

# 普通变形杆菌的 L-型

## I. 利用玻片培养法在相差显微镜下研究 L-型的形成过程

李 辉 李天玲 雷爱德

(山东医学院微生物学教研组, 济南) (天津医学院摄影室, 天津)

细菌的 L-型是 Klieneberger<sup>[1]</sup> 在研究 *Streptobacillus moniliformis* 时所发现的一种特殊的细菌形态。Dienes<sup>[2]</sup>, Лебанев<sup>[3]</sup> 及其他学者证明, 在青霉素作用下变形杆菌可以形成 L-型。Stempen 和 Hutchison<sup>[4]</sup>, Pulvertaft<sup>[5]</sup>, Пеликов<sup>[6]</sup> 等研究了变形杆菌形成 L-型的过程。Pease<sup>[7]</sup> 用电子显微镜研究了变形杆菌的 L-型, 证明在青霉素影响下细菌的繁殖体失去胞壁形成原生质体, 原生质体进一步发生外形的改变, 形成一组大小和形态不规则的原生质物质 (Protoplasmic mass)。为了观察变形杆菌的活体标本在青霉素作用下形成 L-型的规律, 我们采用玻片培养法和相差显微镜定时摄影技术进行动力学研究。

本文报导利用这些方法进行 15 次重复实验的结果。

### 材料及方法

1. 菌种 我们使用的菌种系由腹泻病人粪便中新分离的、经鉴定为普通变形杆菌, 编号变, 株。在琼脂斜面上进行传代。

2. 培养基 肉浸膏 10 克; 蛋白胨 (Difco) 10 克; 食盐 3.5 克; 蔗糖 100 克; 琼脂 (Difco) 10 克; 蒸馏水加到 1000 毫升。上述培养基成分除蔗糖外, 经 15 磅高压灭菌 15—20 分钟, 灭菌后加入所需蔗糖, 10 毫升 20%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  及 15—20% 羊血清。青霉素的含量随需要而定 (10—1000 单位/毫升)。

3. 玻片培养法 我们根据 Foubrunc<sup>[8]</sup> 的油室法原理, 设计了简单的玻片培养法。在载玻片上, 先放上二块小玻璃条 (20 × 5 毫米), 二玻璃条间距离为 10—15 毫米, 在二玻璃条间滴入上述融化的培养基, 使培养基表面与玻璃条呈一平面, 待琼脂凝固后接种一白金耳培养 4 小时的菌液, 然后加上盖玻片, 并用石蜡密封四周。玻片培养置 37°C 保温台上进行观察。

4. 显微摄影 玻片培养放在保温台上用油浸镜头连续观察 3—15 天, 每隔 5—15 分钟进行拍照一次。

### 实验结果

#### 1. 预备试验

把普通变形杆菌变, 株接种在上述的青霉素-蔗糖平板上, 在 37°C 培养, 经 3—4 天可见形成典型的 3A 菌落 (图 1), 直径 50—100 微米, 菌落中心长入培养基中呈黑色, 边缘透明。

取 3A 菌落用压片法在相差显微镜下观察, 可见大量球状体及颗粒。球状体的大小

不等,最小者約为 2 微米,最大者可达 20 微米左右。在球状体中可見許多顆粒和大小不等的空泡状結構。在球状体外也可見到許多顆粒,其形态与球状体内的顆粒相同,大小約为 0.3—1 微米(图 2)。

在青霉素-蔗糖平板上形成的 3A 菌落,可以繼續传代。为了簡化传代手續及便于观察 L-型的生长情况,我們試用了試管高层培养法。在高层培养基中普通变形杆菌变<sub>2</sub>株的 L-型的生长較在平板上繁盛,在靠近培养基表面的区域形成許多菌落,直径約为 0.5 毫米左右。經過一星期左右,在菌落間常可形成絮状或网状結構,我們將这种菌落暫命名为“3C”菌落(见图 1, D)。

## 2. 普通变形杆菌变<sub>2</sub>株 L-型形成过程的动力学观察

用玻片培养法在相差显微镜下进行观察,經過 1 小时即可見菌体略有肿大,1½ 小时仍可見橫分裂,經過 3½ 小时有些菌体开始出現突起,菌体变为弯曲状。經過 4 小时,突起逐漸膨大成球状或鹿角状,此时可見菌体内的胞浆流入突起內,菌体变为透明,有的菌体完全消失,只留下球状体。在这些球状体内开始出現顆粒和空泡样結構。經過 4½—7½ 小时可見菌体完全消失,在視野內只見球状体,球状体繼續膨大,直径可达 5 微米左右。經過 24 小时后,有的球状体在胞浆內充滿顆粒,顆粒在胞浆內可呈弥散状分布或彼此連結,給人以网状結構的印象。有的球状体有空泡样結構,这些空泡样結構可以单独存在,或彼此連結,使球状体的外觀呈泡沫状。空泡样結構不断增大,有时直径可达整个球状体的 1/2。有的球状体破裂,放出顆粒。

經過 7 天左右,在玻片培养中逐漸形成菌落。菌落中心含很多顆粒,长入培养基中。菌落外围以球状体为主(图 1, A)。

## 討 論

細菌的 L-型是細菌在許多因素影响下形成的变异株 (Пимаков 及 Каган<sup>[9]</sup>)。用青霉素誘导細菌形成 L-型时,培养基中青霉素的含量甚为重要,各种菌株对青霉素的耐受性不同,因此,应当用不同剂量的青霉素进行試驗。我們試驗了 21 株变形杆菌,发现只有变<sub>2</sub>株在含 200 单位/毫升青霉素的培养基中,可以規律地形成 L-型,有的菌株,在含 1000 单位/毫升青霉素的培养基中,仍不易形成 L-型。

在誘导細菌形成 L-型时,所有作者都強調使用馬血清 (Weibull 等<sup>[10]</sup>、Dienes<sup>[11]</sup>)。馬血清可以清除培养基中某些成分的毒性作用。我們使用羊血清代替馬血清不但可以使变形杆菌順利地形成 L-型,而且也可以使伤寒杆菌、痢疾杆菌、大腸杆菌、葡萄球菌及白喉杆菌等形成 L-型,效果良好。

所有学者都用平板法进行細菌 L-型的传代。一般講来細菌的 L-型在微厌氧的环境下易于生长,同时細菌的 L-型非常脆弱,因此需要琼脂作支架,才能生长。高层培养基可以满足这二个条件,而且可以形成特有的“3C”菌落(图 1, D)。

我們用变<sub>2</sub>株的 L-型在高层培养基中已传种了 47 代,結果良好。

我們利用玻片培养在相差显微镜下对于普通变形杆菌变<sub>2</sub>株形成 L-型的过程,进行了动力学的观察。实验証明,在青霉素影响下,于 37°C 时变<sub>2</sub>株最先出現的变化是菌体的膨大(如果把培养物放置室温 12 小时,則除菌体膨大外,也可見菌体延长成絲状体),在此

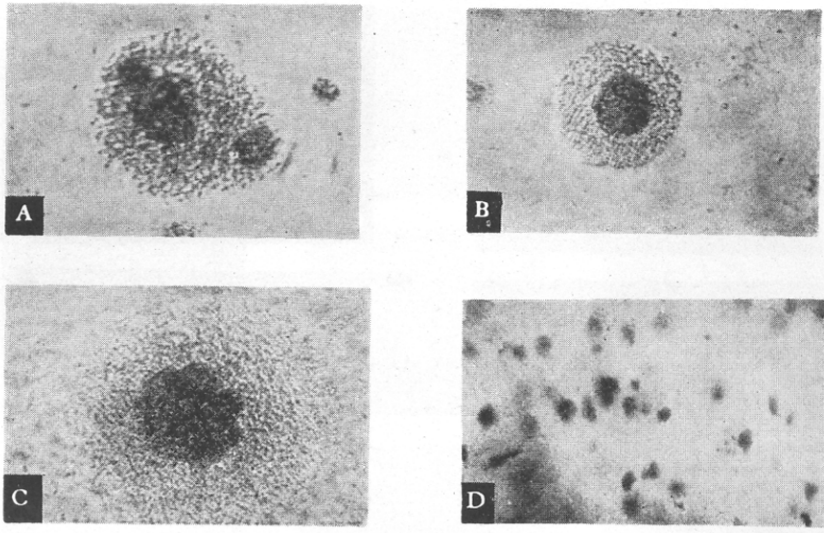


图 1 L-型的菌落

A, B. “3A”菌落； C. “3B”菌落； D. “3C”菌落。

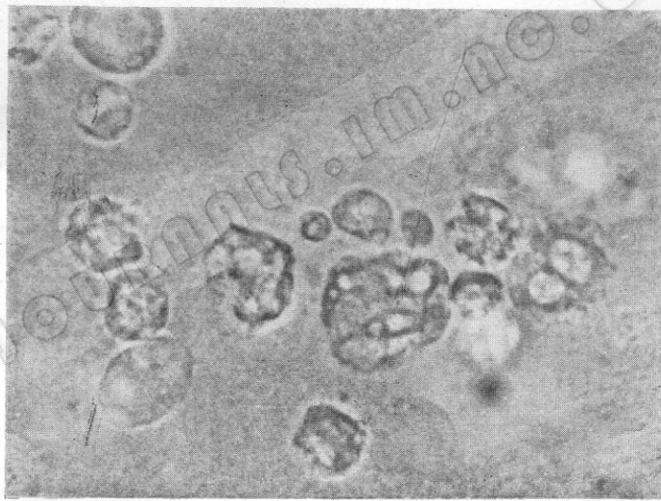


图 2 L-型的球状体

阶段仍可见有些菌体进行横分裂。在 37°C 继续培养可见从膨大的菌体中伸出各种形状的突起。随着时间的推移，突起继续膨大，形成球状体，此时已经完全不能见到横分裂的现象。当培养 7 小时左右时，随着球状体的不断涨大，菌体完全消失。在球状体内逐渐累积大小和排列方式不同的颗粒和空泡样结构(图 3)。

Park 及 Strominger<sup>[12]</sup> 证明，青霉素的作用机制是影响细菌利用在胞浆中形成的细胞壁前体物质，使细胞壁的合成受到障碍。根据 Bisset<sup>[13]</sup> 的意见，细菌在繁殖及分裂时，其核质的分裂，胞浆的合成及增长，以及细胞壁的合成与增长之间，应当有一个协调的关系，在所谓正常情况下，核质的分裂应当与细胞的分裂相协调，核质的分裂和胞浆的增长也应当与细胞壁的合成及分裂相协调。在这个协调过程中，细胞壁不断合成，并向心性地生长，最后由一个菌体细胞变成二个 (Couti 及 Gettner<sup>[14]</sup>、Chapman<sup>[15]</sup>)。

根据我们的观察，变<sub>2</sub>株在青霉素影响下形成 L-型的过程应该划分为两个阶段。

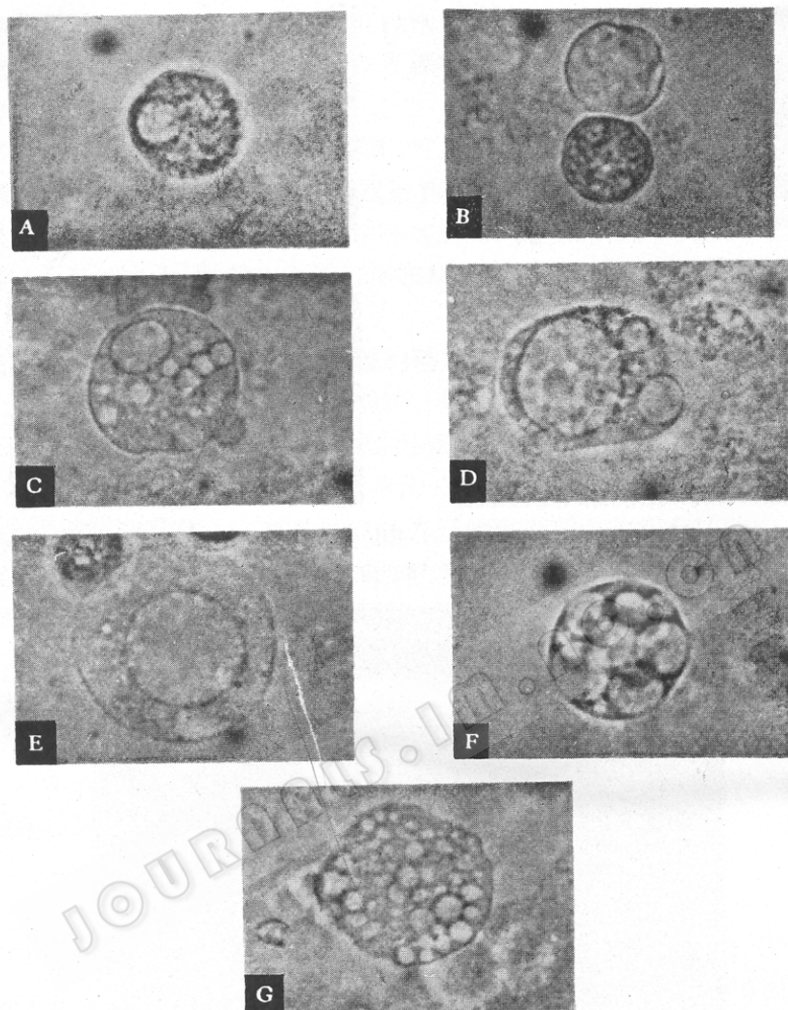


图3 变形杆菌 L-型在相差显微镜下的形态

- A, B. 充满颗粒的球状体; C, D, F. 球状体内空泡状结构;  
E. 球状体内不断增大的空泡样结构; G. 呈蜂窝状外观的球状体。

在第一个阶段时,细菌在青霉素影响下,由于胞壁合成机制的破坏,使得细菌失去了繁殖和分裂时的协调作用。此时核质的合成和分裂,与胞浆的增长虽继续进行,但是,由于胞壁合成机制发生障碍,引起胞壁的缺损,此时,不断增长的菌体细胞的内含物膨出,形成各种形式的突起,以致横分裂完全不能进行。最后由于胞壁完全消失,突起继续膨大,因而,形成大小不同的球状体(图4)。由于核质的分裂与细胞分裂的协调作用遭到破坏,细菌虽然停止进行横分裂,但是核质的合成与分裂仍在继续进行,因此,在球状体的胞浆内累积了愈来愈多的颗粒和空泡样结构。我们用 Feulgen 染色和吖啶橙荧光染色法证明,这些颗粒和空泡样结构含有核质的成分。关于这个问题将在另一篇报导中进行讨论<sup>[16]</sup>。

球状体的颗粒逐渐累积,当培养基中琼脂含量适合时,经过3—7天,形成L-型所特有的“油煎鸡蛋”样的典型菌落(fried egg<sup>[17]</sup>)。

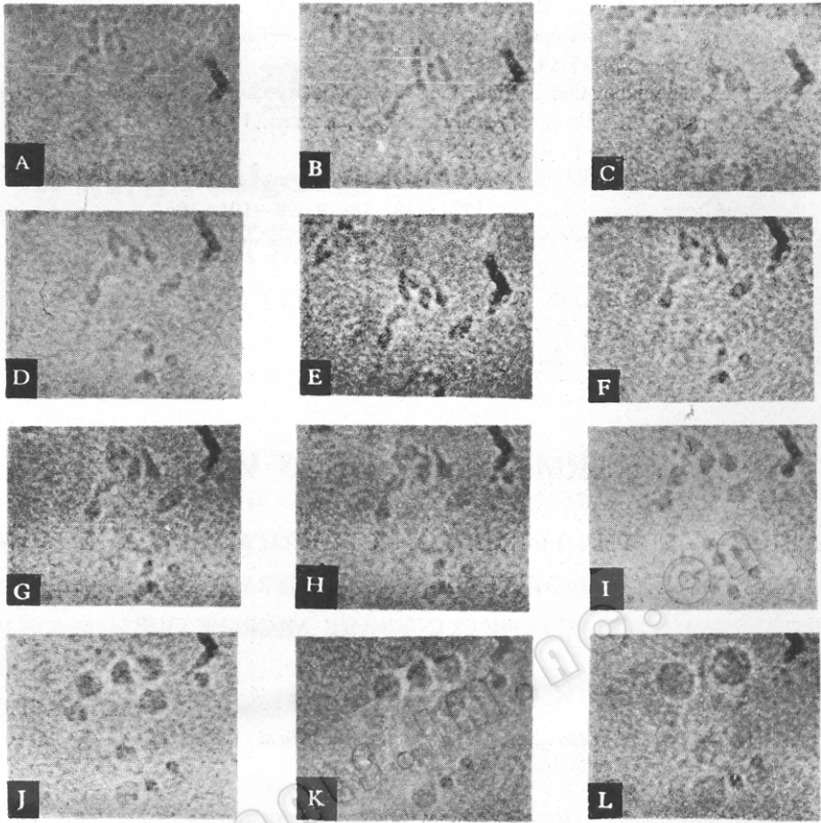


图 4 变形杆菌形成球状体的过程

- A. 1 小时(接种后); B. 1  $\frac{1}{2}$  小时; C. 1  $\frac{1}{2}$  小时;  
 D. 3  $\frac{1}{2}$  小时; E. 3  $\frac{1}{2}$  小时; F. 4 小时;  
 G. 4  $\frac{1}{2}$  小时; H. 5 小时; I. 6 小时;  
 J. 7  $\frac{1}{2}$  小时; K. 8 小时; L. 10 小时。

这样形成的 L-型, 很不稳定, 当去了青霉素时很容易返回为细菌形态。因此, 在 L-型形成的第二阶段, 经过不断传代, L-型逐渐稳定, 当去了青霉素以后 L-型不再返回为细菌形态。传代的次数因菌株而异。

## 总 结

本文讨论了在青霉素影响下普通变形杆菌变株形成 L-型的过程。利用玻片培养法在相差显微镜下观察证明, L-型的形成可分为两个阶段, 第一个阶段是胞壁合成机制破坏, 细菌失去繁殖和分裂的协调作用, 形成球状体和颗粒; 第二阶段是 L-型的稳定阶段。

本文也讨论了 L-型形成的某些培养条件。

## 参 考 文 献

- [1] Klieneberger, E.: *J. Pathol. & Bacteriol.*, 40:93, 1935.  
 [2] Dienes, L.: *J. Bact.*, 57:546, 1949.  
 [3] Левашев: Антибиотики, 1959.  
 [4] Stempen H. and Hutchison, W. G.: *J. Bact.*, 61:321, 1951.

- [5] Pulvertaft R. J. V.: *J. Pathol. & Bacteriol.*, **65**:175.  
[6] Пешков, М. А.: Цитология бактерий. Изд. АН СССР, М.—Л., 1955.  
[7] Pease, P.: *J. Gen. Microb.*, **17**:64, 1957.  
[8] Fonbrune, P.: Методы микроманипуляции, перевод с французского, Изд. Ил, Москва, 1951.  
[9] Пимаков, В. Дакаган Г. Я.: Биология-формбактерий, медгиз, 1961.  
[10] Weibull, C. & Lundin, B. M.: *J. Bact.*, **81**:812, 1961.  
[11] Dienes, L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **68**:589, 1948.  
[12] Park, J. T., Strominger J. L.: *Science*, **125**(3238) 18: P. 99—101. 1957.  
[13] Bisset, K. A.: In *Bacterial Anatomy*, Symp. Soc. Gen. Microbiol., **6**:181, 1956.  
[14] Conti, S. F. & Gettner M. E.: *J. Bact.*, **83**:544, 1960.  
[15] Chapman, G. B.: *J. Bact.*, **79**:132, 1960.  
[16] 李 輝等: 微生物学报, **10**(4):, 503—507 1964.  
[17] Razin, S., & Ofra O.: *J. Gen. Microbiol.*, **24**:225, 1961.

## THE L-FORM OF *PROTEUS VULGARIS*

### I. A STUDY ON THE FORMATION OF *PROTEUS VULGARIS* WITH SLIDE CULTURE METHOD AND OBSERVATIONS MADE UNDER PHASE CONTRAST MICROSCOPE

LI HUI, LI TIEN-LIN

(Department of Microbiology, Shangtung Medical College, Chih-nan)

LEI AI-TE

(Tientsin Medical College, Tientsin)

The formation of the L-form of *Proteus vulgaris* under the influence of penicillin was studied by the slide culture method and phase-contrast microscopy. The formation of the L-form of *Proteus vulgaris* could be divided into two stages. The first stage was a destruction of the synthetic mechanism of the bacterial wall and the loss of the synchronous effect of its growth and division, resulting in the formation of spheroplasts and granules; the second stage was the process of the stabilization of the L-form.

Some of the cultural requirements in inducing the L-form formation are discussed.