

铜绿假单胞菌代谢产物体外对白假丝酵母菌等的抑菌活性研究

秦金喜¹, 李仲兴², 杨永昌³, 袁欣¹, 柏秀菊¹, 石忻罗¹

(1 徐水县人民医院, 河北 徐水 072550; 2 河北医科大学第二医院, 河北 石家庄 050000; 3 北京军区总医院, 北京 100730)

[摘要] **目的** 观察铜绿假单胞菌代谢产物对假丝酵母菌属的体外抑菌活性。**方法** 用交叉条带实验方法测定铜绿假单胞菌对 54 株假丝酵母菌属的体外抑制活性。**结果** 铜绿假单胞菌产生的抗菌物质对白假丝酵母菌及光滑假丝酵母菌的抑菌作用最强, 抑菌带最宽。产蓝绿色素的第 6 株铜绿假单胞菌对白假丝酵母菌和热带假丝酵母菌的抑制率均达 100%, 产黄绿色素的第 8 株铜绿假单胞菌对白假丝酵母菌、热带假丝酵母菌和克柔假丝酵母菌的抑制率也均达 100%, 铜绿假单胞菌产色素菌株的抗真菌活性优于不产色素的菌株。**结论** 铜绿假单胞菌产生的抗菌物质对白假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌具有较强的抗真菌活性。

[关键词] 铜绿假单胞菌; 代谢产物; 白假丝酵母菌; 光滑假丝酵母菌; 克柔假丝酵母菌; 热带假丝酵母菌; 抑菌活性

[中图分类号] R378.99⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2012)04-0257-05

In vitro inhibitory activity of the metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* against *Candida* species

QIN Jin-xi¹, LI Zhong-xing², YANG Yong-chang³, YUAN Xin¹, BAI Xiu-ju¹, SHI Yi-luo¹, (1 Xushui People's Hospital, Xushui 072550, China; 2 Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 3 General Hospital of Beijing Military Region, Beijing 100730, China)

[Abstract] **Objective** To observe in vitro inhibitory activity of the metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) against *Candida* spp. **Methods** In vitro inhibitory activity of *P. aeruginosa* against 54 *Candida* spp. isolates was detected by cross-streak assay. **Results** The metabolites of *P. aeruginosa* had the strongest inhibitory activity on *Candida albicans* (*C. albicans*) and *Candida glabrata* (*C. glabrata*), and produced the widest zone of inhibition. The inhibition rate of aquamarine pigment-producing No. 6 *P. aeruginosa*s against *C. albicans* and *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) were both 100%, and the inhibition rate of yellow green pigment-producing No. 8 *P. aeruginosa*s against *C. albicans*, *C. tropicalis* and *Candida krusei* (*C. krusei*) were all 100%, too. The pigmented strains were found to have stronger antifungal activity than the unpigmented strains. **Conclusion** The metabolites of *P. aeruginosa* has strong antifungal activity against *C. albicans* and *C. glabrata*.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; metabolites; *Candida albicans*; *Candida glabrata*; *Candida tropicalis*; *Candida krusei*; inhibitory activity

[Chin Infect Control, 2012, 11(4): 257-260, 256]

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是临床上引起人类多种医院感染的重要致病菌,除了具有致病性外,其产生的抗菌物质绿脓素等色素还具有抑制其他细菌的能力^[1]。但铜绿假单胞菌对临床

分离的白假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌和热带假丝酵母菌等影响如何,国内尚无报道。为此,我们随机选取 10 株铜绿假单胞菌,分别对白假丝酵母菌等 54 株假丝酵母菌进行了体外抑菌实验研究,现将结

果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 10 株铜绿假单胞菌为本院临床标本分离株,主要分离自痰标本;54 株白假丝酵母菌等主要分离自阴道分泌物、痰和血液等标本,均按 Bergey's Manual of Derminative Bacteriology 进行鉴定^[2]。

1.2 培养基 M-H 琼脂,英国 OXOID 公司产品。

1.3 菌液制备 将铜绿假单胞菌接种于 M-H 琼脂,各种假丝酵母菌接种于沙氏琼脂培养基(自制),经 35℃ 培养 18~24 h,分别取其菌落用 M-H 肉汤和沙氏肉汤制成约为 10⁸ CFU/mL 的菌悬液。

1.4 实验方法 将铜绿假单胞菌菌悬液划线接种于沙氏琼脂平板中央,使其呈一条宽为 6 mm 的接种线,35℃ 培养 24 h 后,在接种线上生长的菌落呈现一条菌落条带,用无菌玻片轻轻刮去条带上生长的菌苔,将平皿倒置,平皿盖内放一直径为 5 cm 的浸氯仿的滤纸片(用于杀死残存的铜绿假单胞菌),

35℃ 置 15 min,打开平皿取出氯仿滤纸片,待平皿内氯仿挥发完毕后,分别将白假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌、热带假丝酵母菌和克柔假丝酵母菌的菌悬液于原铜绿假单胞菌条带垂直交叉划线接种,30℃ 培养 24 h 后观察结果^[3]。

1.5 结果判读 在原铜绿假单胞菌生长带上,被测菌仍沿其划线生长,无抑菌带出现为无抑菌活性(阴性);出现 6 mm 及以上的抑菌带为有抑菌活性(阳性)。

2 结果

2.1 铜绿假单胞菌对 54 株假丝酵母菌的抑菌情况 利用 10 株铜绿假单胞菌对白假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌、热带假丝酵母菌和克柔假丝酵母菌进行体外抑菌试验,结果表明,铜绿假单胞菌对光滑假丝酵母菌和白假丝酵母菌的抑菌作用最强,对热带假丝酵母菌和克柔假丝酵母菌的抑菌作用较差,详见表 1。

表 1 铜绿假单胞菌对 54 株假丝酵母菌的抑菌活性

Table 1 Inhibitory activity of *P. aeruginosa* against 54 *Candida* isolates

	<i>C. albicans</i> (n=20)	<i>C. glabrata</i> (n=20)	<i>C. tropicalis</i> (n=10)	<i>C. krusei</i> (n=4)
Number of testing	200	200	100	40
Number of testing with inhibition efficacy	106	109	43	11
Average width of inhibition zone(mm)	28.16 ± 7.70	29.19 ± 6.55	8.67 ± 5.58	6.72 ± 1.62

2.2 铜绿假单胞菌对 20 株白假丝酵母菌的体外抑菌情况 见表 2。铜绿假单胞菌的 5、6 和 8 号菌株抑菌活性最强,抑菌率达 95%~100%,敏感菌株的抑菌带宽度也较宽;1、7 和 10 号菌株几乎无抑菌效果。说明铜绿假单胞菌的不同菌株对白假丝酵母菌

的抑菌效果不同。

铜绿假单胞菌对白假丝酵母菌和光滑假丝酵母菌的抑菌作用最强,抑菌带最宽,几乎占了平板的一半;对克柔假丝酵母菌抑菌带最窄,抑菌作用最差。其对 4 种假丝酵母菌的抑菌效果见图 1~4。

表 2 10 株铜绿假单胞菌对 20 株白假丝酵母菌敏感株的抑菌活性(抑菌带宽度,mm)

Table 2 Inhibition activity of 10 *P. aeruginosa* isolates against 20 *C. albicans* isolates (width of the inhibition zone, mm)

No. of <i>C. albicans</i>	No. of <i>P. aeruginosa</i>									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0	32	0	0	22	35	0	26	0	0
2	0	30	0	23	22	40	0	28	0	0
3	0	35	30	29	30	40	0	33	0	0
4	0	0	0	26	25	30	0	32	0	0
5	0	0	30	23	27	30	0	26	36	0
6	0	25	30	31	30	35	0	30	37	0
7	0	32	31	30	29	40	0	27	30	0
8	0	0	23	31	26	36	0	26	0	18
9	0	28	0	0	16	38	0	26	0	6

续表 2 (Continued of table 2)

No. of <i>C. albicans</i>	No. of <i>P. aeruginosa</i>									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10	0	33	0	0	34	38	0	26	0	0
11	0	20	0	0	27	35	0	30	0	0
12	0	22	0	0	27	38	0	26	0	6
13	8	40	37	21	28	38	0	27	40	6
14	0	20	0	20	25	30	0	28	35	16
15	0	31	0	26	23	42	0	36	44	0
16	0	0	0	28	25	26	0	35	0	0
17	0	0	0	0	0	26	0	26	0	0
18	0	22	0	23	20	22	0	25	0	0
19	0	27	0	33	25	40	0	30	0	6
20	0	20	0	0	29	38	0	25	0	0
Average width of inhibition zone(mm)	8.00	27.80±6.19	30.17±4.45	26.46±4.22	25.79±4.09	34.85±5.62	0	28.40±3.33	37.00±4.73	9.67±5.72
Inhibition rate(%)	5	75	30	65	95	100	0	100	30	30



Four yellow belts on each side are *C. albicans* colonies, intermediate blank is a zone of inhibition (*C. albicans* can't grow)

图 1 铜绿假单胞菌对白假丝酵母菌的抑菌作用

Figure 1 Bacteriostatic action of *P. aeruginosa* on *C. albicans*



Four yellow belts on each side are *C. glabrata* colonies, intermediate blank is a zone of inhibition (*C. glabrata* can't grow)

图 2 铜绿假单胞菌对光滑假丝酵母菌的抑菌作用

Figure 2 Bacteriostatic action of *P. aeruginosa* on *C. glabrata*



Four yellow belts on each side are *C. krusei* colonies, the inhibition zone of intermediate blank is very narrow (*C. krusei* can't grow)

图 3 铜绿假单胞菌对克柔假丝酵母菌的抑菌作用

Figure 3 Bacteriostatic action of *P. aeruginosa* on *C. krusei*



Four yellow belts on each side are *C. tropicalis* colonies, the inhibition zone of intermediate blank is very narrow (*C. tropicalis* can't grow)

图 4 铜绿假单胞菌对热带假丝酵母菌的抑菌作用

Figure 4 Bacteriostatic action of *P. aeruginosa* on *C. tropicalis*

2.3 色素与抗菌作用的关系 10株铜绿假单胞菌产生4种不同的色素,分别为蓝绿色素(6、7、9号菌

株)、黄绿色素(2、3、8号菌株)、淡绿色素(4、5号菌株)、无色素(1、10号菌株)。产生不同色素的铜绿

假单胞菌的抑菌作用不同;同一铜绿假单胞菌株对不同假丝酵母菌株的抑制作用也不完全一样;产生

同样色素的不同铜绿假单胞菌对假丝酵母菌株的抑制作用也不完全一样。见表 3。

表 3 产生不同色素的 10 株铜绿假单胞菌对 54 株假丝酵母菌的抑菌情况

Table 3 Inhibition of 10 different pigment-producing *P. aeruginosa* isolates against 54 *Candida* isolates

	Aquamarine pigment			Yellow green pigment			Light green pigment		Without pigment	
	6	7	9	2	3	8	4	5	1	10
<i>C. albicans</i> (n=20)										
Inhibition rate(%)	100.0	0.0	30.0	75.0	30.0	100.0	65.0	95.0	5.0	30.0
Average width of inhibition zone(mm)	34.9±5.6	0.0	37.0±4.7	27.8±6.2	30.2±4.5	28.4±3.3	26.5±4.2	25.8±4.1	8.0	9.7±5.7
<i>C. glabrata</i> (n=20)										
Inhibition rate(%)	95.0	30.0	60.0	90.0	30.0	33.3	90.0	90.0	5.0	5.0
Average width of inhibition zone(mm)	37.4±3.4	22.0±7.1	34.9±2.2	29.8±4.4	27.5±2.2	29.7±4.7	27.5±3.2	25.3±4.3	15.0	16.0
<i>C. tropicalis</i> (n=10)										
Inhibition rate(%)	100.0	0.0	10.0	30.0	10.0	100.0	30.0	100.0	0.0	50.0
Average width of inhibition zone(mm)	14.8±6.5	0.0	9.0	6.0±0.0	6.0	8.4±5.1	6.0±0.0	6.0±0.0	0.0	6.0±0.0
<i>C. krusei</i> (n=4)										
Inhibition rate(%)	50.0	0.0	50.0	25.0	0.0	100.0	0.0	0.0	25.0	25.0
Average width of inhibition zone(mm)	10.0±0.0	0.0	6.0±0.0	6.0	0.0	6.0±0.0	0.0	0.0	6.0	6.0

Longitudinal data are No. of pigment-producing *P. aeruginosa*

3 讨论

据报道^[1],铜绿假单胞菌对大肠埃希菌等有很强的抑菌作用。但国内尚无铜绿假单胞菌是否对假丝酵母菌属有抑制活性的报道。本研究利用 10 株铜绿假单胞菌对 54 株白假丝酵母菌进行抗菌活性研究,发现铜绿假单胞菌对白假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌的抗菌效果均较好。对白假丝酵母菌共进行 200 次试验,其中 106 次有抑菌作用,抑菌带宽度最宽可达 42 mm,抑菌带几乎占了平板(90 mm)的一半;铜绿假单胞菌对热带假丝酵母菌的抗菌活性较差,对克柔假丝酵母菌的抗菌效果最差。同时,铜绿假单胞菌产色素的菌株抗菌效果好,不产色素的菌株抑菌效果差;还发现产生不同色素的菌株对假丝酵母菌的抑制作用差异也较大,如产色素的 5、6、8 号菌株抑菌率达 90%以上,甚至 100%。

日本学者 Kondo 等^[4]报道,铜绿假单胞菌对白假丝酵母菌有抗菌活性;北爱尔兰学者 Kerr^[5]利用铜绿假单胞菌对白假丝酵母菌、热带假丝酵母菌等各 1 株进行抑菌试验,发现其对白假丝酵母菌抗菌效果最好,但上述报告均仅用 1 株假丝酵母菌进行试验,由于菌株之间有差异,对结果有一定影响。故我们采用大批量菌株进行试验,增加了结果的可靠性。此外,Bandara 等^[6]报道铜绿假单胞菌体外可抑制假丝酵母菌的生物膜形成;除铜绿假单胞菌外,洋葱假单胞菌(*Pseudomonas cepacia*)也能抑制白假丝酵母菌生长^[7]。

cyanin)^[8],它是一种吩嗪色素(C₁₃H₁₀N₂O),其抗菌作用主要是在氧化还原反应中能产生超氧化物自由基(O₂⁻),对其他细菌有很强的毒害作用。Brand 等^[9]发现铜绿假单胞菌可以杀死白假丝酵母菌的菌丝,而不能杀死酵母细胞,杀死菌丝涉及直接接触和可溶性因子介导两种调控模式:首先是铜绿假单胞菌黏附在活的白假丝酵母菌的菌丝上,其次是定植,定植后,铜绿假单胞菌产生不耐热的可溶性因子,使菌丝的局部细胞壁溶解,内容物流出而菌丝死亡。

假单胞菌属(*Pseudomonas spp.*)包括铜绿假单胞菌等 53 个种。铜绿假单胞菌广泛分布于自然界,包括水、土壤等各种环境均可存在,为具有鞭毛的革兰阴性杆菌,是引起人类烧伤部位感染、尿路感染、各种手术伤口感染,以及器械相关性医院感染的重要病原菌^[10-11]。铜绿假单胞菌一方面是人类的病原菌,引起人类的各种感染,另一方面,它产生的抗菌物质又能抑制其他病原菌的生长。除了可以抑制白假丝酵母菌等生长外,铜绿假单胞菌还能产生聚酮类抗生素,即藤黄绿脓菌素(pyoluteorin),这种藤黄绿脓菌素是一种用于农业防治由卵菌属、真菌等引起黄瓜、番茄等根腐病很有效的抗菌物质^[12]。此外,假单胞菌属中的其他一些菌种也有上述类似的作用,如荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescences*)可以污染血库冰箱储存的血液,而且此种细菌自溶后释放出内毒素,其内毒素的磷脂部分可导致输血后不可逆的休克而死亡。但荧光假单胞菌又能产生多种抗菌物质,如可产生藤黄绿脓菌素、硝吡

铜绿假单胞菌的抗菌物质主要是绿脓素(pyoc-

本研究未能采集病例标本进行病原体检测是最大的缺陷。但调查人员可根据流行病学调查结果得出流行病学结论,同样对控制医院感染有促进作用^[9]。我们根据病例临床表现和相关流行病学资料,认为这是一起急性出血性结膜炎暴发疫情;W 科住院患者使用公用厕所、揉眼睛和使用公用洗手池是疫情发生的危险因素。在短时间内无法改善硬件设施的情况下,我们建议医院在公共场所配备洗手液和手消毒液,加强对公共走廊、公共厕所等公共场所的物体表面(门把手、水龙头、地面、墙面等)的消毒工作,尽可能降低医院感染的隐患;同时加强对患者的健康教育,形成良好的个人卫生习惯。同时,我们建议政府进一步加大对医疗卫生机构的投入,全面提高医疗资源配置效率,促进医疗事业的均衡发展,为人民群众提供安全、有效、方便、价廉的医疗服务。

[参 考 文 献]

[1] 冯捷,王晨辉,王兴泰,等. 医院感染爆发流行调查处理[J]. 世

界感染杂志,2005,5(4):361-363.

- [2] 牟瑾,张顺祥,张韶华. 两起儿科病房轮状病毒腹泻院内感染的现场流行病学调查[J]. 实用预防医学,2005,12(4):747-749.
- [3] 魏全珍,张惠珍,刘丽华. 烧伤病区患者创面 MRSA 医院感染流行的预防与控制[J]. 中华医院感染学杂志,2007,17(7):816-818.
- [4] Li Y, Guo H, Xu W, *et al.* A community outbreak of rotavirus diarrhea associated with exposures in a hospital outpatient department in south China[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2011, 30(9):745-748.
- [5] 王露. 眼结膜炎医院感染暴发的控制[J]. 中国保健,2009,17(17):702.
- [6] Hadad Meléndez P, López-Chávez A U, Fernández Llanes R. A report of a nosocomial outbreak of hemorrhagic conjunctivitis in health workers[J]. *Rev Cubana Med Trop*, 1995, 47(2):140-141.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)[S]. 北京, 2001.
- [8] 中华人民共和国卫生部. 医院感染管理办法[S]. 北京, 2006.
- [9] 张彦,张树荣,查红. 浅谈医院感染爆发调查中应注意的几个问题[J]. 西南军医,2004,6(3):51-52.

(上接第 260 页)

咯菌素等抗菌物质,具有防治农作物病虫害的作用,能替代化学药物防治可能带来的环境污染和对人类的不利影响,是一项具有良好发展前景和实用价值的应用研究课题。

本研究结果表明,铜绿假单胞菌对白假丝酵母菌和光滑假丝酵母菌有很强的抑制作用,这对抗假丝酵母菌等抗真菌感染的药物研制开辟了一条新的途径。目前由于假丝酵母菌属的耐药性,其所引起的肺部感染治疗十分困难,可望经过研究开发出新的抗真菌感染药物,造福人类。

[参 考 文 献]

- [1] Li Z, Wang X, Guo Y, *et al.* Inhibitory action of metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* against gram negative bacteria[J]. *Kansenshogaku Zasshi*, 1995, 69(8):924-927.
- [2] Holt J G. *Bergey's manual of determinative bacteriology*[M]. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994:151-157.
- [3] 王秀华,李仲兴,郭月珠,等. 绿脓假单胞菌代谢产物对大肠杆菌等革兰氏阴性细菌的抑菌作用观察[J]. 中国抗生素杂志, 1995, 20(4):308-310.
- [4] Kondo S, Sato N, Yamada T, *et al.* Antibiotic activity of *P. aeruginosa* against MRSA and *Candida albicans*[J]. *Kansen-*

shogaku Zasshi, 2002, 76(4):231-237.

- [5] Kerr J R. Suppression of fungal growth exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Clin Microbiol*, 1994, 32(2):525-527.
- [6] Bandara H M, Yau J Y, Watt R M, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* inhibits in-vitro *Candida* biofilm development[J]. *BMC Microbiol*, 2010, 10(1):125-133.
- [7] Kerr J. Inhibition of fungal growth by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from patients with cystic fibrosis[J]. *J Infect*, 1994, 28(3):305-310.
- [8] Kerr J, Taylor G W, Rutman A, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth [J]. *J Clin Pathol*, 1999, 52(5):385-387.
- [9] Brand A, Barnes J D, Mackenzie K S, *et al.* Cell wall glycans and soluble factors determine the interactions between the hyphae of *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 287(1):48-55.
- [10] Garrity G M. *Bergey's manual of systematic bacteriology*[M]. 2ed, New York, Springer, 2005:323-359.
- [11] Murray P R. *Manual of clinical microbiology*[M]. 9th ed, Washington DC, American Society for Microbiology, 2007:734-736.
- [12] 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.