

细菌在不同渗透压培养基上的青霉素敏感性

王 和 陈峥宏

(贵阳医学院微生物学教研室, 贵阳 550004)

摘要 在含 NaCl 0%~10%的 L 型培养基上观察金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌及大肠杆菌对青霉素 G 的敏感性和金黄色葡萄球菌 L 型对糖的发酵作用和卵磷脂酶活性。结果表明金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌和大肠杆菌在低于、等于或高于细菌细胞内渗透压的培养基上对青霉素的敏感性相似。少数存活的细菌 L 型不发酵糖和丧失卵磷脂酶活性,但返祖菌可恢复糖发酵和卵磷脂酶活性。提示细菌细胞内、外渗透压差不是唯一的导致细胞壁缺陷细菌死亡的原因。而胞质周围间隙的破坏,导致其内含酶类的丧失,可能是细胞壁缺陷细菌死亡的重要机制。

关键词 青霉素, 细胞壁, L 型, 胞浆膜, 渗透压

通常认为青霉素通过在细胞壁合成中同转肽酶结合而抑制肽聚糖的交联,使细菌不能构建完整的坚韧的细胞壁,致使较低渗透压环境中的水渗入具有高渗透压的菌细胞内,导致菌体破裂死亡^[1~3]。细菌细胞内、外渗透压差被认为是致细胞壁缺陷细菌死亡的唯一原因。本文用青霉素在不同渗透压的培养基上做抑菌试验,观察在低于、等于或高于细菌细胞内渗透压培养基上,细菌对青霉素的敏感性及细胞壁缺陷细菌的代谢酶活性,探讨细胞壁缺陷细菌死亡的机制。

1 材料与方 法

1.1 菌种

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) Cowan I, 蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*) 生物 4 型, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ATCC 25922。

1.2 培养基

1.2.1 渗透压培养基:按文献[4]用蒸馏水制备蛋黄液和蛋清,分别加入含不同浓度 NaCl 的基础培养基(蛋白胨 1%, 酵母浸出粉 0.5%, 琼脂 0.8%),制成 L 型鸡蛋培养基(LEM)平板。

1.2.2 糖发酵培养基:在 5%NaCl LEM 中加

入酚红 0.02%和分别加入葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇或蔗糖,使终浓度成 1%,pH 7.6,倾注平板制成各种糖发酵培养基。

1.3 青霉素纸片

用蒸馏水稀释青霉素 G 钠注射剂成 $5 \times 10^4 \text{U/ml}$,取 0.1ml 浸没 10 张滤纸片(直径 5mm)。

1.4 抑菌试验

用 0.9% 盐水稀释各菌种 18h 营养琼脂培养物成 $1 \times 10^8 / \text{ml}$,分别取 0.1ml 涂布于各盐浓度渗透压培养基,放置青霉素纸片,置烛缸内 37℃ 培养 24h,测量抑菌圈直径。

1.5 L 型观察

每日在显微镜低倍镜下观察细菌 L 型菌落或 L 型巨形体。

1.6 返祖菌观察

经青霉素抑菌试验的各培养物继续培养至 48h,测量抑菌圈直径和计数培养 24h 时形成的抑菌圈直径内返祖菌落数。

1.7 L 型代谢试验

取抑菌圈内金黄色葡萄球菌 L 型油煎芽孢菌落或金黄色葡萄球菌细菌型菌液(0.9%盐

水稀释成 100~500cfu/ml)0.1ml 分别接种于各糖发酵培养基,置烛缸内 37℃ 培养,每日观察 L 型或细菌型菌落周围指示剂颜色变化和菌落周围有无白色沉淀圈出现。

2 结果

2.1 细菌对青霉素的敏感性

金黄色葡萄球菌在含 NaCl 0%~10%的 LEM 上均可生长,培养 24h 形成浓厚菌苔。蜡样芽胞杆菌和大肠杆菌在含 NaCl 0%~6%的 LEM 上可生长,培养 24h 形成浓厚菌苔,但在 7%~10%NaCl LEM 上未见生长。各培养物青霉素纸片周围可见明显的抑菌圈。根据革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌细胞内渗透压的特征,将含 NaCl 0%~2% (毫渗透压低于 684mOsm/l, 37℃) 的 LEM 分为低于金黄色葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌细胞内渗透压的低渗透压培养基组;含 NaCl 3%~4% (毫渗透压为 1026~1037mOsm/l, 37℃) 的 LEM 为同金黄色葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌细胞内渗透压相似的等渗透压培养基组;含 NaCl 5%~10% (毫渗透压为 1709~3419mOsm/l, 37℃) 的 LEM 为高于金黄色葡萄球菌细胞内渗透压的高渗透压培养基组,含 NaCl 5%~6% 的 LEM 为高于蜡样芽胞杆菌细胞内渗透压的高渗透压培养基组。含 NaCl 0%~0.5% (毫渗透压低于 171mOsm/l, 37℃) 的 LEM 为低于大肠杆菌细胞内渗透压的低渗透压培养基组;含 NaCl 1%~2% (毫渗透压为 342~684mOsm/l, 37℃) 的 LEM 为同大肠杆菌细胞内渗透压相似的等渗透压培养基组;含 NaCl 3%~6% (毫渗透压为 1026~2051mOsm/l, 37℃) 的 LEM 为高于大肠杆菌细胞内渗透压的高渗透压培养基组。分别计各组培养基上抑菌圈平均直径,可见不同渗透压培养基上抑菌圈直径无显著差异(图 1)。

2.2 L 型及其返祖性

在含 NaCl 3%~10%LEM 上抑菌圈内可见金黄色葡萄球菌 L 型油煎蛋样菌落或非菌落形式存在的 L 型巨形体;在含 NaCl 2%

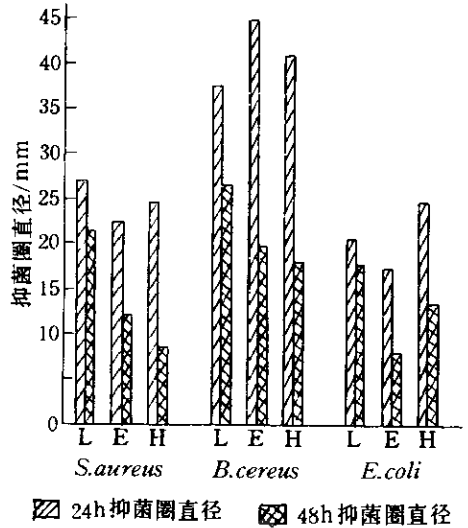


图 1 不同渗透压培养基上抑菌圈直径及其变化

L: 低渗透压培养基组, E: 等渗透压培养基组, H: 高渗透压培养基组

~6%LEM 上可见蜡样芽胞杆菌或大肠杆菌的 L 型巨形体或颗粒样或油煎蛋样菌落。各菌株 L 型巨形体数或 L 型菌落数随培养基盐浓度增加而显著增多。金黄色葡萄球菌 L 型在 3%NaCl LEM 上每个平板最多菌落数 3 个,在 10%NaCl LEM 上每个平板最多菌落数可达 318 个。各菌种的 L 型巨形体在 2%或 3%NaCl LEM 上分散单个存在,显微镜下较难见到。但在 5%NaCl 以上盐浓度的 LEM 上密集生长,显微镜下清晰可见形态高度不规则,成非菌落形式存在培养基表面。但蜡样芽胞杆菌和大肠杆菌对 7%~10%NaCl 浓度敏感,不论细菌型或 L 型均不能生长(图 2)。

培养 48h,各菌种抑菌圈内可见返祖菌落生长。其中不含 NaCl 的 LEM 上抑菌圈内金黄色葡萄球菌返祖菌落数 0~1 个,蜡样芽胞杆菌未见返祖菌落,大肠杆菌返祖菌落数 0~9 个。各菌种的 L 型返祖菌落数随培养基中 NaCl 浓度增加而增多,抑菌圈直径显著变小,尤以高渗透压培养基组抑菌圈直径变小最为显著(图 1, 3)。

2.3 L 型的代谢酶活性

金黄色葡萄球菌细菌型在各糖发酵培养基

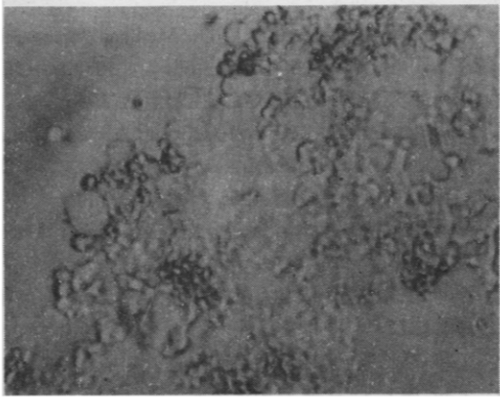


图2 LEM上蜡样芽胞杆菌L型巨型体(400×)

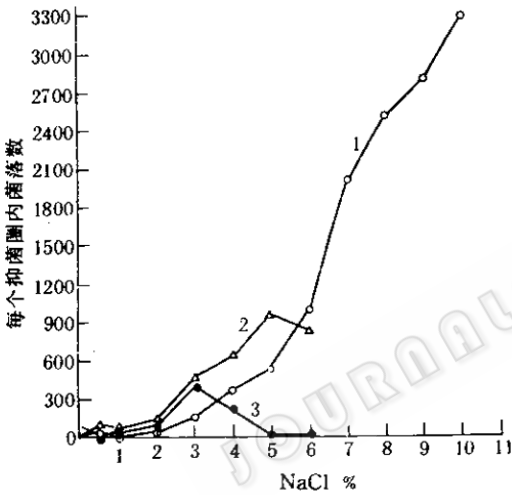


图3 LEM含盐量与L型返祖菌落数的关系

1. 金黄色葡萄球菌, 2. 蜡样芽胞杆菌, 3. 大肠杆菌

上培养3d后,可见到菌落周围指示剂变成黄色,菌落周围出现不透明的白色沉淀圈。金黄色葡萄球菌L型培养6d后,菌落周围指示剂仍为红色,且未见白色沉淀圈形成。取这种L型菌落传代可见到大量典型油煎蛋样菌落生长,未见返祖菌落生长。在糖发酵培养基上亦可见到发酵糖和产生卵磷脂酶的油煎蛋样菌落,但这种油煎蛋菌落较大,肉眼可见为乳白色小点,结构较细致和较透明,染色后可见较多的革兰氏阴性或革兰氏阳性葡萄球菌样细胞和少量L型巨型体。传代后可见大量返祖菌落生长,而L型菌落较少或无生长。

3 讨论

文献报道^[1,2,5,6],青霉素等 β -内酰胺类抗生素具有与D-丙氨酰-D-丙氨酸相似的内酰胺环,故它可与D-丙氨酰-D-丙氨酸竞争结合转肽酶而干扰肽聚糖交联,使具有细胞内高渗透压的细菌发生细胞壁缺陷,以致它在较细菌细胞内渗透压低的人体血浆渗透压(280~310mOsm/l)或常规细菌学培养基中,可由于外界水进入菌细胞,导致菌细胞胀破胞浆流出而死亡。又认为有或无完整细胞壁保护的细菌在渗透压高于其细胞内渗透压的环境中,可由于细胞内水逸出而发生胞质皱缩,不能生长或死亡。似乎完整的细胞壁在保护菌细胞抵抗环境高渗透压或低渗透压方面具有唯一的功能。然而,本文结果显示,不论革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌在低于、等于或高于其细胞内渗透压的培养基上,对青霉素的敏感性均相似,不论细胞壁完整或缺陷,对环境渗透压的抵抗力亦均相似。细菌细胞壁缺陷后,细胞内、外渗透压差不是细菌致死的唯一原因。

据报道^[7~10],细菌L型生长繁殖缓慢,完全丧失细胞壁的稳定L型生长繁殖愈加缓慢。并且非高渗透压培养基培养的细菌稳定或相对稳定L型丧失了对糖发酵作用和多种酶活性,但这些L型重新合成部分或完整的细胞壁返祖后,即可恢复同亲代细菌型一致的各种代谢特性。本文结果进一步证实,细胞壁的缺失程度同菌细胞的代谢活性的表达有关,细胞壁完整性与细菌的代谢酶的生存及活性表达密切相关。文献报道,细菌细胞壁与胞浆膜之间存在的胞质周围间隙含有多种胞外酶类,同菌细胞摄取营养物质等生理活性有关^[5]。细胞壁缺失导致菌细胞的这一与外界进行物质交换的重要微环境不能维持,以致各种胞外酶丢失,菌细胞难以从外界获取营养物质,尤其难以获取糖类而导致菌细胞能量匮乏,由此影响到胞浆膜各种载体蛋白或酶类功能的表达,使胞浆膜的正常渗透功能发生障碍,外界水及某些离子进入菌细胞,导致菌细胞破裂死亡,可能是细胞

壁缺陷细菌大多数不能生存的重要机制。在一定渗透压范围内,较高渗透压似乎更有利于细胞壁缺陷细菌保留代谢酶活性,以致能有更多的细菌L型生存。研究发现^[7,8,11],细菌L型尤其是稳定L型的胞浆膜结构可发生改变。提示细菌受到诱导剂作用时,其细胞壁完整性受破坏或合成障碍,并在形成细胞壁缺陷变型的过程中,菌细胞的生理或生化特性亦在发生着代偿性演变。大多数细胞壁缺陷细菌由于不能完成这种演变而死亡,少数菌细胞能有效地完成了这种演变而成为能在低渗透压、等渗透压或高渗透压环境中生长繁殖的幸存者。许多因素对细胞壁缺陷细菌的生存具有保护作用^[3],高渗透压、高浓度血清或生物有机质似乎更有利于完成细胞壁缺陷细菌的这种演变。

参 考 文 献

- [1] Milgrom F, Flanagan T D. Medical Microbiology. New York; Churchill Livingstone Inc, 1982,54~56.
- [2] 江明性.药理学,北京:人民卫生出版社,1990,306~307.
- [3] Domingue G J. Cell wall-deficient bacteria. London: Addison-Wesley publishing company, 1982,27~31.
- [4] 王和.贵阳医学院学报,1988,13(1):42~46.
- [5] 陆德源.医用微生物学,北京:人民卫生出版社,1989,9~15,28.
- [6] 徐丰彦,张镜如.人体生理学,北京:人民卫生出版社,1989,877~878.
- [7] 王和,解莉亚,徐英.贵州医药,1989,13(6):324~326.
- [8] 王和,唐七义,徐英.贵阳医学院学报,1993,18(2):112~115.
- [9] 王和,唐七义,徐英,等.贵州医药,1992,16(4):197~199.
- [10] 王和,徐英.贵阳医学院学报,1990,15(1):61~63.
- [11] Nishiyama Y, Yamaguchi H. Microbiol Immunol, 1990,34(1):25~34.

SUSCEPTIBILITIES OF BACTERIA TO PENICILLIN ON MEDIA WITH VARIOUS OSMOTIC STRESS

Wang He Chen Zhenghong

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

Abstract The observations have been done that the susceptibilities of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* to benzylpenicillin on L-form media with 0~10% NaCl and fermentation and lecithinase of L-form derived from the *Staphylococcus aureus*. The results shown that the *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* expressed similar susceptibilities to benzylpenicillin on the media with osmolalities of lower, equal or higher to that of the bacteria cells with. Only a few of the bacteria were living on L-form of *Staphylococcus aureus* lost the activities of fermentation and lecithinase. The revertants from the L-forms of *Staphylococcus aureus* recovered the activities of sugar fermentation and lecithinase. It is confirmed that the difference of osmotic stress between within and without bacterial cells are not the only cause of death of cell wall-deficient bacteria. It was the major mechanism of causing death of cell wall-deficient bacteria that damage of the cell wall which leads up to the loss of enzymes in the periplasmic space.

Key words Penicillin, Cell wall, L-form, Cytoplasmic membrane, Osmotic stress