DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.005

绿脓杆菌水中生存的非周期性变化观察*

邓国宏** 高强国 王 源 徐启旺 (第三军医大学临床微生物学教研室) 重庆, 630038

提 要 目的: 观察绿脓杆菌繁殖体和纤细状菌在水中的生存过程,以证实绿脓杆菌纤细状菌在自然界的普遍存在性及其生理意义。方法: 将绿脓杆菌纤细状菌和繁殖体接种于无营养成分的生理盐水和蒸馏水中,置于37℃和28℃,动态观察其形态变化过程及存活情况。结果: 在水中,绿脓杆菌能出现纤细状形态和短小状形态的交替,交替过程中大部分细菌死亡,少量细菌发生潜-生序性变化得以存活。结论: 绿脓杆菌纤细状菌和繁殖体在水中的变化过程具有确定的非周期性(Definite nonperiodity),其生存过程呈一类似衰减的阻尼振荡过程。

关键词 绿脓杆菌;潜-生序;确定的非周期性

中图法分类号 R378.991; Q937

微生物在不同培养基上的形态变化早已为人们所熟悉,细菌在海水中的形态变化现象早已引起人们的注意[1,2],但对细菌在淡水中生存的过程尚未有深入的研究。徐启旺等[3,4]在进行生物波理论的研究中,把细菌的形态变化纳入潜-生序性变化(Latent-Growth sequency change)的范畴,认为细菌在波动培养条件下,能在潜生态和生长态之间出现交替变化。细菌在这二种状态之间交替,出现波动生长,称为潜-生序。其机理在于生物耗散和生态环境相统一,生态环境的变化引起细菌自组织[5],发生群选择[6],导致细菌潜-生序性变化的发生。本实验将绿脓杆菌(Pseudomona aeruginosa, PA)在波动培养系统中发生潜-生序性变化的纤细状菌(处于潜生态)和绿脓杆菌繁殖体(处于生长态)接种于生理盐水和蒸馏水中,置于37℃和28℃,观察其形态变化及生存过程,以建立绿脓杆菌在水中生存的复杂波动模型,探讨绿脓杆菌在自然界复杂环境中的生存途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 波动生长系统的制备 按文献[4]的方法制备

1.1.2 LB培养基 按文献[7]的方法制备

1.1.3 肉膏汤 牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g,氯化钠 5 g,蒸馏水 1000 ml 各成分混合,加热溶解后矫正 pH 7.4~7.6,分装试管,每管 1ml, 103.43 kPa高压灭菌 20 min, 4℃冷藏备用。

1.1.4 PA菌种 所有 PA菌株经鉴定均满足绿脓杆菌最低鉴定特征。

1.1.4.1 PA繁殖体 A株: 绿脓杆菌血清 8型(成都生物制品研究所提供); B~D株: 本校烧伤研究所分离鉴定。

1.1.4.2 PA纤细状菌 甲~戊株均为绿脓杆菌血清 8型(成都生物制品研究所提供),经波动生长系统长期培养形成的能稳定传代的纤细状菌。甲株: 波动生长系统传 30代, LB平板培养 24 h,室温放置 3 d 乙株: 波动生长系统传 32代, LB平板培养 24 h 丙株: 波动生长系统传 32代, LB平板培养 24 h, 4℃放置 20 d 丁株: 波动生长系统传 30代, LB平板传 2代。戊株: 波动生长系统传 25代,室温放置 77 d 以上各株细菌用以代表绿脓杆菌不同的来源和不同的生长状态。

1.2 方法

1.2.1 绿脓杆菌血清 8型纤细状菌的获得 按文献[4]的方法,经绿脓杆菌波动培养系统连续传 20代,可获得能稳定传代的绿脓杆菌纤细状菌。

1.2.2 将各株菌的培养物分别用蒸馏水和生理盐水在无菌试管中制成 10×10^{10} /ml菌悬液,每管 3 ml,按如下设计进行实验:

1.2.2.1 Ⅰ组 甲株和 A株细菌分别接种于蒸馏水和生理盐水,置于 28℃和 37℃,各 1管。

1.2.2.2 Ⅱ组 乙株和 B株细菌分别接种于蒸馏水和生理盐水中,置于 28℃和 37℃,各 1管。

1.2.2.3 Ⅲ组 丙、丁、戊株和 C、D株细菌分别接种于蒸馏水和生理盐水中,置于 37℃,各 1管。

1.2.3 接种后作以下三方面的动态观察,此过程中每天向试管中加入无菌蒸馏水以保持菌液体积不变。

1.2.3.1 存活情况的观察 每隔 3 d从各管中各取一接种环菌液接种于肉膏汤, 37℃培养 36 h,肉汤混浊者为"+",表示能生长(存活);肉汤清亮者为"-",表示不能生长(死亡)。

1.2.3.2 形态变化的观察 每隔 3 d从各管中各取一接种

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39370008

** 邓国宏,男, 25岁,硕士

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

环菌液涂片,火焰固定后以结晶紫染液染色1 min,光学显微镜油镜观察10个视野。

1.2.3.3 淡染细菌的电镜观察 在形态变化观察的基础上,将各管菌液各取1 ml以3 000 r/min,离心15 min后经3%戊二醛、锇酸双固定,系列丙酮液脱水处理,环氧树脂618包埋,超薄切片,醋酸铀染色后用 JEM-2000EX型透射电镜进行淡染细菌的观察。

1.2.3.4 显微培养观察 按文献[4]的方法,在各管细菌发生形态变化时,取菌液少许以 Opton EL-Einsatz相差显微镜,作显微培养观察,以确定不同形态细菌的存活情况。

2 结果

2.1 存活情况见表1~3

表1 Ⅰ组各管存活情况

Tab 1 The survival condition in groupⅠ

Time (day)	37℃				28℃			
	PS		DW		PS		DW	
	StrainⅠ	Strain A	StrainⅠ	Strain A	StrainⅠ	Strain A	StrainⅠ	Strain A
9	+	+	+	+	+	+	+	+
24	+	−	+	+	+	+	+	+
33	−	−	+	+	+	+	+	+
63	−	−	−	−	+	+	+	+
150	−	−	−	−	+	−	+	+

PS: physiological saline, DW: distilled water

表2 Ⅱ组各管存活情况

Tab 2 The survival condition in groupⅡ

Time (day)	37℃				28℃			
	PS		DW		PS		DW	
	StrainⅡ	Strain B	StrainⅡ	Strain B	StrainⅡ	Strain B	StrainⅡ	Strain B
12	−	+	+	−	+	+	−	+
21	−	+	+	−	−	+	−	+
57	−	−	+	−	−	+	−	+
99	−	−	+	−	−	+	−	+

PS: physiological saline, DW: distilled water

表3 Ⅲ组各管存活情况

Tab 3 The survival condition in groupⅢ

Time (day)	StrainⅢ		StrainⅣ		StrainⅤ		Strain C		Strain D	
	PS	DW	PS	DW	PS	DW	PS	DW	PS	DW
6	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	−	+	−	+	+	+	+	+	+
90	−	−	+	−	+	+	+	+	+	+

PS: physiological saline, DW: distilled water

2.2 形态变化

2.2.1 5 d之内的变化 在接种后最初5 d内,各管均迅速发生以下变化:

纤细状菌 —— 断裂变 ——→ 黑短体
纤细状菌 —— 淡染变 ——→ 淡染或破碎的纤细状菌

繁殖体 —— 断裂变 ——→ 黑短体
繁殖体 —— 淡染变 ——→ 淡染或破碎的繁殖体

淡染变:细菌着色变淡,最后在光镜下几乎不可见。

断裂变:纤细状菌体整体或部分发生断裂,见图1

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

短变: 繁殖体由 4μm~ 5μm长的短杆菌变化成 1μm~ 2μm长的黑短体。

黑短体: 在光镜下着色深而清晰的菌体,圆形或短小杆状,比繁殖体短而小,与背景淡染波碎的细菌菌体形成极明显的对比,故称之为黑短体,见图 2

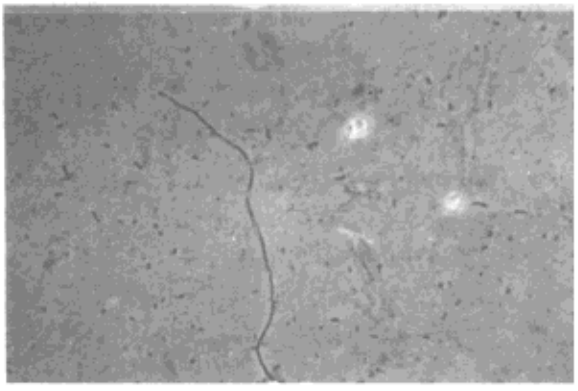


图 1　纤细状菌的断裂变(结晶紫染色　×　1000)

Fig 1　The breaking change of threadlike cells (Crystal violet stain,×　1000)

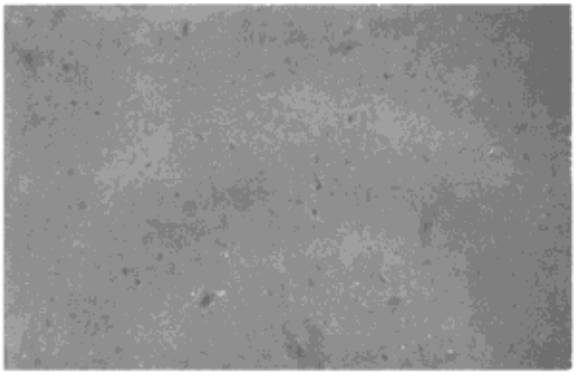


图 2　黑短体(结晶紫染色　×　1000)

Fig 2　The dark-short cells (Crystal violet stain,×　1000)

2.2.2　5 d后的后续变化　　各管中的淡染细菌经显微培养发现已经死亡,随着时间的延续在光镜下几乎不可见。黑短体的存活和变化情况不一,其中蒸馏水 28℃和 37℃甲株、蒸馏水 37℃和 28℃ A株、蒸馏水 28℃ B株、蒸馏水 37℃戊株、生理盐水和蒸馏水 37℃ C株中的黑短体均出现了后续复杂波动变化,而其余各管中的黑短体未出现后续变化。

(1)蒸馏水 28℃甲株

纤细状菌, 90%
(接种前)——→ 黑短体, 40% (第 5天)
短杆菌, 10%

纤细状菌, 5%　　纤细状菌, 5%
——→ (第 33天)——→ (第 69天)
黑短体, 20%　　黑短体, 15%

——→ 黑短体, 10% (第 120天)

(2)蒸馏水 37℃甲株

纤细状菌, 90%
(接种前)——→ 黑短体, 30% (第 5天)
短杆菌, 10%

纤细状菌, 8%
——→ (第 30天)——→ 黑短体, 5% (第 60天)
黑短体, 20%

——→ 无黑短体,细菌全为淡影(第 72天)

(3)蒸馏水 28℃ A株

短杆菌, 100% (接种前)——→ 黑短体, 40% (第 5天)——→
纤细状菌, 10%　　黑短体, 15%
(第 30天)——→ (第 60天)
黑短体, 20%　　围绕纤细菌的群集体, 2%
——→ 黑短体, 10% (第 120天)

(4)蒸馏 37℃ A株

短杆菌, 100% (接种前)——→ 黑短体, 30% (第 5天)——→
纤细状菌, 10%
(第 33天)——→ 黑短体, 20% F(第 51天)——→
黑短体, 20%
黑短体, 10%
(第 60天)——→ 黑短体, 10% (第 66天)
中等长菌, 5%
——→ 细菌全为淡影(第 72天)

(5)蒸馏水 28℃ B株

短杆菌, 100% (接种前)——→ 黑短体, 30% (第 5天)——→
中等长菌及球形体, 5%
(第 51天)——→ 黑短体, 20% (第 90天)
黑短体, 20%

(6)蒸馏水 37℃戊株

纤细菌, 90%
(接种前 77天)——→ 短杆菌, 100% (接种前)
短杆菌, 10%

纤细菌, 10%
——→ 黑短体, 30% (第 5天)——→ (第 12天)
黑短体, 20%

——→ 黑短体, 20% (第 45天)——→ 黑短体, 5% (第 90天)

(7)生理盐水 37℃ C株

短杆菌, 100% (接种前)——→ 黑短体, 40% (第 5天)——→
纤细菌, 10%
——→ (第 2天)——→ 黑短体, 30% (第 36天)
黑短体, 30%
——→ 黑短体, 5% (第 90天)

(8)蒸馏水 37℃ C株

短杆菌, 100% (接种前)——→ 黑短体, 50% (第 5天)
纤细菌, 15%
——→ (第 15天)——→ 黑短体, 30% (第 36天)
黑短体, 30%
——→ 黑短体, 5% (第 90天)

以上所列的细菌形态均为视野中着色良好的细菌,其百分率是在光学显微镜下,10个油镜视野中细菌计数作平均估计而获得,指该形态菌的数量占视野中总的细菌数量(包括淡染细菌)的百分比。

2.2.3　可以看出,(1)~ (8)中,存活的细菌越来越少,并且有的管中,如 37℃蒸馏水甲株细菌,细胞在黑短体和纤细菌两种

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

形态之间交替,均类似于衰减的阻尼振荡过程,但周期和频率不定,我们称之为复杂波动变化。

2.3 淡染细菌的电镜观察

接种后第5天取各管菌液 1 ml,同时用绿脓杆菌繁殖体作对照,作透射电镜观察。结果表明,淡染细菌部分细胞壁、细胞膜溶解,胞质外流,呈现自溶表现,见图3 而绿脓杆菌繁殖体胞壁、胞膜均清晰完整,胞质正常,见图4

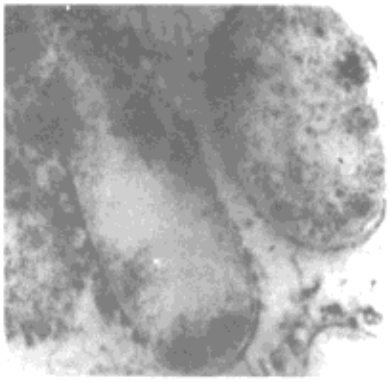


图3 淡染细菌和自溶 (TEM, bar= 200 nm× 10000)

Fig 3 The pale stained cells and autolysis (TEM, bar = 200 nm× 10000)

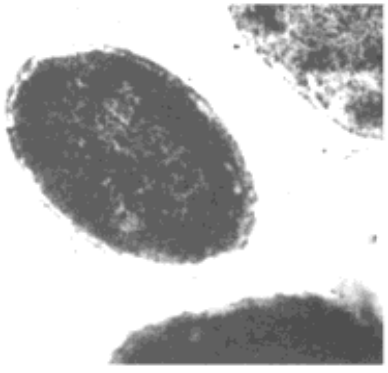


图4 胞质,胞膜完整的绿脓杆菌繁殖体 (TEM, bar = 200 nm× 20000)

Fig 4 PA vegetative cells with complete cytoplasm and cell membrane (TEM, bar= 200 nm× 20000)

2.4 显微培养观察

将各管细菌定期接种于 LB培养基上,做显微培养时发现,在接种后第5天,不发生短变或断裂的淡染菌体折光很暗,已不能生长;而黑短体折光亮而清晰,能生长。在 5 d以后,黑短体能生长,淡染菌体不能生长。5 d重新出现的纤细菌,结晶紫单染着色良好,显微培养观察,折光亮而清晰,能生长成纤细菌菌落。随着时间的推移,重新出现的纤细菌迅速淡染变、断裂变,留下淡染的菌体,不能生长。当试管中黑短体消失,细菌全为淡染时,管中细菌均不能生长而死亡。

黑短体作显微培养时发现其有返祖特性。一经合适的平板培养。纤细菌管中的黑短体可重新长成纤细菌,而繁殖体管中的黑短体中重新长成繁殖体(短杆菌)。

3 讨论

3.1 从实验结果可以看出,在水中不利的环境压力下,由于群体细菌中个体细菌的不均一性,不同的个体对环境反应不同。部分细菌自溶,并向系统中提供有利于细菌生存的成分,部分细菌发生潜 生序性变化而存活,发生群选择[5],最终只有少量细菌得以生存。

3.2 纤细状细菌和繁殖体细菌发生潜 生序性变化,成为黑短体;黑短体又发生潜 生序性变化,成为纤细菌。每一次潜 生序性变化,均伴随着部分细菌死亡,活菌数下降,试管中细菌的生命呈现衰减趋势。在封闭的试管环境中,黑短体的存活不能持久,最终将会死亡。封闭导致衰减。

3.3 对绿脓杆菌中水中生存过程的观察发现,变者生存,不变者亡。纤细状菌不可能一直保持纤细状,黑短体也不可能一直不变,不变最终将发生死亡,表现出确定性特点。同时绿脓杆菌的生存过程又表现出波动变化。接种 5 d后,9株绿脓杆菌中有 5株菌在不同的离子强度或温度条件下出现了后续波动变化。从实验结果可以看出,波动的频率和周期、纤细菌世代和繁殖体世代是否交替、黑短体的存活时间等,在实验中特定的环境下,都是不可预测的,具有非周期性,因而符合非线性物理学中混沌的特点。

试管是一个封闭的环境,只能导致衰减;若在自然界水环境中,黑短体一旦遇到合适的营养环境,便可重新增殖返祖,细菌数量急剧上升;这和实验中将黑短体接种于 LB培养基上,黑短体生长成细菌菌落是类似的。

3.4 在水中,繁殖体也可形成纤细状菌,说明绿脓杆菌纤细状菌在自然界存在的普遍性,纤细菌是绿脓杆菌的一种生理状态,其出现是环境压力和细菌自身发生潜 生序性变化相互作用的结果。与纤细状菌和繁殖体相比,黑短体的水中抵抗力最强(水中寿命> 150 d),可能为绿脓杆菌的一种低势能状态,推测黑短体可能是绿脓杆菌在水中的"芽胞"。

3.5 在抗生素次最小抑菌浓度(SubM IC)条件下绿脓杆菌也会出现纤细状菌。抗生素作用下绿脓杆菌的生存过程也是波动变化的。因此,本模型可能有助于抗生素临床治疗学中细菌耐药机理的研究。

3.6 绿脓杆菌在蒸馏水中波动变化和在生理盐水中

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

有显著的差异(7 1),可能与生理盐水维持细菌的代谢性酶活性导致细菌较旺盛地代谢自身有关。

参考文献

1 Kjelleberg S, Humphrey B A, Marshall K C. Initial phases of starvation and activity of bacteria at surfaces. Appl Environ Microbiol, 1983; 46(5): 978

2 Amy P S, Pauling C, Mortta R Y. Starvation-Survival processes of a marine vibrio. Appl Environ Microbiol, 1983; 45(3): 1041

3 徐启旺,刘俊康,袁泽涛等.微生物生长的群体、周期和波.自然杂志, 1992; 15(3): 19

4 刘俊康,郭刚,张守印等.生物波理论的研究.中国微生态学杂志, 1994; 6(6): 456

5 Haken H. Synergetics. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1977: 191~200

6 Zahaviand A, Ralt D. Social adaptions in Myxobacteria. In: Rosenberg E. Myxobacteria development and cell interactions. New York: Spring-Vezlag, 1984 215

7 邹福强,梁意昭,周桢林等.基因操作技术.广州:广东科技出版社, 1987; 290

(收稿: 1996-08-15;修回: 1997-03-21)

(编辑 张大春)

An observation on nonperiodic changes of pseudomona aeruginosa during their survival in water*

Deng Guohong, Gao Qiangguo, Wang Yuan, Xu Qiwang (Department of Clinical Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: Under such conditions as SubMIC antibiotics and artificial fluctuating culture, pseudomona aeruginosa (PA) undergoes latent-growth sequency change to develop from short-small cells to thread-shaped ones. To demonstrate the widespread existence of PA in nature, we observed its survival process in water. Methods: The thread-shaped cells and vegetatvie cells of PA were isolated and put into the normal saline and distilled water and then kept at 37℃ and 28℃ to observe the morphological changes and survival process of the cells dynamically. Results: In water, PA alternated between threadshaped form and dark-short form. Some bacterial cells died and others survived through latent-growth sequency change. Conclusion: The changes of thread- shaped cells and vegetative cells in water possess a definite nonperiodity and their survival process is just like a damping oscillation.

Key words pseudomona aeruginosa; definite nonperiodity; latent- growth sequency

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

鼻中隔软骨瘤一例报告

Report a case of chondroma of nasal septum

范文汉* 赵洪进 (第三军医大学附属西南医院耳鼻咽喉科) 重庆, 630038

朱英桂 (第三军医大学基础部病理学教研室) 重庆, 630038

软骨瘤多发生在四肢末端小的管状骨。发生在鼻中隔部位属罕见。我科遇一例,报告如下:

宋×× ,女, 26岁,已婚,汉族,四川省大竹籍,务农。因渐进性双侧鼻腔阻塞5年于1994年5月3日入我科。患者于1989年5月开始不明诱因出现双侧鼻腔通气不畅,伴双侧鼻腔流粘性分泌物。未进行治疗。同年10月,鼻阻塞症状加重并呈持续性,伴有粘液性分泌物自鼻后孔流至咽部。经当地医院中西药(何药不详)治疗,症状无改善。1990年上半年,双鼻腔阻塞感进一步加重,并开始出现前额部闷胀,头昏。1992年到县医院治疗,诊断为"鼻息肉",给予消炎药口服,症状仍无改善。1994年5月转来我院。自1993年9月开始,患者右眼视力急剧下降。目前右眼不能辨别手指。病后未发热,食欲睡眠正常,大小便无异常,家族中无类似疾病史。

(下转204页)

* 范文汉,男, 47岁,副教授、副主任医师

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