

# 炭疽杆菌变异的研究\*

楊明久

(沈陽中国医科大学微生物教研组)

米丘林的生物学,科学地证明了,有机体的任何形态特征和生理上特性的变异,只有在外界环境因素作用下才能发生;生活条件的改变,能够强制地使微生物发育类型改变。

在微生物学范围,已经积累了大量实际材料,证明微生物的变异,是由于微生物对新的生活环境适应的结果。过去很多学者曾经报告,由于生活营养条件的改变,各种微生物产生了变异,并且这些变种在形态上、菌落上、生化学活动性上和原菌种不同。

关于炭疽杆菌变异的研究,从 Pasteur 氏以来,有 Chamberland, Roux, Гамалей 等氏关于弱毒变种形态学上的研究。以后有许多学者研究了在一定实验培养条件下所分离出来的变种,其在形态、菌落形状和致病力各方面的特征。Nungester 氏<sup>[1]</sup>把这方面的工作,作了总结,同时比较深入地做了类似的研究。苏联学者 Терентьев, Рево, Гинсбург, Коляков 等氏也曾经用不同方法,研究过炭疽杆菌的变异性<sup>[2]</sup>。此外, Миротворский 氏研究过炭疽杆菌在土壤中的变异情形<sup>[3]</sup>。最近 Кольсов 和 Борисович 二氏分别报告,应用含免疫血清的培养基,在高温条件下培养的方法,获得了弱毒变种<sup>[4]</sup>。

总结以上材料,大部分工作是围绕炭疽杆菌实验室变种的鉴定,和用人工方法改变或减弱炭疽杆菌的致病力为中心进行的。在过去文献中,有关炭疽杆菌在性质(形态、培养、生化学、致病力、抗原性)上全面而稳定的变异事实报导不多。对于涉及变异形成过程上的一些规律,和用什么方法使变种新获得的性质稳定遗传下去等方面的探讨也很少。

作者在寻找用什么方法可以使细菌发生稳定性变异过程中,应用作者使用的方法,进行预先培养处理,然后再培养在马铃薯琼脂培养基上传代,菌的性质就发生了深刻而稳定的变异。后将这些实验结果介绍如下。

\* 1956年3月8日收到。

## 实验材料和方法

### 1. 使用的菌种:

在本教研组内保存的,致病力很强的典型炭疽杆菌可分解葡萄糖、麦芽糖、蔗糖,不分解乳糖、甘露醇、水杨素、鼠李糖、蕈糖、木胶糖、衛矛醇,并凝固牛乳,液化明胶。

### 2. 使用的培养基:

(1) 1%的甘氨酸生理盐水——在普通灭菌的生理食盐水内含有1%的甘氨酸,在使用前按每2毫升加入0.1毫升的普通肉汤。

(2) 泰洛氏液 (Tyrode's solution)

(3) 马铃薯浸液——把新鲜切碎的马铃薯块茎200克,放在1升水道水中煮沸1小时,不修正pH,直接分注后,高压蒸气灭菌。

(4) 马铃薯琼胶培养基——在马铃薯浸液内加2—3%的琼胶。

### 3. 实验方法:

在马铃薯琼胶培养基上连续培养前,用以下两种方法作预先培养。

i. 把前记炭疽杆菌的无芽孢植物型培养物,比较大量的接种在泰洛氏液内,培养7天,再同样传代1次,然后用血液琼胶平板分离培养,选择单个菌落培养在马铃薯琼胶斜面上。以后连续传代。

ii. 把植物型的炭疽杆菌培养在1%甘氨酸食盐水内,每代平均培养2—3天,连续培养8代,再移植到马铃薯浸液中培养7代,然后由马铃薯浸液直接培养在马铃薯琼胶斜面上,并连续传代。

iii. 把在普通琼胶斜面上的炭疽杆菌,直接培养在马铃薯琼胶斜面上,在前两项开始在马铃薯琼胶斜面上培养同时,就进行传代移植做对照。

## 试验结果

1. 用以上两种方法(i, ii)做前培养处理后,分别在马铃薯琼胶斜面上进行传代培养。从1954年10月到1955年12月间,共传了100代,得到了两株变种。用第一种方法(i)获得的变种(变种1),和用第二种方法(ii)得到的变种(变种2)不论在形态上、培养性质、生化学性质、抗原性和致病力上,都和原菌种有明显区别。变种1和变种2中间也有一定程度上的不同。变种1、变种2和原菌种在各种性质上比较如下:

(1) 形态——变种1和变种2都完全失去了形成芽孢的能力。当变种1在马铃薯琼胶上培养到25代,变种2在第45代后,开始在菌体内形成两个以上的、正圆形折光

性强的顆粒(也有少数橢圓形或杆狀的)。变种 2 形成的顆粒較变种 1 少。用兩变种的十几小时培养物單染色时, 菌体内出现了多数不着色处(圖版 I, 1, 2)。这种顆粒除了多是正圓形外, 它們在菌体内的数目、大小和存在部位都和正常的炭疽菌芽孢不同(圖版 I, 3)。在陈旧的培养物上, 当菌体崩解和部分菌体着色不明显时, 可以看到圓形的顆粒离开菌体(圖版 I, 4)。用各种方法培养, 未証明这种顆粒有和芽孢同样繁殖能力。用兩变种的 48 小时培养物, 做耐热試驗时証明, 加热 60°C 30 分鐘立即死亡。用复紅溶液加碘溶液做脂肪顆粒染色时, 顆粒染成紅色, 对照用的芽孢不着色。根据以上各点証明, 这种在变种菌体内形成的顆粒是一种拟脂顆粒<sup>(5a, 6, 7)</sup>。

(2) 培养特性——在馬鈴薯或普通琼膠培养基上, 兩变种都形成粗糙型菌落, 但变种 2 較变种 1 長的稍菲薄。都和原菌种不同, 菌落边缘很少有卷髮狀的絲狀体(圖版 I, 5)。在肉湯内兩变种都呈平等混濁發育, 不形成絮狀沉淀。

(3) 生化性質——用含糖 B. T. B 蛋白胨水、明膠高層培养基、牛乳等檢查变种 1 和变种 2 的几种主要生化学活动性, 并用原菌种作对照, 結果如表 1。

表 1

菌种	項 目	葡 萄 糖	麦 芽 糖	蔗 糖	明 膠	牛 乳
原 菌 种		+	+	+	+ <sup>3</sup>	△
变 种 1		+*	+*	+*	±	+
变 种 2		±	+*	±	±	+

注: 糖类 { + ……培养后 2—3 天内分解 B.T.B 蛋白胨水全变黄。  
 +\* ……分解迟延到 5—6 天后, 并分解程度較弱, 呈黄綠色。  
 ± ……培养观察 10 天 B.T.B 蛋白胨水仅由藍色稍显出微弱的綠色。  
 明膠 { +<sup>3</sup> ……室温培养到第 3 天, 出現典型漏斗狀液化。  
 ± ……到第 10 天仅在穿刺的明膠高層上部, 出現小的陷凹。  
 牛乳 { △ ……牛乳凝固后, 臙化, 上部变成澄清。  
 + ……凝固出現緩慢, 大量沉淀物沉积在試管底部, 不臙化澄清。

(4) 抗原性質——为証明变种在抗原結構上是不是有了改变, 用兩变种和原菌种的 18 小时普通琼膠培养物, 做同样濃度的食鹽水菌悬液(1 毫升中 2 白金耳), 然后放在 100°C 的水浴内加温, 作抗原成分抽出。加温 1 小时后把悬液离心沉淀, 吸取上清当做抗原。把原液稀釋成 10 倍、100 倍后, 再和抗炭疽沉淀素血清(哈尔滨兽医科学研究所制)作試管内重層沉淀反应。結果如表 2。

(5) 致病力——用兩变种的 20 小时培养物制作濃厚的菌悬液(1 毫升内約含 4 毫克菌量), 并作倍数稀釋。然后把兩变种菌液分別給 5 組体重各 20 克左右的小白鼠(每

表 2

抗原种类	抗原濃度	原 液	10 倍 液	100 倍 液
	結 果			
原 菌 种		++	+	±
变 种 1		+	-	-
变 种 2		+	-	-

(++)……15 分鐘后出現厚的沉淀帶。

(+)……15 分鐘后出現清楚較薄的沉淀帶。

(±)……重層界面不明显, 沉淀帶也看不清楚。

(-)……陰性。

組 5 只)腹腔內接种 0.25 毫升, 測定 LD<sub>50</sub> 証明, 兩变种的 LD<sub>50</sub> 接近一致, 都相当于 0.2 毫克左右。平均死亡時間在 70 小时以上, 但变种 2 比变种 1 稍長些。对照用的原菌株注射量仅相当于 0.025 毫克时, 5 只小白鼠全部在 30 小时内死亡。

总结以上几項結果証明, 变种 1、变种 2 和原菌种对比, 在形态、培养特性上都發生了改变。在生化学性質上, 各种活动性减弱, 特别是变种 2 对糖和蛋的分解能力显著降低。在抗原性上, 根据沉淀反应的結果了解, 变种的抗原結構也有了改变。致病力很明显地降低。

2. 做对照的實驗方法項內 (iii), 把原菌种直接移植在馬鈴薯琼膠斜面上后, 同样連續傳代到第 50 代时, 菌形态上和培养性質上看到的改变很少。在培养物中常有部分菌体呈短鏈狀排列或散在, 有时当培养基中的馬鈴薯浸液比較濃时, 菌体芽孢形成的比較晚, 在形成芽孢前菌体内有不着色的顆粒出現。芽孢形成后顆粒消失, 这种顆粒相当于芽孢出現前的拟脂包涵物(lipoid inclusions)<sup>[2b]</sup>。相反, 馬鈴薯浸液比較淡时, 芽孢形成的較早, 形态上和和普通琼膠上的培养物差別不大。在馬鈴薯琼膠斜面上傳50代以后, 虽然沒有和变种 1、变种 2 用同样間隔进行傳代, 但始終保存在馬鈴薯琼膠斜面上, 到最后总移植代数相当于 60 代。各种性質和原菌种比較沒有明显改变, 只是使牛乳凝固的時間迟延了些。致病力也仍然很强, 通过一代动物(小白鼠)后, 恢复和原菌种一致。

## 返祖試驗

按文献記載, 由人工的方法获得的無芽孢炭疽杆菌, 当再培养到正常条件时, 芽孢形成能力就能恢复<sup>[2]</sup>。Henri 氏<sup>[3]</sup>用紫外綫照射, 得到了炭疽杆菌的变种, 由于通过动物(豚鼠), 变种又恢复到原来状态。Sanfelice 氏<sup>[3]</sup>用由动物分离的炭疽杆菌做厭气培

养,得到了無芽孢变种,并經過長時間培养結果,形成了弱毒种,但是經過在加有新鮮豚鼠血清的肉湯內培养移植結果,也恢复了芽孢的再形成能力。小林氏<sup>[10]</sup>証明,在含有葡萄糖的琼膠培养基上,連續培养炭疽杆菌,虽然丧失了芽孢形成能力,当在普通琼膠上培养 1—2 代后,芽孢又再出現。Knoysi 氏<sup>[11-12]</sup>在研究巨大芽孢杆菌(*B. megatherium*)时,也曾經証明芽孢丧失后常常恢复。

作者为了解变种 1、变种 2 的各种性質的变异稳定程度,用兩变种分別做了以下各項返祖試驗。

1. 用普通琼膠培养的方法:把兩变种的 18 小时馬鈴薯琼膠培养物,直接种在普通琼膠斜面上,在普通琼膠斜面上連續培养 40 代,結果兩变种都未恢复原菌种的特征。連續培养 40 代的变种 1 (变种 1R) 在形态排列上,部分呈柵鏈狀排列,菌体内仍然保有小的少数不着色顆粒(圖版 I, 6)。变种 2 移到普通琼膠斜面后,到第二代在斜面上出現了兩种菌落。其中一种在普通琼膠上和变种 1R 相似,生長的較厚不透明(变种 2a),菌形态排列上也和变 1R 种相似,但在菌体内很少看到不着色顆粒(圖版 II, 7)。另一种和变种 2a 相反,生長的較薄并稍透明的菌落(变种 2b),菌体排列較長,在形态上常常在菌体中央部呈球形的膨脹,排列呈鏈狀(圖版 II, 8)。变种 2b 的培养物从 20 代起,在室温条件下放置十几天后,常出現二次菌落(圖版 II, 9)。二次菌落內的新生菌体并有顆粒出現(圖版 II, 10)。当移植二次菌落到新培养基上时,顆粒消失又恢复原样。

2. 用普通肉湯培养的方法:与上法一样把兩变种的純培养物接种在普通肉湯培养基內,培养 24 小时后,再从中取一白金耳移植到另一管肉湯內,連續培养 30 代后,用普通琼膠平板分离。这时变种 1 的形态、菌落和变种 1R 一样。变种 2 也仍然在平板上出現了相当于变种 2a 和变种 2b 的兩种菌落。

3. 通过动物的方法:用变种 1 和变种 2 的 20 小时培养物做菌悬液(1 毫升內 1 白金耳),分別給体重 20 克的小白鼠兩只腹腔內接种 0.5 毫升。小白鼠在 48 小时內死亡,然后用死鼠脾臟在血液琼膠上培养。第二日用生長在血液琼膠上的菌做悬液,再給小白鼠接种,这样連續通过了 10 代。結果从小白鼠的死亡時間上看,兩株变种都沒有毒力增强的表现。变种 1 通过第七代时,一只小白鼠在注射后第四日仍然活潑,人工杀死作脾臟塗片鏡檢时,發現仅有少数杆菌在脾組織內,并形态上和馬鈴薯琼膠上的陈旧菌体相似,菌体内有明显大的不染顆粒,用血液琼膠平板分离时未生長。証明大量的菌也有时不能使个别小白鼠致死。

4. 仿 Sanfelice 氏方法,把兩变种培养在含有新鮮豚鼠血清的肉湯里(1:4),連續培养 10 代,結果和 [2] 項一致。

在以上各項返祖試驗后,把得到的菌株做了主要生化性質檢查,証明它們都和原变种一致,同时当把它們重新种在馬鈴薯琼膠上时,又各恢复了原来变种 1 和变种 2 的原来在形态上的特征,只有变种 2b 在馬鈴薯琼膠上,菌落較薄,菌排列上較長。

## 变种的再变异实验

作者考虑到上述变种是否可以用新的,和它原来营养环境(馬鈴薯琼膠培养基)不同的培养基来培养,使它向另一方向变异?于是做了以下企图使变种在原来的基础上發生进一步变异的試驗。

1. 在大米琼膠培养基上: 大米琼膠培养基——大米 200 克放在 1 升水道水中煮沸 1 小时后濾过,用濾过的大米浸液做 2% 的琼膠培养基(不修正 pH)。

把变种 1 直接种在大米琼膠斜面上,然后做連續傳代移植。变种 1 在大米琼膠上,形成小圆形菲薄透明的菌落,同时菌体形态結構上發生了明显罕見的改变。菌体粗細不均,巧妙的弯曲折叠成紐結狀(圖版 II, 11)。不间断地連續傳代至 34 代,变种 1 在大米琼膠上虽然發育情况和最初一致,但菌的形态漸漸表现出有恢复原样的傾向(圖版 III, 14)。同样在傳代过程中,由第十二代起在大米琼膠上的陈旧培养物(培养經過 20 天)中,在原来薄的菌苔上,出現稍大的第二次菌落。鏡檢証明在第二次生的菌落內有濃染的球形菌体(圖版 II, 12)。鈎取第二次菌落,重新培养在大米琼膠上,經過兩三代后菌的形态逐漸改变,和大米琼膠上的 22 代培养物相一致,菌体内又出現了顆粒,向原来形态恢复(圖版 III, 13, 14)。当把在大米琼膠上培养傳了 30 代后的培养物,再接种在馬鈴薯琼膠上时,又完全恢复了原来形态上的特征,其他性質未証明有和变种 1 不同处。

2. 在加各种化学物質的培养基上: 作者选用葡萄糖、第二磷酸鉀 ( $K_2HPO_4$ )、氯化鈣 ( $CaCl_2$ ) 等三种物質,按一定量加在培养基內,看对各变种有什么影响。

(1) 將变种 1R 和变种 2b 培养在含 1% 葡萄糖琼膠培养基上,在初代兩株菌都有明显改变,菌落呈光滑湿润整齐的 S 型。在形态上除有一部分呈杆狀外,兩株菌都出現有圆球形的菌个体。变种 1R 無論在球形或杆狀的菌体内,都有顆粒出現(圖版 III, 15, 16)。傳 4—5 代后,菌落边缘开始不整齐,同时圆球形菌体不再出現,菌体排列散在并都有顆粒出現(圖版 III, 17)。菌在葡萄糖琼膠上生長后大多数迅速死亡,培养 48 小时后再移植时,在培养基上仅能生長几个菌落。当在 1% 的葡萄糖琼膠內加少量的  $K_2HPO_4$  时,这种情形和形态上的改变就可以被阻止。在葡萄糖琼膠上連續培养到 21 代后,变种 1R 或变种 2b 的培养物,放在室温条件下,一周后常常在試管下部菌苔上,長出濃厚的白色菌苔(圖版 III, 18)。在葡萄糖琼膠平板上培养时,同样在生長菲薄透明的菌落周圍边缘

部，形成肥厚不透明的塊（圖版 IV, 19, 20）。在第二次形成的菌苔或塊內鏡檢下証明，在有着色弱的陈旧菌體中間，有多數濃染的新生菌體出現。在菌落中心透明部分僅能看到形態非常模糊的菌體殘余。在連續傳代中，菌體排列漸漸由散在轉向數個呈鏈，最後（第四十代）菌體排列接近于恢復原狀，特別變種 2b 表現的明顯。（圖版 IV, 21）傳代 40 代後的變種 1R 和變種 2b 分別再培養在普通琼膠上或馬鈴薯琼膠上時，都立刻恢復了原來各個形態上的特征。其他性質也沒有新的改變。

(2) 把變種 1 和變種 2 培養在含有 2% 第二磷酸鉀 ( $K_2HPO_4$ ) 的馬鈴薯琼膠上時，經過 20 小時後，兩變種都在培養基上形成了粘稠的菌苔，菌體呈長鏈狀（圖版 IV, 22）。在排列上和典型炭疽菌相似，只有在菌體內仍有多處不規正的不着色地方。連續培養 10 代都保持了這種性質，當重新培養到正常馬鈴薯琼膠培養基上，又恢復了原形。用含  $K_2HPO_4$  的普通琼膠，也得到了相同結果。

(3) 用加少量 (1—2%) 的氯化鈣 ( $CaCl_2$ ) 馬鈴薯琼膠或普通琼膠培養基，培養變種時，出現了和第 2 項相反的結果，形成和原來完全不同的菌落，菌落規整正圓形，菌體排列分散開。變種 1 的菌體內有顆粒，和在葡萄糖琼膠上時相似，變種 2 體內無顆粒，從形態上看完全像另外一種細菌（圖版 IV, 23）。在含有  $CaCl_2$  的馬鈴薯或普通琼膠培養基上的變種 1，若長時間放在室溫條件下，在原菌苔上極易出現子菌落（十數日後），經過一個月左右時間，在子菌落上又能再生出小菌落來（孫菌落）。子菌落和孫菌落內的菌體，大致和第一次菌落中的相似，只是其中大部分菌體變粗了。

## 討 論

在實驗里看到，同一株炭疽杆菌，預先經培養處理後，再在馬鈴薯琼膠上傳代培養結果，和未經預先培養處理的對照有顯著的不同。

作者認為這種差別的產生，對我們理解微生物的變異形成上是有意義的。李森科指出：選擇能夠使植物擺脫歷代形成的整個適應性（環境習性）的栽培條件，……“動搖”它的遺傳性（……或者劇烈地變更培育條件）的時候，可以在以後的子代中，用選擇馴育的方法，迅速地創造植物新的需要，就是創造與之完全不同的新種和品種<sup>[13]</sup>。動搖有機體的遺傳性，然後創造新的生活條件，用營養生活環境來改變有機體的代謝形式，是人工獲得變異的兩個重要步驟。

這樣從原則上我們就有理由認為，實驗中的預先培養處理，實際上起着動搖細菌在遺傳上的保守性作用，而長期在馬鈴薯琼膠上移植培養所起的作用是，在菌的遺傳性動搖的基礎上，使炭疽菌適應和同化新的生活條件，改變了它的代謝類型。

馬鈴薯地莖中含有的主要物質是淀粉，只有在長期保存塊莖時，才出現糖類的累積，含氮物質很少，蛋白質僅占總量的 1.99%<sup>[6]</sup>。在變種菌體內的脂肪(擬脂)顆粒的形成，除其他條件外，和培養基內大量淀粉的存在有密切關係。Starkey 氏<sup>[5]</sup>曾經報導，土壤酵母在有豐富的糖和少量的氮源的培養基中，體內的擬脂量就大大增加。所以像馬鈴薯這樣氮源很少，淀粉很多的具体培養條件下，炭疽桿菌被迫在保守性動搖的基礎上，改變了正常的代謝形式，失却了恢復形成芽孢的能力，停滯在形成擬脂顆粒的階段上，同時獲得其他一系列相應的特性，如對糖類和蛋白質的活動性減弱等。這就充分證明，細菌的任何特性和遺傳性的變異，是和它受的特殊外界環境條件影響相符合。

在返祖試驗中證明，變種的獲得性質穩定程度說明，只用不穩定的變異事實來支持循環論和解離學說，把細菌變異局限在一定範圍內，不承認有穩定性變異可能性的看法，是非常片面的。

在變種的再變異試驗里，無論變種 1 在大米琼膠培養基上和變種 1R 變種 2b 在葡萄糖琼膠培養基上，都在初期有複雜多樣的形態上改變。傳代中間或到最後在菌形態上又逐漸表現有恢復原狀的趨勢。這些改變和恢復過程，可以看做是，菌體當生活在新的環境中，由於那里的部分物質，對它代謝上不利的影響，結果菌體在形態上出現了暫時性病理上的改變。在培養過程中，一部分菌體逐漸地適應於變化了的生活條件，同時獲得了新的特性(這種特性可能是暫時性的，或者是不明顯的)，在形態上也就開始由暫時性的病理上變形恢復到正常。在大米琼膠培養基上培養的變種 1，因為大米和馬鈴薯間的成分對比上非常複雜，到底在大米琼膠上傳 30 代後，獲得了那些特性？形態上的變異和生理特性改變間的關係如何？需要非常致密的研​​究才能了解。正像伊姆舍聶茨基氏所說：形態上和生理上的變異之間的關係，是十分複雜的，這個問題的解決，須在長時間逐漸的來實現<sup>[6]</sup>。

## 結 論

炭疽桿菌先用甘氨酸食鹽水、馬鈴薯浸液培養，和用泰洛氏液做預先培養後，再分別在馬鈴薯琼膠上連續傳代培養 100 代，結果得到了兩株變種(變種 1 和變種 2)，兩株變種都失去了炭疽桿菌原來的特徵。做各種返祖實驗證明，變種獲得的特性非常穩定。變種在形態上，代替芽孢形成能力的喪失，形成了擬脂顆粒。原菌種的致病力、生化學活動性(對糖和蛋白的分解能力)，相應地減弱或逐漸消失。菌體的抗原性也起了一定改變。

相反用同株炭疽桿菌，不做同樣預先培養處理，直接種在馬鈴薯琼膠上長期傳代培



养时，只在傳代过程中，部分菌体發生一时性形态上改变，但始終保持有芽孢形成能力，其他性質沒有明显改变。

用变种在大米琼膠上或含葡萄糖的普通琼膠上，做連續傳代培养时，都在初期产生了剧烈的形态上改变，傳代到后期，形态上又表现出有恢复原状的趨勢。打算使变种进一步發生变异，沒有成功。在加  $K_2HPO_4$  和  $CaCl_2$  的培养基上培养变种时，証明这两种化学物質，对細菌形态变化的影响上，起相反的作用。

根据实验中的稳定变种的产生条件和变种的再变异实验証明，打算使細菌获得深刻而且稳定的变异性时，在定向的改变它的原来性質之前，先动摇它在遺傳上的保守性是很重要的。同时也証明了外界条件的改变，是細菌遺傳性变异的唯一法則的正确性。

实验中蒙刘爰晴和楊采凡二同志协助謹致謝意。

### 参 考 文 献

- [1] Nungester, W. J.: *J. infec. Dis.*, **44**: 73-125, 1929.
- [2] Кольков, Я. Е.: *Ветеринарная Микробиология. Сельхозгиз.* 240-245, 1952.
- [3] Труды Конференций по направленной изменчивости и Селекции Микроорганизмов. Издательство Академии Наук СССР. 43, 1952,
- [4] Борисович, Ю. Ф.: Культурально-Морфологические и Виологические свойства изменчивых Микробов Сибирской язвы.  
Колесов С. Г.: *Микробиология Эпидемиология и инфекционные болезни.* Выпуск 18. Медгиз, 11-14, 1955.
- [5] Knaysi, G.: *Elements of Bacterial Cytology*, 2nd ed., Comstock Publishing Co., Cornell Univ., Ithaca, New York. 191-195(a), 231-238(b). 1951.
- [6] Lewis, I. M.: *The Cytology of Bacteria, Bact. Rev.* **5**: 181-230, 1941.
- [7] Eisenberg, P.: *Centr. Bakt. Parasitenk., I Orig.*, **48**: 257-274, 1909.
- [8] Henri: (見日本微生物学病理学杂志, **25**: 326, 昭和六年).
- [9] Sanfelice: (同上).
- [10] 小林荣三: 日本細菌学杂志. 439: 929-949, 昭和七年.
- [11] Knaysi, G.: *J. Bact.* **26**: 623, 1933.
- [12] Knaysi, G.: *Ibid* **29**: 389, 1935.
- [13] 李森科: 农業生物学. 新农出版社. 288, 1952.
- [14] 契莫拉等主編, 馬鈴薯(上册) 財政經濟出版社. 58, 1955.
- [15] Starkey R. L.: *J. Bact.* **51**: 33-50, 1946.
- [16] 伊姆舍聶茨基等: 全苏微生物定向变异选种会論文集(上册) 科学出版社, 39, 1954.

## THE STUDY OF VARIATION OF *B. ANTHRACIS*

YANG MIN-CHIU

*Chinese Medical College, Shenyang*

After a strain of *B. anthracis* was pre-cultured in glycine-normal saline, extract of potato, or in Tyrode's solution, prolonged continuous sub-cultures amounting to 100 generations were then made on potato agar media, as a result of which, two variants were obtained. Both lost their original characteristics and came to resemble other species of bacteria. Reversion experiments proved that the characteristics of the variants were quite stable.

Morphologically, lipid inclusions were found to develop in the variants to replace their power of spore formation. Their pathogenicity and their biochemical activity decreased correspondingly or lost entirely. On the other hand, the same strain cultured directly on potato agar media without pre-culture, showed only partial and temporary morphological changes during the course of prolonged sub-culture, while its power of spore formation was retained throughout the experiment. Apparent changes in other characteristics did not occur.

Culturing the variant on rice-agar media and agar containing glucose, marked morphological changes again occurred in the early stage of continuous sub-culture, while in the later stage, there was a tendency of resuming its original form.

The results of the experiment proved that in order to render the bacteria to gain a profound and constant variation, it is important to change its hereditary conservatism before its characteristics can be altered; it also proved that change of environment is the only principal factor to produce bacteria variation.