DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.006

应用干涉相差显微镜观察细菌潜生体繁殖方式的研究*

刘俊康** 丛延广 王 源 邓国宏 徐启旺 (第三军医大学生物波研究中心)重庆,400038

提 要 目的:探讨细菌潜生体新的繁殖方式。方法:采用特制的干涉相差显微镜结合显微培养方法,动态观察绿脓杆菌和奇异变形杆菌潜生体的繁殖过程。结果:这两种细菌的潜生体表现出多位断裂、自旋端位断裂、出芽生长、梳状繁殖等新的繁殖方式。结论:细菌潜生体繁殖方式的多样性可能有助于种系稳定。

关键词 绿脓杆菌;奇异变形杆菌;细菌繁殖
中图法分类号 Q935; R378.991

细菌主要以二分裂方式进行增殖,据此Pritchard[1]提出群体细菌生长的四个生长阶段划分,即:延缓期、对数期、稳定期、衰退期,这对研究微生物生长特别是对微生物生理学研究有重要作用。林特夫[2]认为L型细菌可以出芽生长;也有报道白喉杆菌表现节段性生长。这些工作为探索细菌特殊的繁殖方式提供了思路。本文作者所在实验室观察到群体细菌节律性波动生长过程中表现潜生序变化[3],潜生体(Cryptic growth cell, CGC)可以回复到繁殖体,并表现新的繁殖方式,本文改进方法对此进行了实验观察。

1 材料与方法

1.1 菌种

PA血清8型,成都生物制品研究所提供,奇异变形杆菌为本实验室分离保存菌种,生化特点为:乳糖(-),葡萄糖(+),H_2S(±),尿素酶(+),靛基质(-),动力(+),苯丙氨酸酶(+),氧化酶(-)。

1.2 显微镜

重庆光学仪器厂研制改造的干涉相差显微镜,配制25倍及40倍相差盘及相应相差镜头和倒置显微镜落射光源。

1.3 特制培养皿制备及培养基

选取薄底培养皿,平皿底厚度小于1.5 mm,平皿直径约4.0 cm平皿盖内壁加入1.5 ml含30%丙烯酰胺和0.8%双丙烯酰胺的胶母液,并加入10% TEMED 10% AP各10μl上面轻轻覆盖蒸馏水,以隔绝氧气,待凝胶形成后,倒去上层水液,倒置,使表面无多余水份,备用。培养基采用0.5%琼脂糖的波动I号培养基。

1.4 观察方法

采用郭刚等[4]的方法制备CGCs。将CGCs稀释后涂布于制备好的培养基上,加含有薄层聚丙烯胺凝胶的培养皿盖,37℃保温观察,并作记录。

2 结果

2.1 多位断裂

纤细状绿脓杆菌CGCs 37℃显微培养4 h,可表现出多位点断裂生长方式,即菌体多个位点相继断裂,生成众多的断裂细菌个体,见图1。



图1 绿脓杆菌潜生体多位断裂生长 (× 250)
Fig 1 Multi-point blast growth of PA CGCs (× 250)

2.2 自旋端位断裂

奇异变形杆菌CGCs在显微培养约2~3 h后,可出现较多的自旋小体。在其持续旋转运动过程中,可以从菌体末端开始断裂生成短杆菌,后者可离开自旋小体或停留在自旋小体中心,见图2。

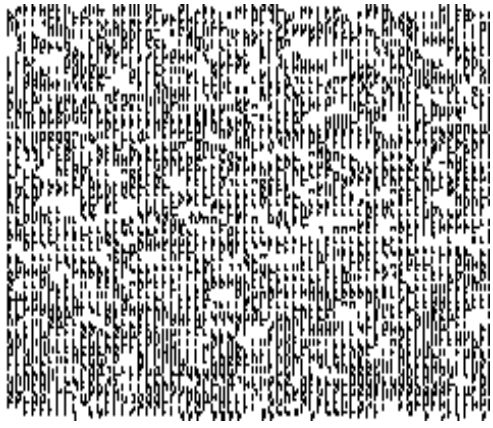


图2 奇异变形杆菌自旋端位断裂生长 (× 400)
Fig 2 The rotating end-blast growth of proteus mirabilis (× 400)

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39370008
** 刘俊康,男,30岁,讲师,博士研究生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 出芽

奇异变形杆菌 CGCs在菌体侧面生出小的突起,并逐渐长大,最后也可通过断裂方式形成小群集结构。绿脓杆菌潜生体的繁殖过程也观察到出芽、分枝生长的方式,见图 3 4

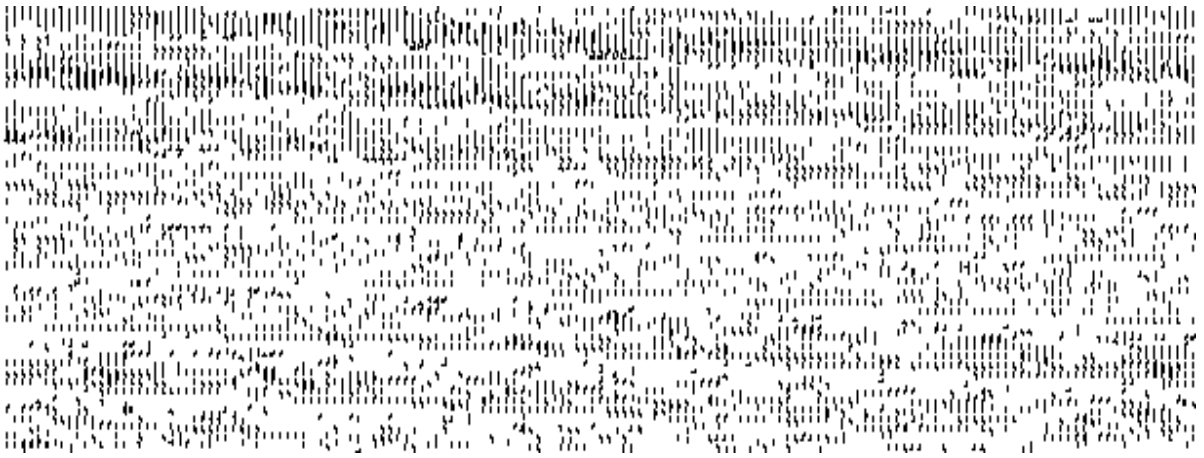


图 3 绿脓杆菌潜生体出芽生长初期 (× 250)

Fig 3 The early stage of schizogenesis growth of PA CGCs (× 250)

图 4 绿脓杆菌潜生体出芽生长后期 (× 250)

Fig4 The final stage of schizogenesis growth of PA CGCs (× 250)

2.4 梳状繁殖

奇异变形杆菌 CGCs与绿脓杆菌(GCs)繁殖的子代均可迅速地生成纤细状 CGCs,往往排列成梳状结构。

3 讨论

采用干涉相差显微镜倒置光源观察 CGCs的繁殖方式,光源充足,分辨率高,有助于详细观察繁殖方式及其过程。采用固体培养皿方法,既有助于观察也固定了细菌繁殖后的菌落位置,又能清楚分析繁殖过程和特点。用倒置显微镜可以在培养基上加盖观察,有利于保湿保温,特制培养皿盖内壁因加有透明的聚丙烯酰胺凝胶,使观察过程中培养皿中水汽蒸发较少,且不在培养皿盖上冷凝形成水雾,故有利于持续动态观察。实验时间内生态条件稳定不会影响实验结果。

细菌 CGC的繁殖方式展示出生物繁殖多样性的特点。这种多样性可能有利于细菌在不利环境中采取相应特殊增殖方式,保存自身、保存种系,是生物种系稳定的一种方式。近年来,我们在人体感染组织标本中检测出细菌的 CGC,也看到了 CGC在体外形成 CGC的稳定性传代特点,这种方式可能与致病关系密切。随着研究深入,对 CGC繁殖方式的研究将显示重要意义。

参考文献

1 Pritchard R H. Growth: cells and population. in Biochemistry of Bacterial Growth by Joel Mandelstam, Kenneth Mcquillen, I an Dawes. 3 ed. London: Blackwell scientific publications, 1982. 99~ 123

2 林特夫.细菌的非典型形态与结构.见李影林 主编.临床微生物学及检验.长春:吉林科学技术出版社,1991. 21~ 25

3 邓国宏,高强国,王 源,等.绿脓杆菌水中生存复杂性变化观察.第三军医大学学报,1997,19(3): 197

4 郭 刚,黄春基,王 源,等.抗生素 Sub-MICs诱导的纤细菌与潜生体的比较研究.中华流行病学杂志,1997,17(3-C): 120

(收稿: 1998-06-11;修回: 1998-12-07)

(编辑 冯崇英)

Observation on multiplication pattern of bacterial cryptic growth cells with interference phase-contrast microscope*

Liu Junkang, Cong Yangguang, Wang Yuan, Deng Guohong, Xu Qiwang (Research Center of Biological Wave, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To explore the new multiplication pattern of bacterial cryptic growth cells

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39370008

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(CGCs). Methods: The interference phase-contrast microscope and special culture plate were employed in the dynamic observation on the multiplicational process of CGCs of pseudomonas aeruginosa (PA) and proteus mirabilis (PM). Results: The CGCs of PA and PM multiplied in form of multi-point blast, rotating end blast, schizogenesis and comb-shaped growth. Conclusion: The interference phase-contrast microscope is very helpful to the dynamic study on bacterial growth and the diversifying of bacterial multiplication might contribute to the stability of species.

Key words Pseudomonas aeruginosa; Proteus mirabilis; bacterial multiplication

一次换血成功治疗新生儿溶血症 1例

A case of neonate homolysis successfully cured with exchange of blood

郎 松* (第三军医大学附属西南医院儿科) 重庆,400038

“新生儿溶血病”是因母子血型不合而引起的免疫性溶血,严重时可直接威胁婴儿生命或造成神经后遗症。用换血疗法治疗严重的新生儿溶血症是最有效的方法。最近我科成功地对一名 Rh 血型不合溶血病新生儿施行了换血疗法。现报告如下:

1 临床资料

患儿,女,第三胎第三产,第一胎因重度黄疸于生后 2天即死亡。当时确诊为新生儿溶血症(RhD不合)。第二胎行人工流产,第三胎带环受孕,37 4周孕,孕期查母亲 RhD抗体效价为 1∶128,产前复查达 1∶256 其子代患新生儿溶血症可能性极大。1997年 7月 10日上午 8∶00对孕妇行剖宫产术,娩出一体重 3 000 g的新生儿。监测:出生时脐血 TB为 145.9μmol/L, DB 16.4μmol/L,立即予蓝光照射并行换血准备。11∶00时,TB升至 166μmol/L, DB 16μmol/L,常规生后数小时,TB上升至 68μmol/L,即应行换血术。而现 TB已达换血标准两倍有余,故即行换血术,手术顺利。生后及换血术后抗体效价及血红蛋白变化情况,见表 1,2

表 1 换血时的抗体效价变化情况

抗体	换血量				
	100 ml	150 ml	200 ml	300 ml	次日
直抗效价	###	##	+	(-)	(-)
木瓜酶	8	4	4	2	0
抗人体球蛋白	8	4	4	2	1

表 2 换血前后血红蛋白的变化情况

检查项目	10/6换血前	10/7换血后	11/7	12/7	13/7	14/7	18/7	21/7
红细胞(×10^{12}/L)	3.63	5.43	3.64	4.14	4.58	4.48	4.32	4.20
血红蛋白(g/L)	110	190	127	119	139	128	119	129
白细胞(×10^{9}/L)	13.2	20.3	11.8	9.9	9.0	9.5	14.8	10.5
直接胆红素(μmol/L)	166		169	168		170	70	45

生后 1月复查血红蛋白 119 g/L,3月时为 109 g/L, TB 28 μmol/L, DB 15μmol/L儿保检查正常。

2 讨论

换血能降低间接胆红素到安全水平,可以去除附着于红细胞上的抗体及血中游离抗体,阻止溶血及胆红素进一步形成。并部分纠正贫血,防止缺氧及心力衰竭,非其他方法可取代。本例患儿生后立即给予蓝光照射,输血浆等治疗,胆红素仍直线上升,故非换血不可,最终取得了满意疗效。换血疗法也可用于 G-6 PD缺乏症,药物中毒、败血症等所致溶血及早产儿较严重的生理性黄疸,国内时有报道[1]。

换血时机一定要把握好。否则即使患儿命可保住也会留下不同程度后遗症。既往我们曾有 1例患儿,因就诊换血时间较晚,虽换血成功,但小儿留有偏瘫。

血源的保证非常重要。由于输血科的大力协助,保证了 Rh阴性 ABO与患儿同型血的供应,使换血一次成功,既往也有 1例因无 Rh阴性血而不得以取 Rh阳性血,致换血后胆红素再度升高而行第二次换血。

换血的速度可通过监测心率得以控制。我们体会:当心率快时应适当放慢输入速度,增加抽出血量。

防治感染是换血成功不可缺少的保证,由于手术时间较长,术后病房的消毒隔离,给以适当的抗生素是必要的。

关键词 Rh溶血;换血疗法

中图法分类号 R722.18

参考文献

1 陈克正,赖剑蒲.同步换血治疗新生儿败血症.中国实用儿科杂志,1997,12(2):117

(收稿:1998-01-27;修回:1998-11-06)

(编辑 张大春)

* 郎 松,男,27岁,住院医师,硕士研究生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net