非高渗透压培养基培养细菌 L 型的研究

王 和

(贵阳医学院微生物学教研室，贵阳 550004)

摘要 本文用青霉素在高渗透压的 L 型培养基上，诱导金黄色葡萄球菌和白喉杆菌形成 L 型后，直接种入无血清亦无渗透压保护剂的非高渗透压培养基中，传代培养和观察其形态、培养及代谢特性。结果表明，金黄色葡萄球菌 L 型和白喉杆菌 L 型在非高渗透压培养基中，传代培养后，不能在高渗透压的 L 型培养基上生长形成菌落，和丧失了对多种糖发酵的能力。

关键词 L 型；渗透压；培养基；葡萄球菌；白喉杆菌

细菌 L 型在自然界、人或动物体内非高渗透压的各种组织和体液中广泛存在的现象，受到了人们的重视，并尝试用非高渗透压培养基培养细菌 L 型。现已发现某些细菌 L 型可在含渗透压保护剂的非高渗透压培养基中生长，或在逐渐降低培养基渗透压的情况下，并经较长时间训化以适应于非高渗透压培养基中生长 [1-4]。我们用青霉素在高渗透压的 L 型培养基上诱导细菌成为 L 型后，直接种入无血清亦无渗透压保护剂的非高渗透压培养基中传代培养，发现细菌 L 型对非高渗透压环境具有较强的抵抗力，现将结果报道如下。

材 料 和 方 法

1. 菌种：金黄色葡萄球菌 SA26001 和白喉杆菌 (本室保存菌种)。

2. 培养基：非高渗透压培养基为 1640 液 (由日水制药株式会社生产)， 1% 蛋白胨水，牛肉浸液；高渗透压培养基为 L 型鸡蛋培养基 (LEM) 平板 [5]。

3. L 型诱导：按文献 [5] 方法制备青霉素 G 纸片，在 LEM 平板上诱导金黄色葡萄球菌和白喉杆菌形成 L 型。

4. 非高渗透压培养：取 1640 液 4 ml，分装小方瓶内，加青霉素 G 使终浓度成 10U/ml。取 LEM 平板上形态典型的 L 型菌落种入青霉素 1640 液，置 37 ℃温箱内培养。L 型生长后，取 1ml 培养物经 0.22μm 孔径滤菌器过滤并种入含或不含青霉素的 1640 液，每周传代培养一次并革兰氏染色检查。

5. 培养特性的观察：取 1640 液传代培养的细菌 L 型培养物 0.5 ml 种入 4ml 1% 蛋白胨水、牛肉浸液或 LEM 平板， 37 ℃培养。

6. 生化试验：分别在 1640 液中加入葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖，使终浓度成 1%。种入 0.5ml 1640 液传代培养的细菌 L 型，37 ℃培养。

结 果

(一)L 型的形态

培养 24 小时后， LEM 上青霉素纸片周围抑菌圈内显微镜低倍镜下可见金黄色葡萄球菌 L 型呈油煎蛋样菌落 (图 1)；白喉杆菌 L 型呈颗

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

粒样 (G 型) 菌落或 L 型圆球体 (L−spheroplast) 分散存在于培养基表面。1640 液中 L 型细胞在显微镜低倍或高倍镜下呈圆球、卵圆、不规则或长丝状形态，半透明或不透明，沉于瓶底，不粘附瓶壁，不运动。滤过物镜下可见大量 L 型圆球体，革兰氏染色阴性。电镜下见葡萄球菌 L 型细胞缺乏细胞壁结构，呈不规则、“蜘蛛”样或圆球形，直径可小于 0.01μm(图 2 — 4)。

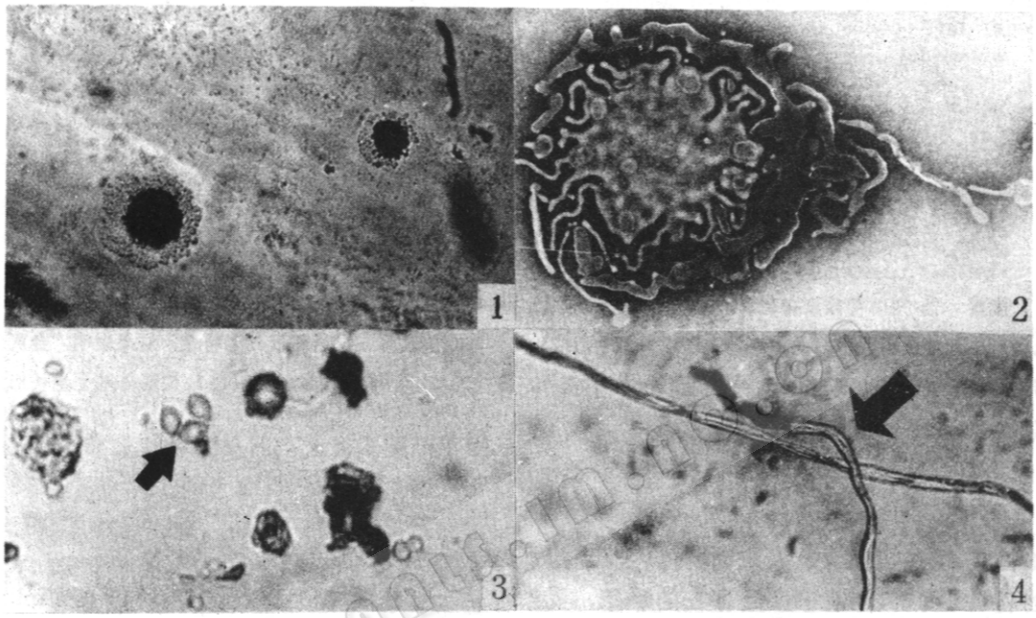

图 1 金黄色葡萄球菌 L 型的典型油煎蛋样菌落 (低倍，100×) 图 2 非高渗透压培养基培养的金黄色葡萄球菌 L 型 (透射电镜，7200×) 图 3 非高渗透压培养基中生长的白喉杆菌 L 型圆球体 (高倍，400×) 图 4 非高渗透压培养基中生长的白喉杆菌 L 型长丝体 (高倍，400×)

(二) 培养特性

金黄色葡萄球菌 L 型和白喉杆菌 L 型在含青霉素的 1640 液中传 2 代后，种入不含青霉素的 1640 液传代培养至 10 代仍未见返祖，种入蛋白胨水及牛肉浸液传 5 代培养未见返祖，在 LEM 平板上培养两周未见 L 型或细菌型菌落。金黄色葡萄球菌 L 型和白喉杆菌 L 型在各非高渗透压培养基中培养 1 周后镜下可见 L 型细胞密集生长，培养基清亮透明。

(三) 生化反应

金黄色葡萄球菌 L 型和白喉杆菌 L 型培养 30 天未见发酵各种糖，1640 液 pH 由 7.0 — 7.2 变为 7.6 — 7.8 。

讨 论

青霉素可干扰细菌细胞壁肽聚糖的合成而导致细菌细胞壁缺陷，使细菌原生质体不能抗御外界非高渗透压环境中水的渗入而死亡。但在高渗透压条件下，有些菌细胞不死亡而成为 L 型生存。因此认为细菌 L 型，尤其是革兰氏阳性细菌形成的 L 型须用高渗透压培养基培养 [1] 。Leon 等 [2] 曾在培养基中加入油酸 (oleic acid) 作渗透压保护剂，使一株链球菌 L 型适应于生理渗透压培养基中生长。Takahashi[3] 用逐渐降低培养基盐浓度方法使一株葡萄球菌 L 型在非高渗透压培养基中生长。本文将高渗透压 L 型培养基上青霉素诱导的金黄色葡萄球菌 L 型和白喉杆菌 L 型，直接种入无血清亦无渗透压保护剂的 1640 液培养和在非高渗透压的蛋白胨水及牛肉浸液中传代培养，表明革兰氏阳性细菌

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

形成的 L 型对非高渗透压具有较强的耐受力。

根据细菌 L 型在不含诱导剂的环境中是否容易返祖 (即细菌 L 型的稳定程度), 将 L 型分为不稳定 L 型 (unstable L−form) 、相对稳定 L 型 (relatively stable L−form) 和稳定 L 型 (stable L−form)[1] 。不稳定 L 型和相对稳定 L 型在不含诱导剂的培养基中易返祖，是临床上用高渗透压 L 型培养基经常检出的类型。稳定 L 型通常难以自发返祖。文献 [1,6,7] 报道细菌稳定 L 型可有基因的缺失、细胞内出现微管或胞浆膜含类固醇。本文将金黄色葡萄球菌 L 型和白喉杆菌 L 型种入无青霉素的非高渗透压培养基中多次传代培养不能返祖，表明其已成为稳定 L 型并且丧失了对多种糖发酵的能力和不能在高渗透压的 L 型培养基上生长形成菌落。

细菌感染机体后可受特异性抗体及补体、溶菌酶、胆汁、抗生素等因素作用成为 L 型并进入机体组织或细胞内，成为适应机体生理渗透压环境的 L 型 [1,2,4,8] 。这些潜伏在机体内的细菌 L 型可引起细胞及组织的慢性损害，并可成为某些传染病非流行期病原体保存的形式。L 型一旦返祖，则可导致疾病的急性发作或传染病的暴发和流行。通常用高渗透压的 L 型培养基分离培养和研究细菌 L 型，以致难以检出对高盐环境敏感的细菌及其 L 型或许多适应机体生理渗透压环境的稳定 L 型，更难以观察到在生理渗透压环境条件下细菌 L 型的特性。本文结果表明，非高渗透压液体培养基清亮透明，培养物可直接过滤获得细菌 L 型的纯培养物，利于较长时间的培养和显微镜下直接观察单个 L 型细胞的形态、生长特征和研究其生物学、致病性等特性；利于分离培养在高渗透压的 L 型培养基上不能生长的细菌 L 型。因此，非高渗培养法对于细菌 L 型的研究和分离培养是一种有效可行的方法。

参 考 文 献

1. Domingue G.J.: Cell Wall−deficient bacteria, Addison−Wesley publishing company, London,1 — 110,1982.
2. Leon O. et al.: *Infect. Immun.*, **13**:252,1976.
3. Takahashi T: Japan *J. Exp. Med.*, **50**:73, 1980.
4. Strickberger M W: Genetics, 3d. Macmillan publishing company, N.Y. 754, 1985.
5. 王和: 贵阳医学院学报, **13**:42, 1988 。
6. Eda T: *J.Bact.*, **132**:1024, 1977.
7. Nishiyama Y et al.: *Microbiol. Immunol.*, **34**:25, 1990.
8. 白常乐 (译): 地方病译丛, **3**:329, 1983 。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn