相关性,见图 3。1~10 号的内毒素实测值分别为 0.359、<0.001、2.243、6.044、0.138、4.855、1.939、5.964、

0.807、10.060 EU/mL。



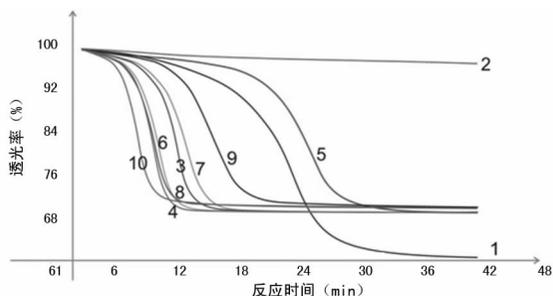
注:A 为 PA2224 对 4 株葡萄球菌的抑制作用;B 为 PA2288 对 4 株葡萄球菌的抑制作用。

图 1 PA2224 和 PA2288 对 4 株葡萄球菌的抑制作用



注:A 为 PA2142 与金黄色葡萄球菌 ATCC25913;B 为 PA2503 与金黄色葡萄球菌 ATCC25913;C 为 PA2224 与金黄色葡萄球菌 ATCC25913;D 为 PA2288 与金黄色葡萄球菌 ATCC25913;E 为 PA2224 与金黄色葡萄球菌 ATCC25913;F 为金黄色葡萄球菌 ATCC25913。

图 2 共孵育试验结果



注:1 为质控品;2 为阴性对照(无菌注射用水);3 为 PA2224(1 个麦氏浊度);4 为 PA2224(10 个麦氏浊度);5 为 PA2288(1 个麦氏浊度);6 为 PA2288(10 个麦氏浊度);7 为 PA2503(1 个麦氏浊度);8 为 PA2503(10 个麦氏浊度);9 为 PA2142(1 个麦氏浊度);10 为 PA2142(10 个麦氏浊度)。

图 3 PA2224、PA2288、PA2503、PA2142 内毒素动力学曲线

3 讨 论

铜绿假单胞菌广泛分布于自然界中的土壤、水和空气中,也是医院环境中常见的微生物,临床上常见的条件致病菌。铜绿假单胞菌作为人体正常菌群的一部分,可以从健康的个体中

分离到。有研究证明铜绿假单胞菌的次级代谢产物,具有抵抗其他微生物的活性,这提示铜绿假单胞菌代谢产物对它们所处的环境其他微生物都会有杀灭或抑制作用,可能具有一定临床应用价值^[3]。

国外有报道,铜绿假单胞菌能产生各种氧化还原活性的吩嗪类化合物,包括绿脓菌素、吩嗪-1-羧酸、1-羟基吩嗪和吩嗪-1-甲酰胺^[4-5]。铜绿假单胞菌产生的绿脓菌素可能为其主要抑菌物质,绿脓菌素可能通过氧化或还原两种形式杀菌^[6]。Makarand 等^[7]报道铜绿假单胞菌能合成并分泌吩嗪类抗菌药物,即吩嗪-1-羧酸;除此之外,还能产生聚酮类抗菌药物藤黄绿脓菌素;这些物质对多种农作物的病原性真菌生长具有显著的抑制作用,在现代绿色农业中具有广泛的应用前景^[8]。Tawiah 等^[9]从河流和海水中分离出 27 株产生抗菌药物的微生物,其中一株铜绿假单胞菌对其他微生物有较强的作用,包括革兰阳性球菌、革兰阳性杆菌和念珠菌,表明这种活性产物有很宽的抗菌谱,通过薄层液相色谱分析和放射自显影技术发现有 7 种成分,但研究者没有对其中的活性成分进行分离。

国内有研究报道,用交叉条带试验方法进行铜绿假单胞菌对 10 株耐甲氧西林表皮葡萄球菌体外抑制测定,结果提示铜绿假单胞菌对耐甲氧西林表皮葡萄球菌具有较强的抑制活性^[10]。金黄色葡萄球菌是引起呼吸道感染、心内膜炎、败血症、毒性疾病等重要的致病菌。近年来,MRSA 已成为医院院内感染最常见的致病菌,治疗困难且病死率高。秦金喜等^[11]报道铜绿假单胞菌抗菌物质对 MRSA 的抑菌活性研究,为治疗 MRSA 开辟了新道路。

本研究收集临床分离出来的 49 株不重复铜绿假单胞菌,通过琼脂打孔法、十字交叉划线法和共孵育试验检测铜绿假单胞菌对金黄色葡萄球菌及其他葡萄球菌的抑制作用。本研究发现,部分铜绿假单胞菌对测试的所有葡萄球菌具有较强的抑制作用,为某些耐药的葡萄球菌,如 MRSA 的感染治疗提供新的方向。内毒素是存在于革兰阴性细菌胞壁外膜中的一种生物活性成分,主要化学成分是脂多糖中的类脂 A。内毒素进入机体循环,能引起内毒素血症,如发热反应、白细胞反应,甚至休克等。通过本试验发现,铜绿假单胞菌能产生大量的内毒素,内毒素水平高低与铜绿假单胞菌的菌液浓度呈正相关。1 个麦氏浊度的铜绿假单胞菌与 10 个麦氏浊度铜绿假单胞菌内毒素水平差异可达到数倍甚至十几倍。本研究发现有抑制作用与无抑制作用的铜绿假单胞菌不管内毒素水平高低,均与其抑制作用无相关性。从另外角度考虑,如果要铜绿假单胞菌的代谢产物应用于临床来治疗感染性疾病,如何去除内毒素也是限制其临床应用一个重要因素。

综上所述,部分铜绿假单胞菌对葡萄球菌有强大的抑制作用,具有一定的临床应用价值。其原因可能与铜绿假单胞菌的代谢产物有关,后续应该把铜绿假单胞菌的代谢产物提取并分

离纯化,鉴定结构,做进一步研究。但在应用时还需要考虑内毒素的因素。

参考文献

- [1] Murray PR. Manual of clinical microbiology[M]. 9th ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 2007:1762-1766.
- [2] Xu LQ, Wang F, Shen Y, et al. Pseudomonas aeruginosa inhibits the growth of pathogenic fungi: In vitro and in vivo studies[J]. Exp Ther Med, 2014, 7(6):1516-1520.
- [3] Kerr JR. Suppression of fungal growth exhibited by Pseudomonas aeruginosa[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(2):525-527.
- [4] Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, et al. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from Pseudomonas aeruginosa PAO1[J]. J Bacteriol, 2001, 183(23):6454-6465.
- [5] Allen L, Dockrell DH, Pattery T, et al. Pyocyanin production by Pseudomonas aeruginosa induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo[J]. J Immunol, 2005, 174(6):3643-3649.
- [6] Hays EE, Wells IC, Katzman PA, et al. Antibiotic substances produced by Pseudomonas aeruginosa[J]. J Biol Chem, 1945, 159(5):725-750.
- [7] Makarand R, Prashant DS, Bhusan LC. Detection, isolation, and identification of phenazine-1-carboxylic acid produced by biocontrol stains of Pseudomonas aeruginosa[J]. J Sci Indust Res, 2007, 66(1):627-631.
- [8] 葛宜和, 赵彦宏, 陈丽娟, 等. 藤黄绿脓菌素的自诱导及假单胞菌 M18 抗生物物质代谢相关性初步分析[J]. 微生物学报, 2007, 47(3):441-446.
- [9] Tawiah AA, Gbedema SY, Adu F. Antibiotic producing microorganisms from River Wiwi, Lake Bosomtwe and the Gulf of Guinea at Doakor Sea Beach, Ghana[J]. BMC Microbiol, 2012, 12(1):234-238.
- [10] 张新华, 秦金喜, 李仲兴. 铜绿假单胞菌对耐甲氧西林表皮葡萄球菌和粪肠球菌的体外抑菌作用研究[J]. 临床荟萃, 2012, 27(7):581-584.
- [11] 秦金喜, 李仲兴, 杨永昌, 等. 铜绿假单胞菌抗菌物质对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌活性研究[J]. 中国微生物生态学杂志, 2012, 24(9):825-828.

(收稿日期:2016-08-27 修回日期:2016-12-19)

误 差

误差指测量值与真值之差,也指样本指标与总体指标之差。包括系统误差、随机测量误差和抽样误差。系统误差指数据收集和测量过程中由于仪器不准确、标准不规范等原因,造成观察(检测)结果呈倾向性的偏大或偏小,是可避免或可通过研究设计解决的。随机测量误差指由于一些非人为的偶然因素使观察(检测)结果或大或小,是不可避免的。抽样误差指由于抽样原因造成样本指标与总体指标的差异,是不可避免但可减少的。