

细菌 L 型和一些肠道杆菌的电动力学研究

唐七义 王 和

(贵阳医学院微生物学教研室 贵阳 550004)

摘要 用电泳法研究了细菌 L 型及其亲代细菌型和一些肠道杆菌的电动力学特征。伤寒杆菌 L 型和葡萄球菌 Cowan 株 L 型的等电点与其亲代细菌型不同；普通大肠杆菌、普通变形杆菌的等电点与革兰氏阳性菌相似；白喉杆菌 L 型和葡萄球菌 Wood 株 L 型的等电点与其亲代细菌型无显著差异。电泳可使结晶紫染色的细菌脱去结晶紫，亦可使染色后经乙醇处理的普通大肠杆菌和伤寒杆菌脱色并在电场作用下泳动，但不能使染色后经乙醇处理的葡萄球菌脱色或泳动，痢疾杆菌、伤寒杆菌和肠道致病性大肠杆菌的等电点不同于普通大肠杆菌和普通变形杆菌；在一定 pH 范围内，电泳可将其分开。电泳电流具有杀菌作用，细菌 L 型和细菌型对电泳电流的敏感性无差异。电泳电流的杀菌作用与电压高低成正比，与缓冲液的 pH 值无明显关系。

关键词 细菌 L 型，电动力学，等电点，电泳

细菌具有带电现象。此特性与细菌的生长环境、染色性和凝集反应等有密切关系^[1]。电动力学 (electrokinetics) 研究对细菌感染诊断和治疗具有重要意义。我们用电泳法观察了细菌 L 型在电场中泳动现象、电流的杀菌作用和某些肠道杆菌的等电点及电泳特性，报道如下。

1 材料和方法

1.1 L 型

本室用营养琼脂传代培养的伤寒沙门氏菌 H901 (*Salmonella typhi*, St) L 型，金黄色葡萄球菌 Cowan I 和 Wood 46 (*Staphylococcus*

aureus Cowan I and Wood 46, Sc 和 Sw) L 型, 白喉杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*, Cd) L 型。

1.2 细菌型

各 L 型的亲代细菌型, 福氏志贺氏菌 I 型 (*Shigella flexneri*, Shf), 普通大肠杆菌 ATCC25922 (*Escherichia coli*, Ec), 肠道致病性大肠杆菌 (*Enteropathic E. coli*, EPEC) 和普通变形杆菌 O_{x19} (*Proteus vulgaris*, Pv), 均用营养琼脂传代培养。

1.3 缓冲液

按文献 [2] 配制一系列间隔值为 0.2 的 pH2.2, -8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 用于配制琼脂板和作电泳电极液。

1.4 琼脂板的制备

在 7×2.5 cm 的玻片上加 0.5% 琼脂 4ml。每次电泳琼脂板均用与该次电泳电极液 pH 一致的缓冲液配制。

1.5 菌液的制备

用每次电泳电极缓冲液洗脱培养 18-24 小时的各 L 型和细菌型的菌苔并洗三次, 稀释成 9×10^7 /ml。

1.6 电泳

取各 L 型及细菌型菌液分别加于琼脂板的槽内, 电压 20V/cm 板长; 电泳 30min。

1.7 分离电泳

取普通大肠杆菌、普通变形杆菌、伤寒沙门氏菌和福氏志贺氏菌的菌液分别等体积混合成 Ec-St、Ec-Shf、Pv-St 和 Pv-Shf 混合菌液, 在 pH4 条件下电泳 30min。取两极菌液分别与兔抗伤寒沙门氏菌血清 (凝集效价 1:1280) 或志贺氏菌诊断血清 (上海生物制品研究所) 做

玻片凝集, 并接种营养琼脂平板 37℃ 培养。

1.8 电流杀菌作用

各 L 型和细菌型分别在 pH4 和 7、电压 20 和 50V/cm 板长下电泳, 于不同时间取电泳物接种营养琼脂平板, 37℃ 培养。

1.9 染色电泳

取葡萄球菌 Cowan、普通大肠杆菌及伤寒沙门氏菌菌液 3000r/min 离心 10min。弃上清, 加革兰氏结晶紫 0.2ml 染色 1min, 用 pH7 缓冲液洗至无紫色脱下。其中一组用无水乙醇处理 5min 后再用 pH7 缓冲液洗三次。在 pH7、电压 20V/cm 板长下电泳 30min 后, 取电泳物置显微镜下观察菌体颜色。

2 结果

2.1 L 型和细菌型的泳动特征

葡萄球菌 Wood 细菌型、伤寒沙门氏菌 L 型和白喉杆菌 L 型在 pH2.2-2.6 时不移动, pH2.8 以上时移向正极。金黄色葡萄球菌 Wood L 型和 Cowan、白喉杆菌、普通大肠杆菌及普通变形杆菌的细菌型在 pH2.2-2.4 不移动, pH2.6 以上时移向正极。伤寒沙门氏菌细菌型在 pH2.2-5.6 移向负极, pH5.8-7.0 不移动, pH7.2 以上时移向正极。福氏志贺氏菌在 pH2.2-6.2 移向负极, pH6.4-7.2 不移动, pH7.4 以上时移向正极。肠道致病性大肠杆菌在 pH2.2-5.0 移向负极, pH5.2-6.8 不移动, pH7.0 以上移向正极 (图 1)。

2.2 分离电泳

电泳物培养 48 小时未见细菌生长, 凝集试验结果见表 1。

表 1 分离电泳后玻片凝集试验结果

抗血清	混合菌液							
	Ec-St		Ec-Shf		Pv-St		Pv-Shf	
	负极	正极	负极	正极	负极	正极	负极	正极
伤寒沙门氏菌	+	-	-	-	+	-	-	-
福氏志贺氏菌	-	-	+	-	-	-	+	-

“+” 凝集, “-” 不凝集。

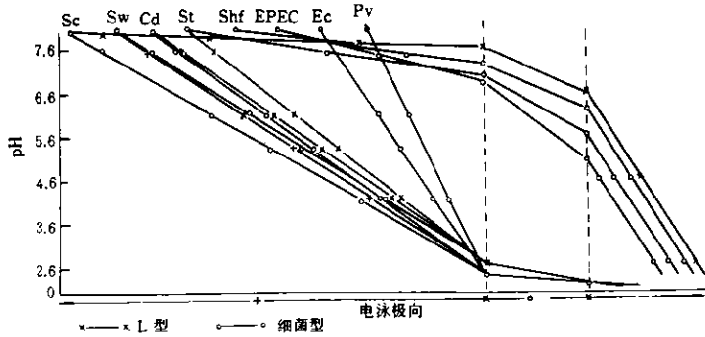


图1 细菌L型和细菌型在不同pH条件下电泳动向

2.3 电流杀菌作用

电泳物培养48小时未见L型或细菌型生长的最短电泳时间作为电流杀菌的最短时间。

不同电压对电流杀菌作用有显著影响，pH对电流杀菌作用无明显影响(表2)。

表2 电流在不同电压和酸碱度下的杀菌作用

电压 (V/cm 板长)	pH	L型				细菌型							
		Sc	Sw	Cd	St	Sc	Sw	Cd	St	Shf	EPEC	Ec	Pv
20	4	30*	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
	7	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
50	4	3	4	4	4	3	4	4	4	3	3	3	3
	7	3	3	4	4	3	3	4	4	3	3	3	3

* 电流最短杀菌时间 (min)

2.4 染色电泳

电泳中肉眼可见未经乙醇处理的菌释放出结晶紫。结晶紫移向负极，细菌移向正极(伤寒沙门氏菌不移动)，镜下见菌体无色。乙醇处理的葡萄球菌保留紫色且不移动，镜下见菌体紫色。但普通大肠杆菌和伤寒沙门氏菌释放出结晶紫，普通大肠杆菌移向正极，伤寒沙门氏菌不移动，镜下见菌体无色。

3 讨论

细菌含有丰富的蛋白质，因此在不同的pH值环境中可带正电荷或负电荷，在电场作用下可向负极或正极泳动。在某一pH值条件下细菌所带正、负电荷数相等，致使其在电场中不移动。通常认为，革兰氏阳性细菌的等电点为

pH2-3，革兰氏阴性细菌的等电点为pH4-5^[1]。本文用电泳法测得葡萄球菌和白喉杆菌的等电点为2.2-2.4，与文献[1]报道一致；但葡萄球菌Cowan L型的等电点显著升高，葡萄球菌Wood L型和白喉杆菌L型的等电点同其亲代细菌型一致，这可能与变异后多种特性的改变有关^[3]。肠道杆菌的等电点显示出较大的差异。病原性肠道杆菌(伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌、肠道致病性大肠杆菌)的等电点显著高于非病原性的普通大肠杆菌和普通变形杆菌。其中伤寒沙门氏菌成为L型后，丧失了细胞壁外膜、外膜蛋白、鞭毛及内毒素^[3-5]，其等电点亦显著降低。这表明，病原性肠道杆菌细胞表面蛋白质的性质不同于非病原性肠道杆菌。菌体表面电荷可能有助于病原性肠道杆菌

在肠粘膜上定植和侵袭。

试验结果表明,革兰氏阴性的普通大肠杆菌和普通变形杆菌的等电点与革兰氏阳性的葡萄球菌和白喉杆菌相似,与文献[6]报道一致。结晶紫染色后电泳可使染料与菌体分离,乙醇则可使葡萄球菌保留紫色和呈电荷中性。乙醇处理可能使葡萄球菌细胞壁蛋白质凝固而致使细胞壁通透性降低,菌体内的染料不能电场解离释出。革兰氏阴性细菌细胞壁肽聚糖少、通透性高和富含脂类,乙醇处理使脂类溶解而不能保留染料。

文献[7]报道,电流可使菌细胞电极化,影响细胞膜通透性或代谢等功能,导致细菌死亡。本文结果表明,电流的杀菌作用与细菌所处的pH环境无关,但随电流强度的增加,细菌死亡时间明显缩短。细菌L型和细菌型、革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌对电流杀菌作用的敏感性无明显差异,表明细胞壁不能保护细菌抵抗电流的杀菌作用,不同细菌对电流杀菌

作用的敏感性相似。

病原性肠道杆菌的等电点不同于非病原性肠道杆菌,用电泳法可将两者分离。电泳法在肠道杆菌分离或鉴定中的应用还有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] 陆德源. 医学、微生物学, 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 27-28, 128-134.
- [2] 朱 俭, 曹凯鸣, 周润琦, 等. 生物化学实验. 上海: 上海科学技术出版社, 1981. 298.
- [3] 王 和, 徐 英. 解薇亚. 贵州医药, 1990, 14 (5): 325.
- [4] 王 和, 徐 英, 解薇亚. 贵州医药, 1991, 15 (3): 141.
- [5] 王 和, 唐七义, 徐 英, 等. 中国微生态学杂志, 1992, 4 (4): 18.
- [6] Harden VP, Harris JO. J Bacteriol, 1953, 65(1): 198-202.
- [7] 中国医科大学. 医用物理学, 北京: 人民卫生出版社, 1978, 108-110.

STUDY ON ELECTROKINETICS OF BACTERIAL L-FORMS AND ENTERIC BACILLI

Tang Qiyi Wang He

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

Abstract Characterizations of electrokinetics of bacterial L-forms and some bacteria of enterobacteriaceae were studied by electrophoresis. It was determined that isoelectric points of L-forms of *Staphylococcus aureus* Cowan I and *Salmonella typhi* were different from that of their parent bacteria, and the points of *E. coli* and *P. vulgaris* were the same as those of gram-positive bacteria. L-forms of *C. diphtheriae* and *S. aureus* wood 46 kept the same point with that of their parent bacteria. The electrophoresis could decolorized the crystal violet of gram-negative bacteria previously treated with alcohol or not and gram-positive bacteria without treating with alcohol and moved these bacteria. The electrophoresis could not decolorized the crystal violet of gram-positive bacteria previously treated with alcohol or moved them. The isoelectric points of *S. flexneri*, *S. typhi* and enteropathic *E. coli* were different from that of *E. coli* and *P. vulgaris*. Both of them would be separated by the electrophoresis at a pH condition. The L-forms had the same susceptibility to electric as their parent bacteria. The L-forms or bacteria would be killed rapidly at higher voltage than lower voltage, but acidity of the buffer had not any influence on bacteria-killing of electric current.

Key words Bacterial L-form, Electrokinetics, Isoelectric point, Electrophoresis