

# 非典型痢疾桿菌的定向變異試驗\*

鄭武飛 陳祖瓊 徐維貞

(天津醫學院微生物學教研組)

在微生物學領域中，變異問題一直是引起研究家們注意的。在我國從事變異實驗的工作，雖很早就有謝和平氏<sup>[1]</sup>研究肺炎球菌的變異問題，但以後繼續者不多。近年來在學習蘇聯先進科學號召下，變異問題引起了廣泛的重視，並已有些人從事這方面的工作。例如，方氏等<sup>[2]</sup>曾進行酵母菌定向變異的試驗；高氏<sup>[3]</sup>將獲得痢疾桿菌某些性狀的大腸桿菌和副大腸桿菌進行試驗。

近年來，實驗室中常能遇到非典型的菌株。這種情況一方面固然是由於作用於微生物的因素增多，例如抗生素的廣泛應用；另一方面，而且是更重要的，是由於人們對這類問題日趨重視。以痢疾桿菌為例，Weil 及 Binder 二氏<sup>[4]</sup>曾以痢疾桿菌濾液作誘導因素引起福氏痢疾桿菌菌型的轉變；蘇聯學者曾用死菌液<sup>[5]</sup>、含糖培养基<sup>[6-7]</sup>、10%胆汁肉湯<sup>[8]</sup>或 Бакто Ж 瓊膠<sup>[9]</sup>使非典型菌回復到原有的致病菌性狀或大腸桿菌的性狀。我們設想，非典型痢疾桿菌在痢疾桿菌作蒙導菌的影響下，應較其他菌更易獲得痢疾桿菌的性狀。因此我們將腸道帶菌檢查<sup>[10]</sup>和痢疾病人病原菌分型研究<sup>[11]</sup>中所發現的一部分非典型菌進行了定向變異的試驗。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌種

蒙導菌(教養菌)用我組菌種室保存的四種痢疾桿菌：即志賀氏痢疾桿菌、宋內氏痢疾桿菌、福氏痢疾桿菌和斯氏痢疾桿菌。應用前經塗片染色、動力、生化及血清學鑑定(表 1)都符合作為痢疾桿菌各菌種的性狀<sup>[12]</sup>。

定向變異菌(被教養菌)用我們在進行帶菌檢查和細菌性痢疾病原分型研究中分出的一些非典型菌株(在本試驗中用 6 株)，這些菌的分離方法及編號原則詳見原總結<sup>[11-12]</sup>。此外，我們也採用在這些研究中的一株福氏痢疾桿菌，一株第 III 型發碱桿菌，一株變形桿菌(*Prot. rettgeri*)以及一株菌種室的產碱桿菌作為比較。這些菌株的特性如表 2 所示。

\* 本文 1957 年 3 月 30 日收到。

表 1 蒙導菌的生化反應和血清學反應

鑑定結果 菌名	草蘭氏染色		生 化 反 應										血 清 學 反 應											
	動 力	草蘭氏染色	尿 素	水 楊 素	明 膠	美 紅	v.p.	乳 糖	葡 萄 糖	麥 芽 糖	甘 露 醇	蔗 糖	木 膠 糖	衛 矛 糖	鼠 李 糖	阿 拉 伯 糖	牛 乳 糖	糊 精	皰 基 質	志 賀 氏	宋 內 氏	福 氏	斯 氏	對 照
志賀氏痢疾桿菌	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	++++	-	-	-	-
宋內氏痢疾桿菌	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+++	-	-	-
福氏痢疾桿菌	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+++	-	-
斯氏痢疾桿菌	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+++	-

註：“-”表示該試驗陰性或不發酵某一糖；“+”表示該試驗陽性或該菌次日發酵，右下角小字表示在該日方產酸。

表 2 定向變異菌的生化反應和血清學反應

菌株號	草蘭氏染色		生 化 反 應										血 清 學 反 應				備 註								
	動 力	草蘭氏染色	尿 素	水 楊 素	明 膠	美 紅	v.p.	乳 糖	葡 萄 糖	麥 芽 糖	甘 露 醇	蔗 糖	木 膠 糖	衛 矛 糖	鼠 李 糖	阿 拉 伯 糖		牛 乳 糖	糊 精	皰 基 質	志 賀 氏	宋 內 氏	福 氏	斯 氏	對 照
天 24	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
25 D <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
27 中	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
79 S <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
82 中	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
116 D	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
116 D <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
127	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
產酸桿菌	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

第 III 型發酸桿菌  
 非典型型痢疾桿菌(生化似宋內氏)  
 非典型型痢疾桿菌(生化似宋內氏)同一大便標本另一菌株(27D)生化相同,血清宋氏 1:1280  
 福氏痢疾桿菌  
 非典型型痢疾桿菌(生化似宋內氏)  
 非典型型痢疾桿菌(生化似宋內氏)同一大便標本另一菌株(82D)生化相同,血清福氏 1:640  
 非典型型痢疾桿菌(生化似宋內氏)  
 非典型型痢疾桿菌(生化似宋內氏)  
 雷極氏變形桿菌

註：符號意義同表 1。

## (二) 培養基製備法

定向培養基的製備原則上仿 Кудлай 氏<sup>[13]</sup>用加熱殺死的蒙導菌菌液,但作相當的修改。將蒙導菌接種在 pH 7.4 的 0.75% 蛋白胨水中(1,000 毫升蒸餾水中加蛋白胨及氯化鈉各 7.5 克,每管 2 毫升)。於 37°C 恆溫箱中培養 48—72 小時後,放置 60°C 水箱中加熱 1 小時殺死。每管加等量的 0.75% 蛋白胨水(pH 7.4)即作為定向變異菌傳代用的培養基(每管 4 毫升)。每批製備足夠傳代 3 次之量,放冰箱備用。

為了確證蒙導菌的滅菌效果,每次蒙導菌滅活後,每種菌液種血瓊膠平板一個,於 37°C 恆溫箱內培養 48 小時檢菌;並且每種菌取 2 管,一管如前述加等量的蛋白胨水,另一管加等量的 20% 血清肉湯(pH 7.6),均培養於 37°C 恆溫箱內,觀察一周檢菌。

## (三) 傳代法

將定向變異菌接種在 2 毫升裝的 0.75% 蛋白胨水中,於 37°C 培養 18—24 小時,然後以滴管各加一滴在四種定向變異的培養基中,於 37°C 培養 48 小時是為第一代。到期時,將各株第一代分別用滴管加一滴在相應的定向培養基上再培養 48 小時,是為第二代。從第三代開始每培養 72 小時再傳代。為明確上述傳代,舉“25D<sub>1</sub>”株為例。“25D<sub>1</sub>”株第一次培養在含志賀氏痢疾桿菌死菌液培養基上後稱為“25D<sub>1</sub>志<sub>1</sub>”,到期時將“25D<sub>1</sub>志<sub>1</sub>”又傳到含志賀氏痢疾桿菌死菌液培養基上,是為“25D<sub>1</sub>志<sub>2</sub>”,依此類推。

所有菌株每傳三代培養到期後,分別劃中國藍平板,於 37°C 培養 18—24 小時。從每個平板上各挑選三個菌落分別接種到雙糖培養基。後者在 37°C 培養 18—24 小時後,每支以痢疾桿菌混合血清(包括志賀氏、宋內氏、福氏多價及斯氏的混合血清,稀釋度為 1:20)作玻片凝集試驗。如有陽性,再分別以單價血清試驗。

傳代情況如圖 1 所示

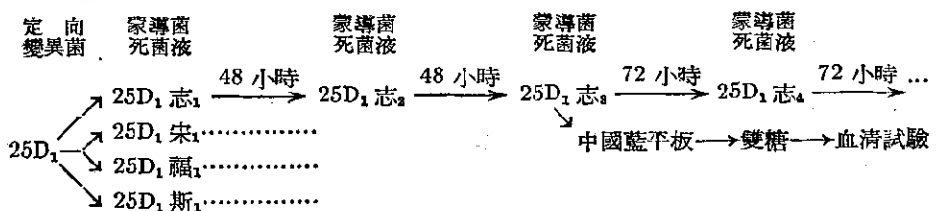


圖 1. 定向變異菌傳代示意圖

## 結果和討論

所有含有蒙導菌的培養基加熱滅菌後,檢菌結果均為陰性。

全部試驗共傳了 30 代。每三代用混合血清試驗時,幾乎全部為陰性。10 株中有一部分菌株(63, 82, 116D<sub>1</sub>, 127 及產碱桿菌)的某些代在試驗過程中作血清學試驗時會發生自凝。受定向變異影響而獲得血清學反應性能的僅一株(82 中),在最後一次試驗



時,該株的“82 中志<sub>30</sub>”和“82 中福<sub>30</sub>”均和福氏抗血清起反應,滴度各為 1:320 和 1:640。

在傳代 30 次後會將這些菌株全部作了一次生化及血清學的鑑定,限於篇幅,我們祇將陽性結果及對照菌株的結果列於表 3。

從這次為數不多的試驗中可以看出,不管是已知的痢疾桿菌,非典型痢疾桿菌或作為比較的非痢疾桿菌,在經受蒙導菌影響下,多數發生了不同程度的變異。例如,“63”是一株已知的福氏痢疾桿菌,顯示出蔗糖發酵能力方面大為減退。血清學方面仍是祇和福氏抗血清起反應(1:320—640),但凝集原性有相當減退。“82 中”是生化上似福氏痢疾桿菌的非典型菌株,而且是這次定向變異成功的一株。必須指出,“82 中”是來自一份陽性標本中的,也就是說從這份標本中曾分離出過生化和血清學上典型的福氏痢疾桿菌(82D)。因此,“82 中”在它被分離出前已經和福氏痢疾桿菌共同生活過一個時期,因而當它受到福氏蒙導菌影響下獲得了一些福氏痢疾桿菌性能(與福氏抗血清凝集,滴度 1:640)是完全可以理解的。但另一方面,“82 中志<sub>30</sub>”亦獲得了和福氏抗血清凝集的性能(1:320),這就提出了令人難解的問題:為什麼近似福氏痢疾桿菌的“82 中”在志賀氏痢疾桿菌死菌液影響下仍是較易獲得福氏痢疾桿菌的性能。我們這樣想像,所有痢疾桿菌在親緣關係上是有一定聯系,在受有親緣關係菌種影響下,即是不同種,但是由於同一屬的某些共同基礎,也會使非典型菌株在一定條件下較先獲得最近似的典型菌株的性狀。說得更具體一些,例如非典型的福氏痢疾桿菌在遭受福氏以外的其他痢疾桿菌(例如志賀氏、宋內氏或斯氏)的影響下,也是較先獲得福氏痢疾桿菌的性狀。當然,這並不意味着“82 中”在受宋氏或斯氏死菌液影響 30 代後也就獲得了福氏痢疾桿菌的性狀;同樣,也並不意味着“82 中”在受到福氏以外的他種痢疾桿菌很長期的影響下,不會獲得後者的性狀。這樣一種假設完全有必要進一步作更多的研究來證實。這種研究結果對於種的形成和進化可提出更有力的科學論據。

“82 中”的血清學變化在第 30 代方觀察到,由於我們是每三代作一次血清學試驗,因而不知在前兩代時有沒有開始變化。我們的情況和 Перетц 和 Бажедомова 二氏<sup>[24]</sup>的報導是相符的,他們觀察到細菌是隱蔽地逐漸地獲得其新性狀,而以躍進方式表現出來,不論是培養或血清學方面都有這樣的表現。

Кудлай 氏<sup>[3]</sup>曾指出過,在變異的過程中細菌的變化最先反映出生化性狀上,繼而在血清學性狀上,最後才在致病性上。我們的結果也指出,所有菌株的生化性狀變化遠較血清學上的變化多而且明顯。生化性狀的變化似乎是這樣,以發酵為例,如果變異後獲得了發酵的能力,則多數不是在培養 24 小時後就顯示陽性;另一方面,如果原先對某一糖的利用較差(需較長時日方陽性),則變異後往往是陽性發酵日期延緩或根本喪失發酵能力。雖然我們限於人力及物力開始時就不考慮逐代進行生化性狀比較,但從最後結果的比較,仍多少看出這種趨向。

非典型的痢疾桿菌的來源問題多認為是腸道內正常菌叢和致病菌相互作用而形成。正如試管內所證明的，既是相互的作用，那麼它可以是由於痢疾桿菌或其代謝產物作用於大腸桿菌或副大腸桿菌而引起具有痢疾桿菌性狀的腸道菌<sup>[5, 15, 16]</sup>；相反的，也可由於大腸桿菌、副大腸桿菌或它們的代謝產物作用於痢疾桿菌而使後者喪失了一些原有的性狀<sup>[14]</sup>。但是，前者的可能性似乎大一些，這點一方面從我們的實驗中可看出，這些尚處於動搖狀態中的非典型菌較易恢復一些非致病菌的特性（例，尿素分解陽性）；另一方面，結合高氏<sup>[3]</sup>的實驗看來，進行定向變異試驗以鑑定非典型菌株時，使非典型腸道菌回復到正常腸道菌遠較使其繼續獲得致病菌的性狀容易得多。

本文開始時已曾談到抗生素的廣泛應用是引起變異的原因之一。多數學者祇是從致病菌獲得抗藥性方面去研究。Moroz<sup>[17]</sup>的實驗卻從另一個角度出發提出了新的課題。她發現對抗生素 гриземин 有抗藥性的大腸桿菌或痢疾桿菌往往喪失了一部分生化特性，出現了非典型菌株。我們相信，如能結合了鑑定非典型菌株或使其定向變異時，同時進行耐藥性的測定將是具有重大的理論和實踐意義的。這方面以我們力所能及而看到的文獻中，還未有報導，因而更值得我們在這方面開展一些創造性的工作。

## 總 結

1. 將 6 株非典型痢疾桿菌（生化符合典型菌，血清學陰性），1 株福氏痢疾桿菌及 3 株其他腸道菌（第 III 型發碱桿菌、雷極氏變形桿菌及產碱桿菌）進行定向變異試驗。蒙導菌用志賀氏痢疾桿菌、宋內氏痢疾桿菌、福氏痢疾桿菌及斯氏痢疾桿菌的死菌液。其中 1 株非典型福氏痢疾桿菌獲得了凝集福氏抗血清的性能。
2. 從定向變異後所表現的生化及血清學性狀探討非典型菌株的特性和來源問題。
3. 討論中提出了研究非典型菌株及其耐藥性的方向。

## 參 考 文 獻

- [1] Dawson, M. H. & Sia, H. P. (謝和平): *J. Exp. Med.*, **54**: 681, 1931.
- [2] 方心芳、湯佩松、蔡金科、吳瓊發: 植物學報, **5** (2): 137, 1956.
- [3] 高相文: 中華醫學雜誌, **42** (3): 240, 1956.
- [4] Weil, A. J. & Binder, M.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **66**: 349, 1947.
- [5] Левицкая, Г. В.: *Ж. М. Э. И.*, (10): 26, 1954.
- [6] Фишер, Г. М., Фердинанд, М. М. и Ключников, А. Г.: *Ж. М. Э. И.*, (3): 24, 1956.
- [7] Рубашкина, Б. К.: *Ж. М. Э. И.*, (3): 31, 1955.
- [8] Алдакова, В. Д., Блямель, Н. Ф., Митрофанова, Е. Б. и Соловьева, Н. А.: *Ж. М. Э. И.*, (3): 23, 1956.
- [9] Месняева, В. М.: *Ж. М. Э. И.*, (3): 24, 1956.
- [10] 鄭武飛、盛金貞、陳祖瓊、徐維貞: 天津市飲食業工作人員等的腸道致病菌的帶菌檢查(天津醫學院微生物學教研組資料)。
- [11] 陳祖瓊、徐維貞、鄭武飛: 尚未發表的材料。

- [12] 方綱、王華敦：中華醫學雜誌，(3)：245，1955。  
[13] Кудлай, Д. Г.: Изменчивость, Микробов Кишечной Группы, Медгиз, 1954.  
[14] Перетц, Л. Г. и Бажедомова, М. А.: Ж. М. Э. И., (3): 7, 1955.  
[15] Тимаков, В. Д. ред.: Изменчивость Микроорганизмов, Медгиз, стр. 38—44, 90—96, 1956.  
[16] Левицкая, Г. В.: Ж. М. Э. И., (10): 26, 1954.  
[17] Мороз, А. Ф.: Ж. М. Э. И., (3): 84, 1956.

## INDUCED TRANSFORMATION OF ATYPICAL DYSENTERY BACILLI

CHENG WU-FEI, CHEN TSU-KIUNG and HSU WEI-CHENG

*Department of Microbiology, Tientsin Medical College, Tientsin*

Six strains of atypical dysentery bacilli, one strain of *Sh. flexner* and 3 strains of nonpathogenic enteric bacilli (*Alkalescens* type III, *Prot. rettgeri* & *Alcaligenes fecalis*) were subjected to induced transformation. "Mentor" strains were *Sh. dysenteriae*, *Sh. sonnei*, *Sh. flexneri* and *Sh. schmitz*. The basal medium was 0.75% peptone water (to 1,000 ml. of distilled water add 7.5g each of peptone and NaCl, filter, adjust pH to 7.4, tube in 2 ml. amounts, sterilize in autoclave and ready for use). The "Mentor" strain was inoculated into the peptone water and incubated at 37°C for 48—72 hours. At the end of incubation period, the culture was killed by heat (60°C water bath for one hour). To each tube equal amount of 0.75% peptone water was added. Such mixture was the medium for serial passage employed in this study. Before use, all media were tested for sterility by various methods. During serial passage, at the end of every three generations, the culture was streaked on China blue plate. After incubation, from each plate three discrete colonies were fished and transferred to double sugar media, from which the culture was further tested serologically. After 30 generations, it was found that one of the atypical dysentery bacilli was induced to agglutinate Flexner antiserum. The ten induced strains all showed various degrees of change in biochemical activity. The origin of atypical strains is briefly discussed. Finally, it is pointed out that it is worth while to study atypical strains in connection with their drug resistance.