

# 细胞壁缺陷细菌生物氧化特性的观察

王 和 陈峰宏

(贵阳医学院微生物学教研室 贵阳 550004)

关键词 细菌 L-型, 生物氧化, 周质空间

分类号 Q932

在地球历史的无氧时期, 发酵曾是地球生物获取能量的唯一方式。经过漫长的自然演变过程, 今天地球上的许多生物已具备了复杂的氧化发酵获能机制。然而, 却依然存在着以发酵为主要获能方式的古老代谢类型的生物。一般认为, 真核细胞是由原核细胞演变形成<sup>[1~3]</sup>。许多研究也充分证实, 原核细胞丧失细胞壁是使其能够发生演变的重要因素<sup>[3~6]</sup>。细菌对氧需求的差异和对氧渐进依赖的现象, 展示了一个微妙的演变过程。为探讨细胞壁对细菌代谢特征演变的影响, 我们观察了对氧需求不同的几种细菌成为 L 型后的某些代谢活性, 现报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* Cowan 1), 大肠杆菌 (*Escherichia coli* ATCC 25922), 蜡样芽孢杆菌 生物 4 型 (*Bacillus cereus* biotype 4), 均为本室保存菌种。

### 1.2 培养基

1.2.1 L 型培养基: LEM 琼脂平板<sup>[7]</sup>。

1.2.2 糖发酵培养基: 加热融化 LEM 并冷至 50~60℃ 时, 分别加入酚红至终浓度为 0.02% 以及葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇或蔗糖至终浓度为 1%。

1.2.3 氰化钾培养基: 加热融化 100 ml LEM 并冷至 50~60℃ 时, 加入 5% 氰化钾液 4 ml。

### 1.3 诱导剂

青霉素 G 钠注射剂, 用无菌蒸馏水稀释成 5 万单位/ml, 取 0.1ml 浸没 10 张滤纸片 (直径 5mm), 制成青霉素纸片。

### 1.4 L 型诱导和培养

1.4.1 有氧诱导和培养: 取各菌种 16h 肉汤培养物 0.01ml 接种于 LEM 平板, 涂布均匀后放青霉素纸片, 置烛缸内 37℃ 温箱培养。L 型生长后, 取典型 L 型油煎蛋样菌落或 L 型圆球体 (L-spheroplasts) 接种 LEM 平板, 置烛缸内传代培养。

1.4.2 厌氧诱导和培养: 按有氧诱导和培养方法接种各菌种和放诱导剂, 置厌氧罐内 (化学产气法) 37℃ 培养。L 型生长后, 取典型菌落传代厌氧培养。

### 1.5 糖发酵试验

取金黄色葡萄球菌的 L 型油煎蛋样菌落接种各糖发酵培养基, 置烛缸内 37℃ 培养。另取金黄色葡萄球菌细菌型菌液 (50~100 个 CFU/ml) 0.1ml 接种各糖发酵培养基, 置烛缸内 37℃ 培养。

### 1.6 氰化钾抑菌试验

按 L 型诱导和培养方法将各菌种分别接种于氰化钾培养基上,放诱导剂后置烛缸内 37℃ 培养。取有氧诱导或培养的各菌种 L 型以及氰化钾培养基上诱导生长的 L 型接种氰化钾培养基传代,置烛缸内 37℃ 培养。

1.7 返祖菌鉴定

各培养基上 L 型返祖菌生长后,用革兰氏染色及葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇或蔗糖发酵试验鉴定。

2 结果

2.1 L 型的诱导

2.1.1 有氧诱导;金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌在 LEM 上培养 24 h 后,形成浓厚的不透明菌苔。青霉素纸片周围形成的抑菌圈直径分别为:金黄色葡萄球菌 19~20 mm,大肠杆菌 28~32 mm,蜡样芽孢杆菌 46~48mm。抑菌圈内可见 L 型油煎蛋样菌落、颗粒样菌落或 L 型圆球体。其中金黄色葡萄球菌 L 型油煎蛋样菌落数最多可见 1256 个/平板,大肠杆菌 L 型颗粒样或油煎蛋样菌落数最多 16 个/平板,蜡样芽孢杆菌 L 型圆球体呈非菌落形式分散或密布存在于平板表面(图 1,2)。

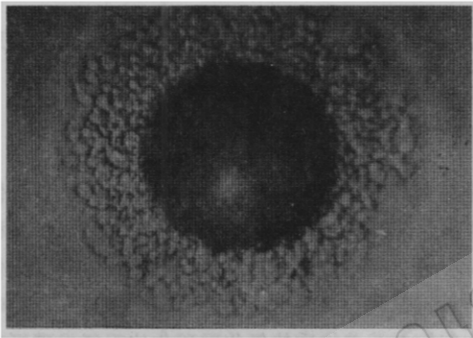


图1 有氧培养时典型的金黄色葡萄球菌L型油煎蛋样菌落(400×)

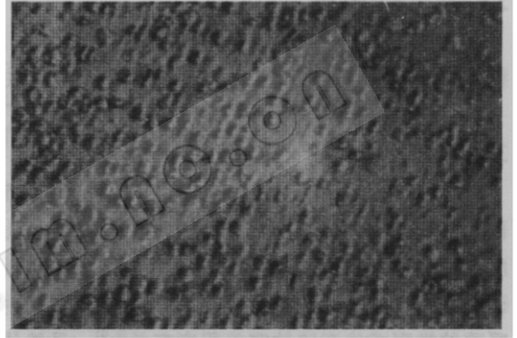


图2 有氧培养时蜡样芽孢杆菌L型圆球体(以非菌落形式存在于L型琼脂平板表面 400×)

2.1.2 厌氧诱导:培养至第 4 天,可见金黄色葡萄球菌和大肠杆菌形成淡薄的半透明菌苔,蜡样芽孢杆菌未见生长。青霉素纸片周围形成的抑菌圈直径分别为:金黄色葡萄球菌 18~21 mm,大肠杆菌 28~34 mm。抑菌圈内可见丝形体构成的油煎蛋样菌落,涂片未见 L 型圆球体(图 3)。其中金黄色葡萄球菌 L 型菌落数最多可见 980 个/平板,大肠杆菌 L 型菌落数最多 3 个/平板,未见蜡样芽孢杆菌 L 型生长。

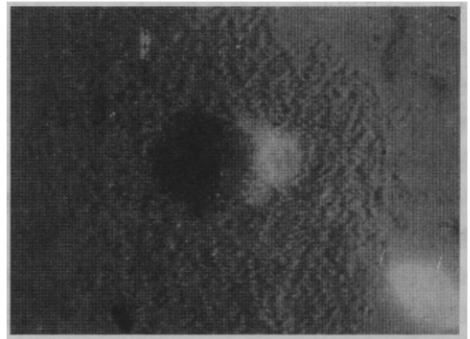


图3 厌氧培养时大肠杆菌L型油煎蛋样菌落(400×)

2.1.3 有氧培养:有氧或厌氧诱导的金黄色葡萄球菌 L 型传第一代培养物,每个平板上可见 5~480 个油煎蛋样菌落和 0~1560 个返祖菌落生长。继续传代可获得 L 型油煎蛋样菌落纯培养物和传 10 代仍可见大量 L 型菌落生长。有氧或厌氧诱导的大肠杆菌 L 型传第一代培养物每个平板上可见 0~8 个 L 型颗粒样菌落和密集生长的返祖菌落,未见油煎蛋样菌落。大肠杆菌 L 型继续传代均返祖。蜡样芽孢杆菌 L 型传第一代可见密集生长的返祖菌,未见 L 型生长。

2.1.4 厌氧培养:金黄色葡萄球菌 L 型有氧传三代后,厌氧培养未见生长,亦未见返祖菌生长;厌氧诱导的 L 型菌落传一代后,作厌氧培养即未见 L 型或返祖菌生长。

## 2.2 L型的代谢活性

金黄色葡萄球菌细菌型在各种糖发酵培养基上培养3 d后,可见菌落周围指示剂呈黄色;L型培养6d后,各种糖发酵培养基上菌落周围指示剂仍为红色。

## 2.3 氟化钾敏感性

**2.3.1 L型的诱导:**各菌种的细菌型在氟化钾培养基上生长形成淡薄的菌苔,如同厌氧培养的生长现象。青霉素纸片周围形成的抑菌圈直径为:金黄色葡萄球菌 26~30 mm,大肠杆菌 46~48 mm,蜡样芽孢杆菌 46~48 mm。抑菌圈内金黄色葡萄球菌L型菌落在40倍显微镜下看似油煎蛋样,但在100倍下则见菌落仅有较小的致密中心,缺乏构成周边的圆球体。大肠杆菌和蜡样芽孢杆菌均未见L型菌落或L型圆球体。

**2.3.2 L型的培养:**诱导或传代培养的金黄色葡萄球菌L型菌落或诱导的蜡样芽孢杆菌L型圆球体接种氟化钾培养基上培养3d未见L型或返祖菌生长。诱导的大肠杆菌L型菌落接种氟化钾培养基上,培养3d亦未见L型生长,但可见返祖菌生长。氟化钾培养基上诱导的金黄色葡萄球菌L型接种LEM或氟化钾培养基上培养3d,可见返祖菌生长,未见L型生长。

## 2.4 返祖菌的性质

各菌种的L型诱导物或传代培养物在LEM或氟化钾培养基上形成的返祖菌对葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇和蔗糖的发酵特性或在厌氧培养下的生长特性与原菌株细菌型一致。

## 3 讨论

细菌具有活泼的代谢活性,其可迅速摄取外界环境中的营养物质,进行分解代谢和合成代谢,以提供菌细胞快速生长繁殖所需要的能量和原料。一般根据细菌生长繁殖时对游离分子氧的依赖性 or 依赖程度不同,将细菌分为专性需氧菌、兼性厌氧菌、微需氧菌和专性厌氧菌四种类型。在不同细菌之间,其代谢特性也存在着一定的差异,通常认为细菌之间对氧的依赖性 or 代谢活性方面的差异同菌细胞具有的呼吸酶的类型 or 代谢酶的完善程度有关<sup>[8,9]</sup>。虽然认为生物细胞对营养物质的氧化磷酸化比无氧发酵可获得更多的ATP,因此前者能够更好地提供细胞生命活动所需能量的来源。但在需氧菌和厌氧菌之间,这两种获能方式形成的能量供应的差异,似乎同细菌的生长繁殖速度 or 代谢活性没有明显的关系。我们过去的研究<sup>[7,10]</sup>发现,各种细菌形成稳定L型后都丧失了对糖类的发酵作用,同时也丧失了其亲代细菌型具有的几乎全部生化反应活性。这些稳定L型的生长繁殖速度也变得十分缓慢,以致其在琼脂培养基上难以形成可见的生长现象。若外源提供能量试剂,则具有明显的促进这些L型细胞的生长繁殖速度的作用。本文结果进一步证实,细胞壁的丧失导致菌细胞对氧的依赖性和对氧化物的敏感性均显著增高,提示细胞壁的缺失使菌细胞仅保留了氧化获能这唯一的代谢机制。

氟化物可通过抑制细胞氧化呼吸链中某些递氢体的活性而影响细胞的氧化磷酸化过程,导致细胞能量匮乏或死亡<sup>[9]</sup>。本文结果证实,细菌及其L型在含氟化钾的培养基上形成的生长现象与厌氧培养形成的生长现象相似。表明细菌的有氧代谢机制受到氟化物或缺氧抑制后,可通过发酵代谢方式进行替获能,以支持菌细胞进行微弱的代谢活动和缓慢的生长繁殖。然而细菌丧失细胞壁成为L型后,即随之丧失了几乎全部发酵酶类,仅以需氧氧化作为L型细胞唯一的获能代谢方式。但这些L型重新合成细胞壁成为细菌型后,又可恢复同其亲代细菌型一致的各种代谢特性,提示细菌发酵酶类的生与存或活性的表达同细胞壁的健全程度密切相关。此可能由于细胞壁被破坏后,导致周质间隙(Periplasmic space)或膜壁界层(Membrane-wall interlayer)消失,以致聚集于此间隙内的发酵酶类不能固存所致。同时也表明L型获能代谢机制的改变在一定时期内尚未涉及基因的改变,所以当L型返祖后仍可恢复正常的发酵代谢机制。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Jiese A C. *Cell Physiology*, 1979, 31:35~52.
- [ 2 ] Freeman B A. *Textbook of Microbiology*. Philadelphia: WB. Saunders company, 1985. 59~127.
- [ 3 ] Cavalier-Smith T. *Nature*, 1975, 256:463~46.
- [ 4 ] Nishiyama Y, Yamaguchi H. *Microbiol Immunol*, 1990, 34:25~34.
- [ 5 ] Eda T, Kanda Y, Mori C. *J Bact*, 1997, 132:1024~10.
- [ 6 ] 王 和, 陈峰宏. 中国微生态学杂志, 1996, 8(3): 41~43.
- [ 7 ] 王 和. 微生物学通报, 1993, 20(2): 101~103.
- [ 8 ] 李影林. 临床微生物学及检验. 长春: 吉林科学技术出版社, 1991. 34~69.
- [ 9 ] Quayle J R. *Microbial Biochemistry*. Baltimore: University Park Press, 1979. 49, 85.
- [ 10 ] 王 和, 解莉亚, 徐 英. 贵州医药, 1989, 13(6):324~326.

## OBSERVATIONS OF CHARACTERISTICS OF THE MECHANISMS OF BIOLOGICAL OXIDATION OF CELL WALL-DEFICIENT BACTERIA

Wang He Cheng Zhenghong

(Department of Microbiology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004)

**Abstract** The L-forms were induced from *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* by  $\beta$ -lactam antibiotics and then observations on the properties of oxygen requirement, sugar fermentation and sensitive to cyanide of the L-forms were done. The results were shown that the L-forms derived from the obligate aerobe or the facultative anaerobe did not ferment sugars and were highly oxygen-dependent and more sensitive to cyanide than their parent bacteria. The metabolic activities which were same as the parent bacteria of the L-forms would return after the L-forms reverted to the typical bacterial forms. It was possible that the changes of biological oxidation mechanism were due to the deficiency of the cell wall which led to loss of the periplasmic space or the membrane-wall interlayer so that the enzymes for fermentation existed in the space could not be hold.

**Key words** L-form of bacteria, Biological oxidation, Periplasmic space