

布魯氏杆菌在胶膜上的培养技术和 电子显微鏡观察*

孙 紀 申

(中国医学科学院流行病学微生物学研究所, 北京)

电子显微鏡发明后,不少学者曾用来观察細菌的超微形态,可是利用一般銅絲网胶膜滴片观察时,常易引起細菌的人工变形^[1]。为了克服这种困难, Hillier、Knaysi 和 Baker 等^[2]于 1948 年創造了胶膜上培养細菌的方法,成功地观察了大腸杆菌、巨大芽孢杆菌等的生长。1953 年苏联 Покотинский 氏^[3]又提出了一种較为簡易的胶膜上細菌培养法,也取得了良好的結果。

在实验过程中,作者曾用胶膜滴片法先后观察过布魯氏杆菌标准株(牛型、羊型和猪型)及巴拉登等株,但单纯使用胶膜滴片法,不能深入观察它們在生长繁殖各阶段中的变化,为了研究布魯氏杆菌在繁殖中形态的变化,作者对胶膜上培养法进行了試驗。起初,采用了 Покотинский 氏法,但此法对布魯氏杆菌有不利的影響,在培养不同時間后进行观察,仅能看到少数菌体略有增大,其原生質向二端濃縮的为数較少,显著分裂的情况更为少见。我們估計用 Покотинский 法培养时,琼脂中的养料須通过滤紙、銅网、火棉胶膜方能被細菌利用,由于营养的供应不够,細菌的生长繁殖也不显著,难于作出連續的观察。作者曾对 Hillier、Knaysi 和 Baker 氏法与 Покотинский 法作了改进,并設計了一套火棉胶膜上直接培养布魯氏杆菌的方法。現将此法的实验結果和对布魯氏杆菌在培养繁殖中的电子显微鏡观察报告如下:

一、实验方法

1. 制胶膜法^[4]

将制好的 1.5% 馬丁氏琼脂培养基平皿 (pH 7.4) 用灭菌蒸餾水洗 5 次,然后放入 1 厘米左右深的灭菌蒸餾水,在水面上加 1 滴 2% 火棉胶溶液,待薄膜形成后,利用虹吸法排去蒸餾水。在排水时,薄膜即随水下沉与馬丁氏琼脂培养基直接接触,待水全部排除后,置 37°C 温箱中 15 分钟,烤干残余水分,即可使用。

2. 培养方法

取生长 18 小时的布魯氏杆菌(菌苗菌株 Ba 19)培养物在生理盐水中制成悬液,每毫升含菌 10 亿个。用毛細吸管或白金耳取少量菌液,在上述琼脂平皿中的火棉胶膜上接种一滴,置 37°C 温箱中培养。于不同時間内陸續取出琼脂平皿,每一平皿均以 1% 鉍酸溶液的蒸汽固定 30 分钟。然后在平皿内加入灭菌蒸餾水或将平皿放入另一盛有洁淨灭菌蒸餾水的容器中,由于水的浮力,火棉胶膜就与琼脂脱离而

* 本文承魏曦教授、辛鈞教授审阅和指导,在实验研究工作中又得黃民华、陈国启等同志的大力协助,特此志謝。
本文 1962 年 8 月 29 日收到。

浮于水面。取若干銅網放置膜上,用濾紙將銅網連同膠膜撈起,置 37°C 溫箱或室溫中干燥(或用鑷子夾住銅網伸入膠膜下水中,將膜撈在銅網上)。然后用滅菌蒸餾水洗滌銅網上所支持的膠膜 2—3 次。干后,即可進行電子顯微鏡觀察。

3. 銅網清洗法

銅網在使用前必須經過嚴格洗滌。取銅網若干個置于錐形瓶中,注入適量的濃硫酸,將瓶口塞緊,用力振搖約 10 分鐘,然後將濃硫酸用毛細吸管除掉,在清水中洗數次,用蒸餾水洗二、三次。最後用 95% 乙醇浸泡數分鐘,取出待干備用。

4. 電子顯微鏡

本實驗所用電子顯微鏡為 Zeiss Typ C, 電壓 40 千伏。電鏡放大 6,000 倍,照相底片再放大 5 倍,制成圖片。

二、觀察結果

通過上述方法,作者初步觀察了有關布魯氏桿菌(菌苗菌株 Ba 19)的增殖情況。在膠膜上培養 1—7 小時的菌株,用電子顯微鏡觀察時,除了可見單獨菌体外(圖 1),尚可看到不少正在分裂的菌體。所有的菌體都有一個密度較大呈橢圓形的中心部分(即原生質部分)及包圍這一部分一個密度較低、套膜似的結構(即細胞壁部分)。大多數細菌以橫分裂法增殖,可以見到菌體變長,原生質也隨之改變,在菌體的中間部分的細胞壁變狹,向內凹陷(圖 2),有的菌體原生質中間部分也變細,已較明顯地分裂成了兩個菌體(圖 3)。有的菌體似乎剛分裂完畢,但兩個小菌體細胞壁還互相粘在一起(圖 4)。

此外,還曾看到了一些有意義的圖象(圖 5 中)菌體細胞壁及其原生質均呈 Y 形,作者認為是一種典型的分枝現象,1925 年 Gardner 氏又將分枝現象稱做 Y 狀或三點增生型,從作者電子顯微鏡觀察中也得到証實,由於電子顯微鏡的分辨能力和放大倍數均超過光學顯微鏡,因此,觀察的結果更為精確。

三、討 論

細菌在生長和增殖時必須有適當的環境,就作者觀察的結果來說,在馬丁氏琼脂培養基火棉膠膜上培養 1—7 小時的菌株,都可以看到單獨菌體和正在分裂的細胞,說明所用實驗方法是成功的。Покотинский 氏法由於細菌與營養物之間隔有三層障礙,不利於細菌生長,故實驗不久即不採用。我們的方法象 Hillier-Knaysi-Baker 法那樣,細菌是直接火棉膠膜上培養的,琼脂中的營養物質能通過火棉膠膜滲透上來,因此,細菌生長良好。但 Hillier-Knaysi-Baker 法要求用大片銅網挑取膠膜,然後加以剪裁,手續比較麻煩,同時又沒有提及是否使用固定液,因此在制作電子顯微鏡標本時,仍有引起人為變形的可能。針對上述問題,我們設計了以下的操作方法:第一,以 1% 鉬酸溶液所產生的氣體固定膠膜上的細菌約 30 分鐘,這樣既可防止或減少細菌的變形,還可使細菌形態更為清晰,鉬酸對細菌不但有固定的作用,還有染色的作用,即菌體中嗜鉬酸部分對電子有較強的散射作用,細菌的被染部分與其周圍結構襯托更為清晰,在照片上也可以獲得深淺分明的圖象。第二,以常用的小銅網(直徑 2—3 毫米)直接放在長有細菌的火棉膠膜上,用水將火棉膠膜漂浮後,即將小銅網連同火棉膠膜一併撈起,因此,改進了 Hillier-Knaysi-Baker 氏方法。

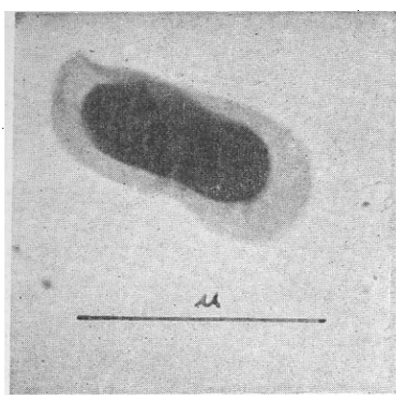


图1 布鲁氏杆菌在胶膜上培养1小时
(电镜放大6,000倍,照相底板放大5倍)。

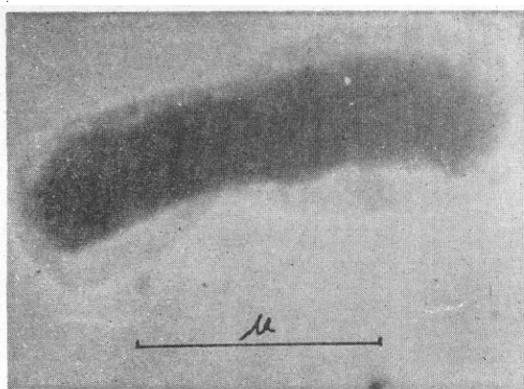


图2 布鲁氏杆菌在胶膜上培养7小时,菌体增长约一倍
(电镜放大6,000倍,照相底板放大5倍)。

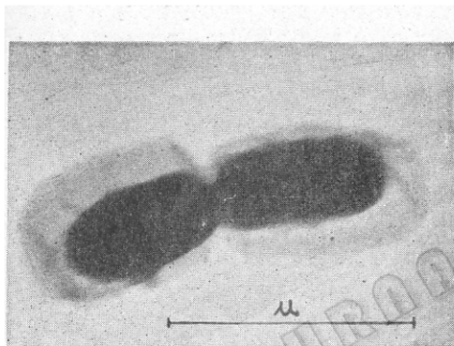


图3 布鲁氏杆菌在胶膜上培养6小时,可见
菌体中部缩小,准备分裂
(电镜放大6,000倍,照相底板放大5倍)。

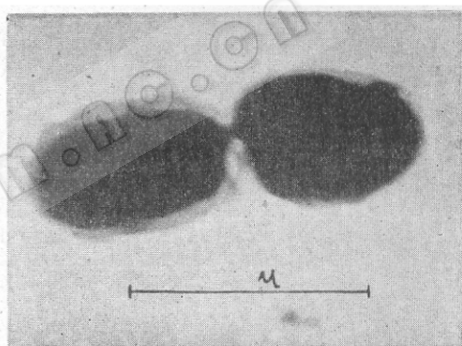


图4 布鲁氏杆菌在胶膜上培养2小时,菌
体即将分裂
(电镜放大6,000倍,照相底板放大5倍)。

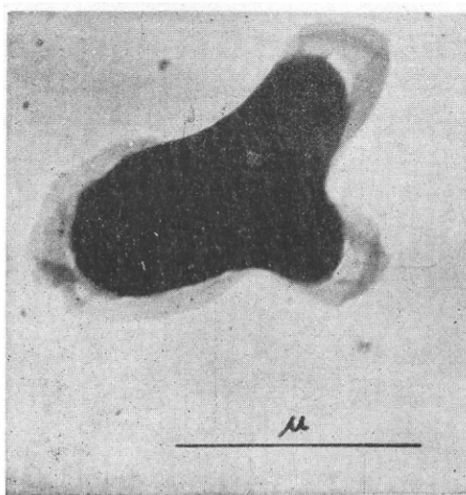


图5 布鲁氏杆菌在胶膜上培养2小时,可见枝桠分裂
(电镜放大6,000倍,照相底板放大5倍)。

四、結 語

作者参考 Hillier-Knaysi-Baker 氏与 Покотинский 氏的方法,并作了一些改进,即将布魯氏杆菌 Ba 19 株 18 小时培养物,直接接种在火棉胶膜上,进行培养,于一定時間后,用鉞酸的蒸气固定,然后用載标本銅网直接撈取有培养物的火棉胶膜,制作电子显微鏡标本,最后进行观察照相。

在电子显微鏡下观察时,除了可見单个菌体外,尙可見細菌分裂現象,其中大多数菌体是橫向二分裂,但也有少数菌体在一端呈枝桠状分裂,細胞壁及原生質形成 Y 形,作者認為是分枝分裂。

参 考 文 献

- [1] Mudd, S., and Anderson, T. F.: *J. Am. Med. Assoc.*, 126:561—571, 1944.
- [2] Hillier J., Knaysi G., and Baker R. F.: *J. Bact.* 56:569—576, 1948.
- [3] Покотинский, И. С. и Лузянина, Т. Я.: *Новости Медицины*, 38:99—101, 1953.
- [4] 武忠弼、庞其方、孙紀申: 电子显微鏡在医学及生物学上的应用, 人民卫生出版社, 北京, 48—56, 1961.

ON THE TECHNIQUE OF CULTIVATING BRUCELLA ABORTUS ON COLLOIDIN FILMS AND MORPHOLOGICAL OBSERVATIONS UNDER THE ELECTRON-MICROSCOPE

SUN CHI-SHEN

(Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

Brucella abortus strain Ba19 was cultivated on colloidin films by a modified method which made reference to the original work of Hillier-Knaysi-Baker and Покотинский. The colloidin film preparations were studied under electron-microscope.

Under the electron-microscope it was observed that among many isolated cells of *Brucella*, quite a number of cells were in the stage of active multiplication and most of them showed a process of transverse fission. Some cells with branching at one end were also observed. The cell wall as well as the cytoplasm of the bacteria gave a configuration like the letter Y. This is believed to be in a process of bacterial multiplication by branching.

The modified method of cultivating *Brucella* on the colloidin film for electron-microscope study is described and its advantages discussed.