

# 變形桿菌在石碳酸培基上連續傳代的變異現象(初步報告)

湯 特 龐 智 玲

(天津醫學院細菌學教研組)

米丘林曾經說過:“有機體與其生存的環境是不可分割的。有機體由外界環境的物質而構成了自己的身體,環境的變化能引起有機體的一定變異,這種變異相應於外界環境的改變。”<sup>[1]</sup>

致病菌在不同環境中——機體內與機體外都有變異,致病菌轉到外界環境中時,其本性遭到更深刻的變異,它的同化作用類型、新陳代謝類型等在外界環境中劇烈地變化着。從傷寒病患者糞便內能分離出典型的傷寒桿菌,但在某種條件下,患者已趨於恢復時,傷寒桿菌不僅遇到與內部器官完全不同的生存條件,而且也遇到了微生物之間的相互作用。因此,在研究這個傳染過程中血培養陽性病人的大便時,可發現只與傷寒桿菌個別性狀相似的培養物。它不能和傷寒的血清起凝集。或相反地,它也可以具有完全另外的生化性質,但可與傷寒血清起凝集。如果這些培養物就是傷寒桿菌的話,那麼很顯然的,它的本質已遭到了非常深刻的變異。其中一部分培養物通過小白鼠時,可再變為典型的傷寒桿菌。

另外在研究污染了傷寒桿菌的飲水中時,常不能把傷寒桿菌分離出來,而認為傷寒桿菌已經死掉了。然而我們可以分離出來性狀非常穩定的微生物,它們是革蘭氏陰性桿菌,只緩慢的分解葡萄糖,和傷寒桿菌的免疫血清可以稍微的起凝集作用——這凝集程度對診斷菌種是沒有意義的。它們的最適宜的生長溫度是30°C,在43°C時它們不生長,對小白鼠無毒力。可以設想,這些細菌和傷寒桿菌沒有什麼關係,而是其他雜菌的污染。它們在消毒水中可生活數日之久;它們在未消毒的水中亦可生長如此之久。如果它們是傷寒桿菌的話,那麼它們在第2—3天早應死掉了。但是在血清

本文為二位同學在教研組有計劃的指導下的工作成績。內容雖然不是創造性的發現,但對於細菌變異的研究也提供了一些材料,我們希望同學們以後有更好的成就在學報上發表——編者。

肉湯中經過幾次傳代後，可以使它們再變為完全典型的傷寒桿菌。因此可以證明，傷寒桿菌在水中並不死亡，而是對於新環境適應的過程中發生了深刻的變異<sup>[2]</sup>。

除了圍繞着關於腸道致病菌和大腸桿菌的變異問題以外，另一個始終引起微生物學者們興趣的是變形桿菌的問題。這個問題一直是人們研究和爭論的對象，Муромцев 氏在總結兩派分爭後，認為 x- 變形桿菌既不是立克次體發展中的一個階段，也不同於普通變形桿菌，而是單個的一種<sup>[3]</sup>。除了這點以外，變形桿菌的高度動力也已引起人們的注意。爲了抑制它的彌漫性生長，學者們曾用過某些麻醉劑酒精、硬瓊膠等等<sup>[4]</sup>得到不同程度的成功。

我們用變形桿菌的生長特性結合到變異理論上，發生了以下的問題：長期在特殊培養上，動力是否也失掉，而變成“O”型？變成單個菌落後，其他特性是否也隨之而改變？最後，所獲得的新性能是否鞏固？

本文就是初步報告摩爾根變形桿菌 (*P. morgani*) 在特殊培养基上連續傳代，而觀察其變異現象的結果。

## 一. 材料和方法

(一) 菌種：摩爾根變形桿菌、大腸桿菌、葡萄球菌、綠膿桿菌。

(二) 培养基：

製作的方法：

1. 培养基的成份：

表 1 硬瓊膠培养基的成份

培 基	營 養 瓊 膠	食 鹽	蒸 餾 水
2.3%	2.3g	0.5g	100c.c
4%	4g	0.5g	100c.c
5%	5g	0.5g	100c.c
6%	6g	0.5g	100c.c

(三) 抗血清  $\left\langle \begin{smallmatrix} \text{H} \\ \text{O} \end{smallmatrix} \right\rangle$  兔的免疫血清之作法和一般的作法相同<sup>[5]</sup>。

(四) 接種：每隔 24 小時挑選各培养基的單個菌落，用無菌手續接種在各相應的培养基上。

(五) 凝集試驗：將培養 24 小時的變形桿菌之普通斜面作成懸液，與稀釋之“H”、

“O” 抗血清進行凝集實驗, 放入 45°C 水箱中, 兩小時後取出, 在室溫中靜置, 24 小時後觀察結果。

表2 石碳酸培养基的成分

培 基	營 養 瓊 膠	食 鹽	蒸 餾 水	石 碳 酸
.055%	2.3g	0.5g	100c.c	0.055c.c
.089%	2.3g	0.5g	100c.c	0.089c.c
.1%	2.3g	0.5g	100c.c	0.1c.c
.125%	2.3g	0.5g	100c.c	0.125c.c

(六) 動力觀察: 挑選培養 24 小時之菌落, 作成懸滴後觀察。

二. 實驗結果

(一) 培養情況

1. 硬瓊膠培養生長的情況:

硬瓊膠培养基上培養共傳 25 代, 其變異情況不顯著, 但在生長過程中可以發現一種規律, 即在瓊膠愈濃的培养基上(6%), 其膜生長愈厚, 而且與菌落的大小幾乎相等, 而濃度愈小者(2.3%) 則於菌落的周圍成薄片膜狀生長, 4% 與 5% 則介乎兩者之間。

表3 在不同濃度石碳酸培养基上生長情況

石碳酸 濃度	代 數	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13*	14	15	16	17	18	19
0.125%	菌落形態	光滑、小、圓、 (+)灰白色	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	動 力	+	+	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	菌形較 長動力小	同左	同左	同左	同左	同左	同左
0.1%	菌落形態	同.125%	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	動 力	+	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	同.125%	同左	同左	同左	同左	同左	同左
0.089%	菌落形態	同.125%	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	動 力	+	+	但菌小	△	△	△	△	△	△	△	△	△	同.125%	同左	同左	同左	同左	同左	同左
0.055%	菌落形態	同.125%	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	動 力	+	+	+	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△ 動力小	同左	同左	同左	同左	同左	同左
	+	代表有動力。																		
	△	懸滴觀察由圓形的小菌變為細長而彎曲不規則的多形菌。塗片染色為革蘭氏陰性，形狀為不規則的多形菌（圖 12），生化反應仍與原菌種相同。																		
	△	有動力，部分菌形變為細長。																		
	*	13 代 4 種培养基，均作了各種糖管發酵實驗，結果與原菌種相同。																		

## 2. 石碳酸培养基培養的情況

在石碳酸培养基上共傳 18 代,其培養結果,均為單個菌落,無膜生長。但於第三代時,懸滴、塗片觀察,皆發現菌形變長、彎曲、不規則,但生化反應與原菌種同。同時在平碟上生長情況即其濃度愈大者,菌數愈少(圖 6—9)。0.125%、0.1%、0.089%、0.055% 在懸滴觀察動力時,發現其動力漸次減小。由於時間限制,我們沒有繼續作下去。

同時我們又將第 14 代不同濃度的石碳酸培养基上的培養物接種在 2.3% 普通瓊膠培养基上,其生長情況見表 4。

表 4

石碳酸培养基成份 培養之代數	.125%	.1%	.089%	.055%
14+1	單個菌落周圍無膜,動力仍與石碳酸培养基上同	同左	同左	同左
14+2	同 14+1 代	同左	同左	同左
14+3	單個菌落周圍有膜見圖 10 懸滴看菌已變成圓形	同左	同左	同左
14+4	同第 14+3 代	同左	同左	同左

## (二) 血清學實驗情況:

將在 .125% 石碳酸培養 19 代的和 6% 硬瓊膠培养基上培養 26 代的菌種分別製成“H”和“O”抗原和原菌種所製成的“O”和“H”免疫血清作凝集實驗,其結果見表 5。其中最值得注意的是 .125% 石碳酸培养基上菌種 H 抗原之改變。顯然的,變異結果是在培养基上已形成單個菌落,而且動力漸次減低,雖然作試驗的動力未完全消失,而其抗原性已顯著改變。

表 5 不同型抗原與原菌種所製成免疫血清作凝集實驗的結果

不同型抗原 免疫血清	原 菌 種	石 炭 酸 (第 19 代)	硬 瓊 膠 (第 26 代)
H	1:6400	1:400	1:6400
O	1:400	1:400	1:200

### 三. 討 論

本實驗爲了詳細觀察不同培基上各代摩爾根變形桿菌的生長，曾試用過幾種觀察動力的方法，但對於半固體、雙糖糖管都感到不滿意，因此採用懸滴觀察動力。結果比較好，但尚須指出此結果還不是百分之百的令人滿意。

在進行培養的過程中，我們曾經用含不同濃度的石碳酸培養基（0.175%、0.125%、0.5%、0.1%、1.5%、2%），但皆不生長，因此現在所用的培基已改爲本實驗所用之濃度，由實驗結果觀察，石碳酸培基生長變異比較顯著，而且時間較短，從而更證實了當外界環境改變時，有機體發生變異，且因環境條件的不同，變異結果亦不同。

同時在瓊膠培基上生長的情況，亦加強地證明了該菌的膜狀生長是不連續的說法，即先成膜，後再變厚<sup>[4]</sup>。在我們的情形中，顯然6%的瓊膠培基是有很大大抑制能力，所以膜的面積有限，而主要是變厚了。

本實驗在觀察變異時，亦曾注意培基上菌落生長之數目的變化，但在菌數之計算上是不够精確的，相信利用傾碟法在這方面可能效果比較好。

### 四. 總 結

從上面的實驗我們可以看出，摩爾根變形桿菌在特殊培基上連續傳代的變異現象，在瓊膠上生長成膜狀，變異不顯著；在石碳酸培基上生長成無膜的單個菌落。塗片、懸滴觀察，自第三代後，菌形變長而彎曲不規則，動力由於歷代的培養結果愈來愈小，這點在血清學上有顯著的表現。

附圖爲在院教材材料雷愛德醫師代爲攝製，謹致謝意。

### 參 考 文 獻

- [1] 裘維善：關於微生物變異的幾個問題。中國微生物學會通訊1(2)，1，1954。
- [2] 高天祥譯：致病菌依賴於生存條件的變異性。中華醫學雜誌(4)：292，1954
- [3] Муромцев С. Н. О Природе пластических Веществ Микробов, Агробиология, (5)：135, 1952.
- [4] Wilson, G. S. and Miles, A. A.: Principles of Bacteriology and Immunity (2 Vols.) Edward Arnold & Co. London.
- [5] 謝少文，周輯五：林氏細菌學。北京健康書店。
- [6] 陳少伯：醫用細菌學。龍門書店。

## A PRELIMINARY REPORT ON THE VARIATION OF *PROTEUS MORGANII* AFTER CONTINUOUS SUBCULTURE ON MEDIA CONTAINING PHENOL

TONG, T.

PONG, T. L.

*Dept. of Bact., Tientsin Medical College, Tientsin*

*Proteus morganii* is daily subcultured on nutrient agar media (2%, 3%, 4%, 5% & 6%) and phenol nutrient agar media (0.055%, 0.089%, 0.1% & 0.125%). After 25 generations on the former media, the variation is not so marked. However, the change on phenol nutrient agar is much more conspicuous, with pleomorphic shape and decreasing motility. In parallel with the decreasing motility, there is a reduction in the H antigenicity.

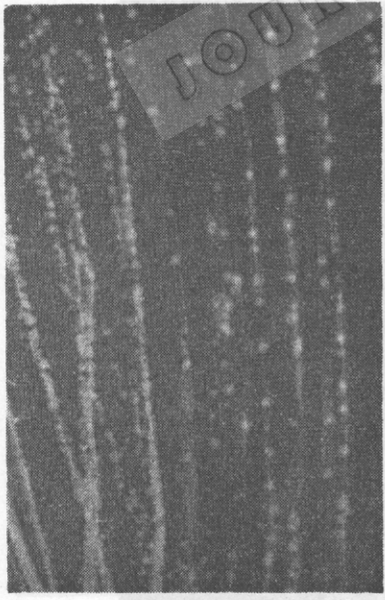


圖 1 摩爾根變形桿菌原菌種在普通瓊膠(2.3%)上的生長情形，薄膜長成一片，祇有個別部分(較深色處)未連成一片。

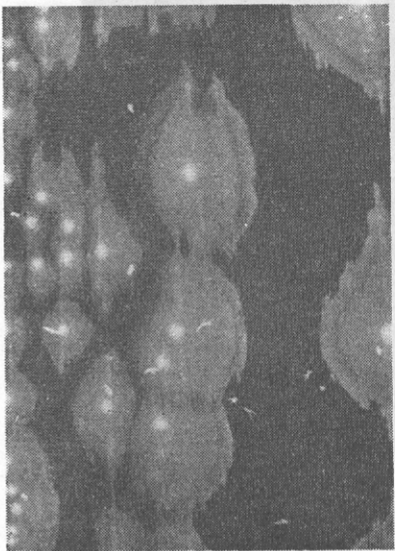


圖 3 在 4% 硬瓊膠上連續傳 25 代後的生長情形，薄膜大受限制，且增厚。

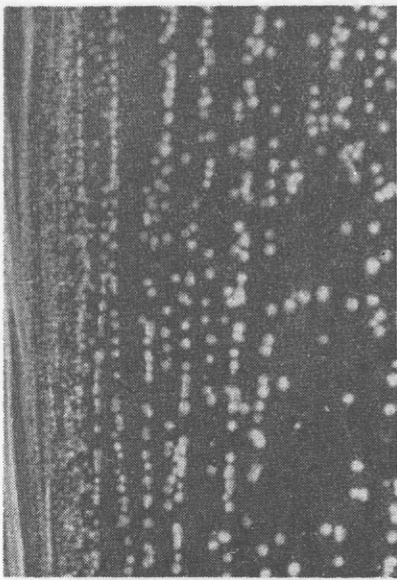


圖 2 在普通瓊膠上連續傳 25 代後的生長情形，薄膜略有限制。

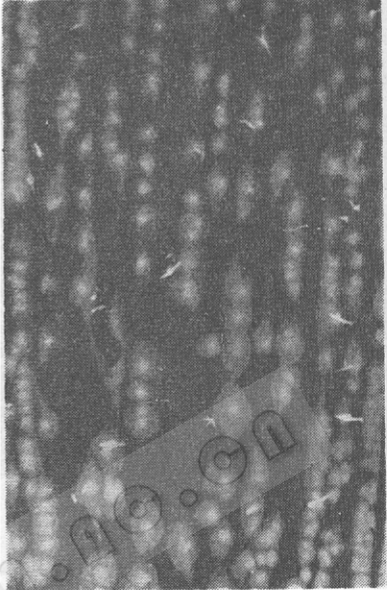


圖 4 在 5% 硬瓊膠上連續傳 25 代後的生長情形，薄膜更受限制，也更為增厚。

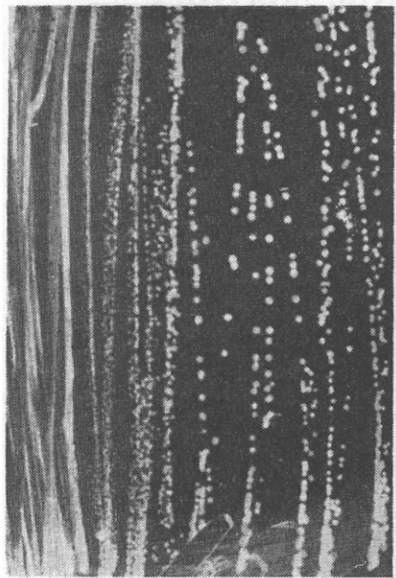


圖 6 在 0.055% 石碳酸瓊膠上連續傳 19 代後的生長情形，菌落數和無石碳酸的普通瓊膠一樣，但無薄膜生長。

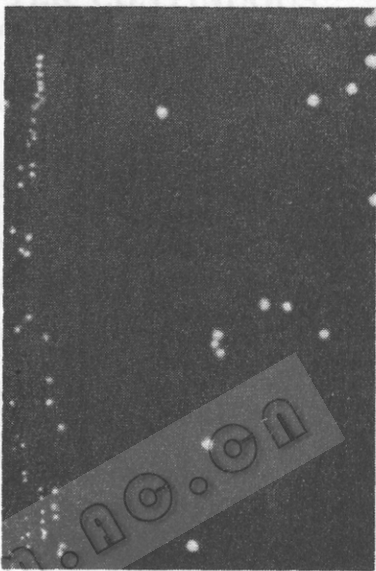


圖 8 在 0.1% 石碳酸瓊膠上連續傳 19 代後的生長情形，菌落數顯著減少，無膜狀生長。

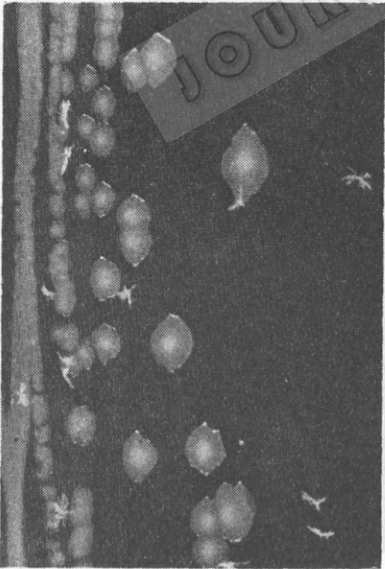


圖 5 在 6% 硬瓊膠上連續傳 25 代後的生長情形，薄膜顯著地大受限制，且大大增厚。

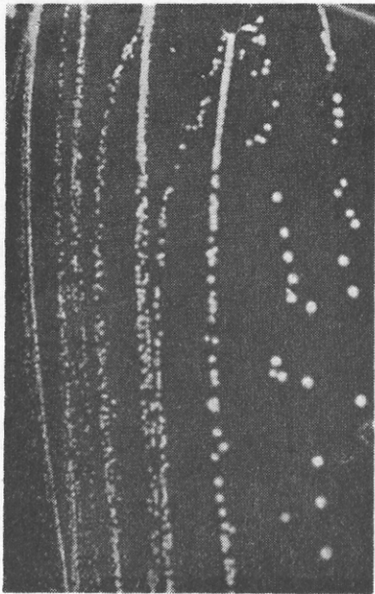


圖 7 在 0.089% 石碳酸瓊膠上連續傳 19 代後的生長情形，菌落數比在 0.055% 石碳酸瓊膠上減少，無膜狀生長。



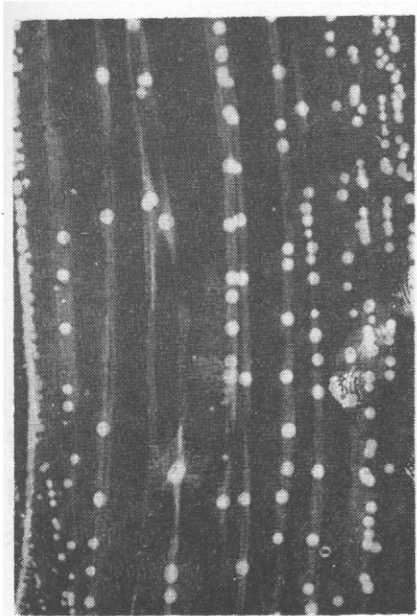


圖 10 在 0.125% 石碳酸上連續傳 14 代後，再接種在無石碳酸的普通瓊膠上時傳至第三代（即 14+3），薄膜開始向周圍生長，表示在第 14 代時，變異尚未能鞏固遺傳下去。

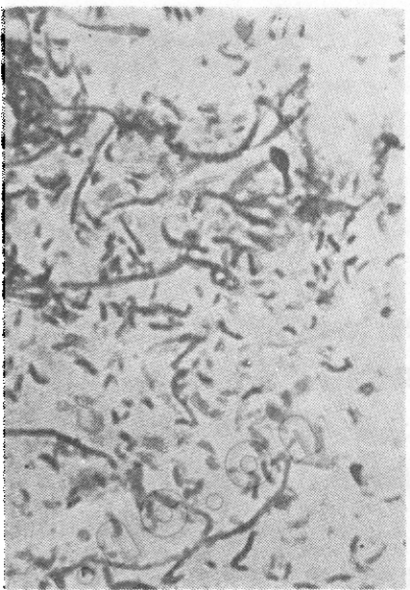


圖 12 在石碳酸瓊膠上生長的菌落，塗片染色時為不規則的多形菌。× 1000

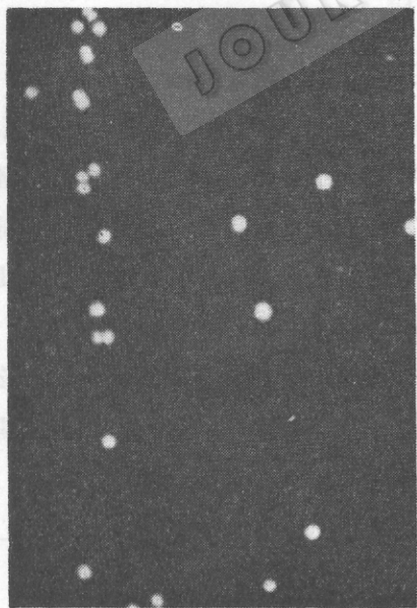


圖 9 在 0.125% 石碳酸瓊膠上連續傳 19 代後的生長情形，菌落數更顯著減少，無膜狀生長。

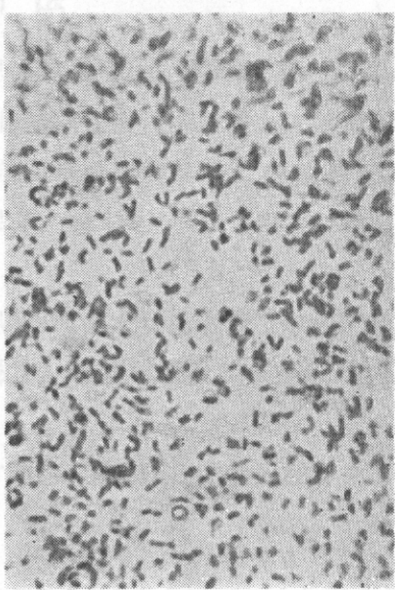


圖 11 摩爾根變形桿菌菌種的塗片，革蘭氏染色。× 100