

鼻疽菌在液體培養基內生長的研究

I. 通氣和通氧培養的研究

粟壽初 童昆周

(哈爾濱獸醫科學研究所)

近年來在死菌疫苗的研究中越來越多地使用通氣培養的方法,有人並認為這種方法可以提高製品的品質,例如,在獸醫生物製品方面,蘇聯 Волик 氏 (1953)^[1] 就曾報告以通氣培養方法製成的小牛副傷寒疫苗和鼻疽菌素的效力較用普通方法製成的更好。

我們在鼻疽免疫研究中,曾對鼻疽菌在液體培養基內的生長作了一些試驗,其中包括通氣和通氧培養的試驗。關於鼻疽菌在通氣和通氧條件下的生長,Miller 等氏 (1948)^[2] 和 Волик 氏 (1953)^[1] 均曾有過簡單的報告。我們的報告敘述用一種簡單的通氣裝置來培養鼻疽菌的結果,並探討影響它的生長的某些因素。

試驗材料和方法

菌種 R3—26 號鼻疽強毒菌種,係 1954 年 7 月自開放性鼻疽病馬分離的。菌種在 3% 甘油瓊脂斜面 (pH 6.8) 上保存於室溫,每 2 週傳代 1 次。傳代時均曾接種於含健康綿羊血清 10%、綿羊血紅素液 0.1% 的 3% 甘油瓊脂平板 (pH 6.8) 上,在 37°C 培養 48 小時,然後在解剖顯微鏡下 (6 × 1.8 倍) 用斜射光線檢查菌落形態、結構和螢光性,並挑選典型的強毒菌落繼代。使用前亦曾按上述方法挑選。

培養基 3% 甘油肉湯,含食鹽 0.5%, 蛋白胨 1%, pH 6.4, 分裝於容量為 1,000 毫升的廣口圓玻璃瓶 (瓶高 18 厘米,瓶底直徑 9.5 厘米,瓶口直徑 4 厘米),每瓶 600 毫升 (培養基高 10.5 厘米),在 120°C 高壓消毒器內滅菌 20 分鐘。

培養物之接種 接種用種子培養物為在 37°C 培養 24 小時的瓊脂斜面培養物,接種前加入 3% 甘油肉湯 5 毫升洗下,接種量在小量接種時為 0.2 毫升,大量接種時為 2.0 毫升 (除另有說明者外,通氣培養時均為小量接種,通氧培養時均為大量接種)。接種後培養物每毫升的活菌數,小量接種時為 1.5×10^6 — 4.5×10^6 ,大量接種時為 2.0×10^7 — 3.5×10^7 。培養物在 37°C 定溫箱中培養。

活菌數的測定 活菌數的測定根據 Snyder 等氏 (1946)^[3] 的方法。菌液用 3% 甘

油肉湯 (pH 6.8) 連續 10 倍稀釋，將適當濃度的稀釋菌液接種於血清血紅素甘油瓊脂平板上，接種量為 0.2 毫升，菌液用滅菌彎曲玻棒均勻塗佈於瓊脂表面，每一稀釋液至少接種平板 3 個。平板在 37°C 定溫箱培養 48 小時，第一天正放，使菌液乾燥，第二天再將平皿倒轉。48 小時後計算菌落數目，同時並觀察菌落形態，注意有無變異。

pH 的測定 測定前菌液先在流通蒸氣消毒器中滅菌 40 分鐘，然後用比色法測定 pH。當菌液濃度大時，比色不易準確，曾用中性蒸餾水稀釋 10 倍。當同一菌液分別用溴麝香草酚藍及酚紅測定結果不一致時，如 pH 在 6.8 以下即根據溴麝香草酚藍測定的結果，pH 在 6.8 以上則根據酚紅測定的結果。

通氣裝置及通氣速度的測定 我們所用的通氣裝置是參考 Miller 等氏 (1948)^[2]，Волик 氏 (1953)^[1] 和林飛卿等氏 (1954)^[4] 的報告設計的。它的原理就是利用流水吸筒在培養基表面造成的負壓使空氣經由放置於培養瓶底部的砂棒分散成許多小氣泡進入培養基內。培養基的表面蓋有滅菌的純豬油一層，防止產生過多的泡沫。進入培養基內的空氣經過滅菌的棉花濾器濾過。在培養瓶與流水吸筒之間設有緩衝瓶數個，其中 2 個裝有濃石炭酸液，由培養瓶出來的氣體在排出之前要兩次通過石炭酸液消毒，以防止鼻疽菌污染室內的空氣。

在試驗初期，通氣速度是直接由調節水流的速度來控制的，由於自來水的水壓不穩定，以致通氣過程中通氣速度常有很大的變化，後來參考 Разумовская 和 Митюшова 二氏 (1955)^[5] 的報告增設了一個調節器，才基本上解決了這個問題，不過我們沒有採用他們的環狀玻管裝置，而改用了一個玻璃活塞。我們還發現，如果在調節瓶的進氣管上加一段橡皮管並用夾子輕輕夾住以縮小進氣口，則不僅可以調節水壓，而且可以加大緩衝瓶內的負壓，此時即可在緩衝瓶上接連 4—5 套培養瓶同時通氣。整個通氣裝置如圖 1。

我們所用的砂棒是一種濾水用的砂棒，長 5.7 厘米，外徑 1.6 厘米，內徑 0.8 厘米，民主德國製造，孔徑不明。實際上不同砂棒的孔徑亦不一致，因此每一砂棒的進氣速度均必須在每次試驗前分別測定。測定的方法是在一個培養瓶內裝水 600 毫升，在其中倒置一個容量為 50 毫升的玻璃管，並將砂棒倒插入管內，然後將這個培養瓶接在圖 1 所示位置上在一定壓力下通氣，此時砂棒中放出的氣泡即將玻璃管內的水排出，測定管內的水被排出所需的時間，調節水壓以求得每分鐘進入一定空氣所需的水壓，同時並記錄水銀柱的高度，以作試驗時調節通氣速度的依據。

當然，這種測定通氣速度的方法不可能是十分準確的，但是在沒有更精確的測定方法的條件之下，根據我們的經驗，它却基本上可以使通氣速度有一定的標準，因而保證了試驗結果的可重複性，可以比較氣量大小對細菌生長的影響，並找到適於細菌生長的通氣量。

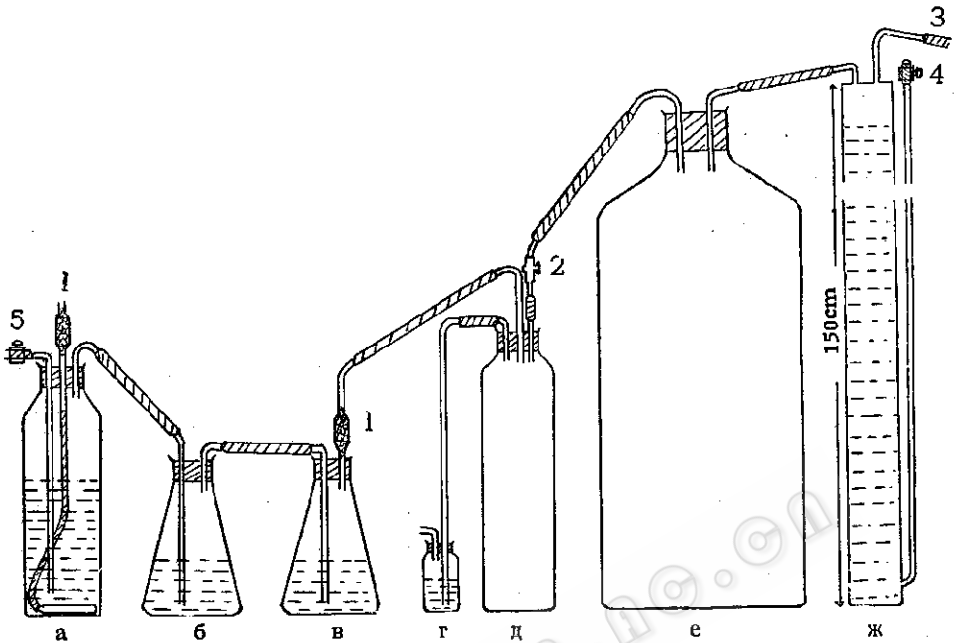


圖 1 通氣培養裝置簡圖

- | | |
|------------|-----------|
| a. 培養瓶 | 1. 棉花濾器 |
| б, в. 石灰酸瓶 | 2. 玻璃活塞 |
| г. 水銀壓力計 | 3. 連接水流泵 |
| д. 小緩衝瓶 | 4. 調節器進氣口 |
| е. 大緩衝瓶 | 5. 樣品管 |
| ж. 調節器 | |

在通氣培養時，氧氣是由氧氣瓶經過蔡氏濾器吹入培養基內，通氣速度則由減壓器和氫氧吹管的活門來調節，帶有水銀壓力計的緩衝瓶係裝置於氧氣瓶與濾過器之間。通氣速度測定的方法同上。

試驗結果

1. 通氣培養試驗 在通氣培養時，通氣速度無疑是影響細菌生長的重要因素之一，Gee 和 Gerhardt 氏 (1946)^[6] 以通氣方法培養豬流產菌時對此曾作過詳細的研究。不過在有關鼻疽菌通氣培養的文獻中，則不論是 Miller 等氏 (1948)^[2] 或 Волик 氏 (1953)^[1] 的報告均沒有指出通氣速度與其生長的關係。我們的試驗主要是針對這一問題進行的。

在我們的試驗中通氣速度分二種：第一種在培養基 600 毫升內每分鐘通入空氣 600 毫升，即每分鐘通入空氣的量與培養基量的比例為 1:1，簡稱大量通氣；第二種在培養基 600 毫升內每分鐘通入空氣 300 毫升，即空氣量與培養基量的比例為 0.5:1，簡稱小

量通氣。比較兩種通氣量對鼻疽菌生長的影響的試驗結果如圖 2。

由圖 2 可見在通氣培養時通氣速度對鼻疽菌的生長有顯著影響，大量通氣時培養物中的最高活菌數為 2.7×10^{10} /毫升，小量通氣時則僅 1.5×10^{10} /毫升，相差將近一倍。這種差別是具有一定意義的，根據我們多次試驗的結果，大量通氣時培養物每毫升中的最高活菌數均在 2.6×10^{10} — 2.7×10^{10} 之間，而小量通氣則在 1.4×10^{10} — 1.6×10^{10} 之間。大量通氣時除最高活菌數較多外，菌數增加的速度顯然也更快。

在小量通氣試驗中，我們也曾比較通氣前靜止培養與不靜止培養對鼻疽菌生長的影響。靜止培養的試驗係在培養物接種之後先行靜止培養 12 小時然後通氣，結果培養物每毫升的活菌數在 12 小時為 2.2×10^9 ，24 小時為 4.0×10^9 ，48 小時為 1.2×10^{10} ，72 小時為 1.6×10^{10} ，與不靜止培養的結果十分接近（參看圖 2），可見小量通氣時通氣前靜止培養與不靜止培養對鼻疽菌的生長無影響。這一靜止培養的試驗和圖 2 小量通氣的曲線比較起來菌數增加的速度似乎較慢，不過我們認為這不可能是受靜止培養的影響，這個試驗是最初進行的試驗之一，當時尚沒有調節水壓的調節器，在試驗過程中通氣的速度常有較大的變動，這可能是造成這種差異的原因。

雖然在當時也曾考慮到接種量和培養條件不一致對它的影響，但是在這種通氣時間相隔 12 小時的試驗中，實際上無法使得接種量和培養條件都完全一致，因此在重複這一試驗時，我們改為靜止培養 6 小時與不靜止培養的比較，而通氣速度亦改為大量通氣。這一試驗中種子培養物自斜面洗下之後接種第一瓶培養基置於 37°C 靜止培養 6 小時然後通氣。在此期間種子培養物放置室溫，6 小時後接種第二瓶培養基並立即通氣。試驗結果表明兩瓶培養物的生長完全一致（圖 3），可見靜止培養與否在大量通氣時對鼻疽菌的生長也無顯著影響。

前已指出，在上述試驗中接種時均為小量接種，接種後培養物每毫升中的活菌數在 1.5×10^6 — 4.5×10^6 之間。為了闡明在通氣條件下接種量不同對鼻疽菌生長的影響，我們曾進行下列的試驗。甘油肉湯 2 瓶分別接種種子培養物的洗液 0.2 及 2.0 毫升，接種後培養物每毫升的活菌數分別為 1.5×10^6 及 1.8×10^7 ，均用大量通氣方法培養，

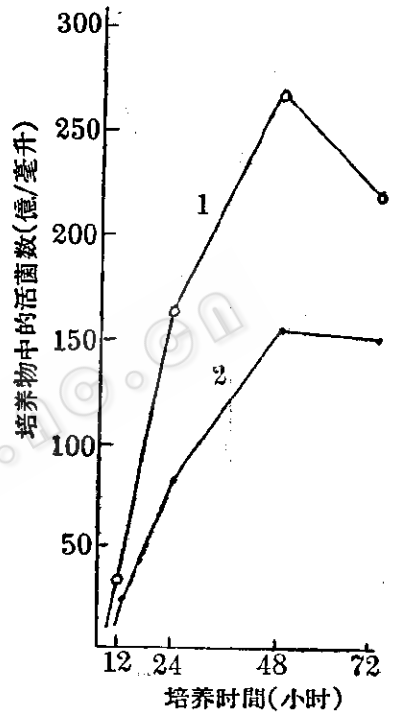


圖 2 通氣速度對鼻疽菌生長的影響

- 1. 大氣量；
- 2. 小氣量。

結果證明接種量不同在通氣培養的 12—72 小時之內對鼻疽菌的生長基本上沒有影響，在 48—72 小時二者的菌數幾乎相同（圖 4）。

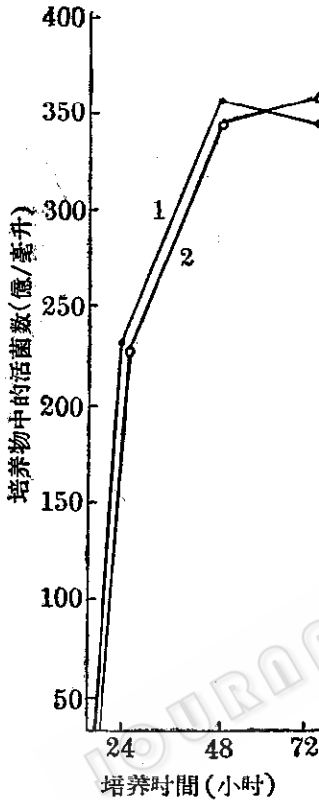


圖 3 通氣前靜止培養 6 小時與不靜止培養對鼻疽菌生長的影響

1. 通氣前靜止培養 6 小時；
2. 不靜止培養。

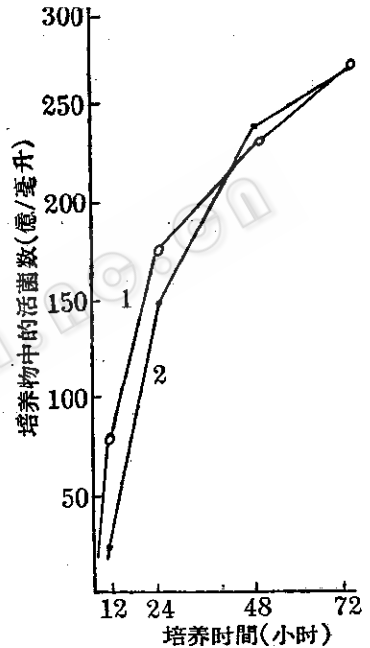


圖 4 不同接種量對鼻疽菌生長的影響

1. 大接種量；
2. 小接種量。

在以上的試驗中培養物的 pH 均沒有顯著的改變，在 12—24 小時可能稍上昇 (7.2—7.4)，但是當菌數大量增加時就逐漸下降至 6.6—6.4。此外，在以上試驗中在計算菌數時我們也曾注意菌落形態的變化，結果均未發現變異的菌落。

2. 通氣培養試驗 在通氣培養試驗中着重探討的也是通氣速度對鼻疽菌生長的影響。在最初的幾次試驗中原來也是用小接種量，但是後來發現在這種條件之下，不論是大量或小量通氣，細菌的生長均甚緩慢，3 次試驗的結果如表 1。

由表 1 可見在通氣條件下小量接種時培養物活菌數目增加的速度比通氣培養慢，而且大氧量似乎比小氧量更慢，雖然最後的最高活菌數仍然是大氧量的較多。由於這

表 1 通氣條件下深層培養小量接種時鼻疽菌的生長

試驗號	每分鐘通氣量(毫升)	培養過程中不同時間培養(小時)物中的活菌數(億/毫升)					
		0	12	24	36	48	72
2—1	300	0.024	<0.5	3.0	154	355	373
2—2	600	0.014	<0.0065	<0.33	<0.55	5.6	426
5—2	600	0.016	0.3	3.0	—	291.6	440

註：帶“<”記號的數字表示計數平板上的菌落過少，因而計算出來的數字準確性較差。

些試驗的結果不够滿意，所以以後的試驗都採用大接種量。大量接種時通氣速度對鼻疽菌生長的影響如圖 5。

由圖 5 可見大量通氣時在 72 小時培養物中的活菌數可達到 6.8×10^{10} /毫升，比小量通氣時的最高活菌數 3.1×10^{10} /毫升要多出一倍以上。與前述通氣培養的結果相比較，則小量通氣與大量通氣的結果相近似，而大量通氣所達到的最高活菌數比大量通氣所能達到的最高活菌數幾乎也多出一倍。可見深層培養時通氣比通氣更適於鼻疽菌的生長。

不過在大量通氣試驗中也曾出現過一次異常的現象，試驗培養物在 48 小時以前生長良好，培養物的活菌數於 48 小時達到 6.6×10^{10} /毫升。但 72 小時檢查時在 10^{-7} 和 10^{-8} 稀釋菌液接種的 9 個平板上，僅 3 個平板各有 1 個菌落，不過劃綫接種的平板仍有大量生長；96 小時檢查，在 10^{-7} 稀釋菌液接種的 3 個平板上，僅 1 個平板有 1 個菌落，劃綫接種的平板也祇有稀疏的生長，說明 48 小時後細菌大量死亡。此外，培養物的 pH 的變化也和正常不同，在正常情況之下，不論是大量或小量通氣，培養物的 pH 一般在 24 小時均上昇至 7.2—7.4，48—96 小時仍降回至 6.6—6.2 上下，即並無顯著的波動。但在這一試驗中培養物的 pH 則下降極快，在 12—24 小時由 6.8 上昇至 7.4，36 小時降回至 6.4，48 小時 pH 為 5.6，而 72—96 小時均下降至 4.6。

當時我們曾懷疑 48 小時以後細菌死亡的原因與通氣量有關，因此曾用更大的通氣量進行過兩次試驗，不過這兩次試驗沒有詳細測定通氣速度，祇是儘量放大氣量至產生的泡沫尚不致溢出培養瓶的程度。試驗過程中細菌的生長和培養物的 pH 變化如表 2。

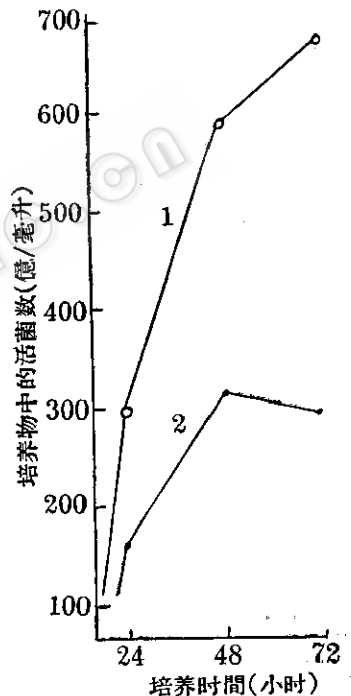


圖 5 通氣速度對鼻疽菌生長的影響

1. 大氣量； 2. 小氣量。

表 2 通氧量大於 1:1 時培養物中的菌數和 pH 變化

試驗號	培 養 時 間 (小時)							
	0		24		48		72	
	菌 數*	pH	菌 數	pH	菌 數	pH	菌 數	pH
8-1	0.15	6.4	180	7.4	210	4.6	0**	4.4
8-2	0.17	6.4	170	7.4	170	4.6	0	4.4

* 億/毫升; ** 接種 10^{-7} 稀釋菌液 0.2 毫升的平板無細菌生長, 劃綫接種的平板亦僅有少數菌落。

由表 2 可見, 當通氧量大於 1:1 時, 24 小時的活菌數僅能達到小量通氧的水平, 在 48 小時亦不繼續增長, 而此時培養物的 pH 則下降至 4.6, 72 小時細菌即大量死亡, 可見太大的氧量對鼻疽菌的生長實有不良的影響。由此看來前一試驗中細菌在 48 小時後死亡的原因, 頗可能是在試驗過程中通氧速度發生了改變。

在通氧培養時培養物中的活菌數目雖然更多, 但也從未發現菌落形態發生型的改變, 即使在上述細菌死亡的場合, 不論是在計數平板上或劃綫接種的平板上也均未發現變異的菌落。

討 論 和 總 結

鼻疽菌在通氣和通氧條件下深層培養時, 通氣(或通氧)速度對細菌的生長有顯著的影響。當培養基 600 毫升中每分鐘通入的空氣量與培養基量的比例為 1:1 時, 在 48—72 小時之內, 培養物中的活菌數可達到 2.6×10^{10} — 2.7×10^{10} /毫升; 當此種比例為 0.5:1 時最高活菌數為 1.4×10^{10} — 1.6×10^{10} /毫升。當通入的氧氣量與培養基的比例為 1:1 時, 在 48—72 小時之內培養物中的活菌數更高, 可達到 4.2×10^{10} — 6.8×10^{10} /毫升; 而當二者的比例為 0.5:1 時亦可達到 3.1×10^{10} — 3.7×10^{10} /毫升。根據 Miller 等氏 (1946)^[2] 的資料, 通氣培養時在 3—5 天之內所達到的最高活菌數為 1×10^9 — 5×10^9 /毫升, 通氧培養時為 8×10^9 — 2×10^{10} /毫升。可見我們所得的結果要好一些, 不僅每毫升培養物中的活菌數較多, 而且在不同試驗中菌數的差異範圍也較小。

在通氣培養時接種量相差 10 倍左右對鼻疽菌的生長沒有可見的影響, 這和 Gee 和 Gerhardt 氏 (1946)^[6] 用豬流產菌和 Ungar 等氏 (1950)^[7] 用百日咳桿菌所作試驗的結果基本相同。通氣前靜止培養 6—12 小時與否亦無顯著的區別, 可見鼻疽菌與傷寒菌不同, 接種後立即通氣對其生長並無有害的作用 (林飛卿等氏, 1954)^[4]。但在通氧培養時則曾發現兩種比較特殊的情況: 1) 當培養基中每分鐘通入氧氣的量大於 1:1 時, 細菌於 48 小時之後大量死亡, 培養物的 pH 急速下降; 2) 小量接種時培養物的生

長極為緩慢，而且通氧速度大時比通氧速度小時似乎更慢。可惜我們由於受到條件的限制目前尚不能分析發生這種現象的原因。雖然後一種情況也可能解釋為生長的緩慢期的延長；但是緩慢期長達 24—48 小時之久似乎是不太合理的，何況在通氣條件下還看不到這種現象。

在通氣和通氧培養時，在一般情況下，培養物的 pH 無顯著的變化，在培養過程中細菌的菌落不發生型的變異，而細菌的積累則極多，所以和靜止培養比較起來有顯著的優越性。在靜止培養時，鼻疽菌在 3% 甘油肉湯中培養 15—20 天之後活菌數常常不過祇有 5×10^8 /毫升左右，而在培養過程中培養物的 pH 迅速上昇，並發生大量的變異，特別是經常觀察到大量的所謂“絨髮型”(C 型)和粗糙型(R 型)菌落(根據持田勇(1939)^[8]的分類)。不過我們也有過這樣的印象，即將通氣或通氧培養物接種於平皿上培養 48 小時後在實體顯微鏡下觀察時，菌落雖然並無型的變異，但似乎比該菌種在通氣或通氧前的菌落稍小一些，結構較為緻密而螢光性亦較強；祇是這種特性並不穩定，一經移植即回復到通氣前的狀態。這種特性能否以連續通氣培養的方法加以固定，伴隨着這種形態上的改變是否也發生其他性狀的改變，則仍有待進一步的觀察來證明。

用通氣培養方法培養鼻疽菌除在研究工作中有一定的意義外，它在生產上也具有可利用的價值。我們曾試驗用通氣培養 72 小時的培養物高壓滅菌 20 分鐘並濾過之後製成鼻疽菌素，對馬作點眼試驗，並以標準鼻疽菌素作對照，初步證明它的效力決不低於標準製品的效力，這一試驗的結果我們將另文報告。

這一研究工作是在胡祥鑾主任領導下進行的，報告草成後承胡主任審閱指正；試驗進行中彭發泉同志曾代查參考文獻並提供意見，謹此一併致謝。

參 考 文 獻

- [1] Волик, Е. К.: Труды государственного научно-контрольного института ветеринарных препаратов, том IV, стр. 46, 1953.
- [2] Miller, W. R., Pannell, L., Cravitz, L., Tanner, W. A. and Ingalls, M. S.: *Jour. Bact.*, 55: 115, 1948.
- [3] Snyder, T. L., Engley, F. B., Penfield, R. A., and Creasy, J. C.: *Jour. Bact.*, 52: 241, 1946.
- [4] 林飛卿、余博霖、鄭寶芬、林國錦：微生物學報，2 (1)：13, 1954.
- [5] Разумовская, Э. Г. и Митюшова, Н. М.: *Микробиология*, 24: 265, 1955.
- [6] Gee, L. L. and Gerhardt, P.: *Jour. Bact.*, 52: 271, 1946.
- [7] Ungar, J., James, A. M., Muggleton, P. W.; Pegler, H. F., and Tomich, E. G.: *Jour. Gen. Microbiol.*, 4: 345, 1950.
- [8] 持田勇：日本獸醫學雜誌，1: 47, 1939.

STUDIES ON THE GROWTH OF *MALLEOMYCES* *MALLEI* IN LIQUID MEDIA

I. AERATION AND OXYGENATION

SU SHOU-CHU and TUNG KUN-CHOU

Harbin Veterinary Research Institute

The growth of *Malleomyces mallei* in deep cultures was greatly affected by the rate of aeration or of oxygenation. When air was introduced at the rate of 1 volume of air to 1 volume of media per minute, the maximum viable count attained at 48 to 72 hours was 2.6×10^{10} — 2.7×10^{10} organisms/ml; when the rate was 0.5:1, the maximum viable count was 1.4×10^{10} — 1.6×10^{10} organisms/ml. During oxygenation, when oxygen was introduced in the rate of 1:1; the maximum viable count in 48 to 72 hours may reach as high as 4.2×10^{10} — 6.8×10^{10} organisms/ml; when the rate was 0.5:1, the count was 3.1×10^{10} — 3.7×10^{10} organisms/ml. It is evident that oxygenation is much more favourable for the growth of this organism than aeration.

The size of the inoculum apparently has little effect on the growth of the organism during aeration. Moreover, the growth was not significantly affected whether the culture was given a preliminary incubation in the ordinary manner for 6 to 12 hours before aeration. But during oxygenation, the initial inoculum must contain not less than 2.0×10^7 — 3.5×10^7 living organisms/ml, otherwise the growth would be very much retarded.

When the rate of oxygenation exceeded 1:1, death of the organisms occurred rapidly in 48 hours, accompanied by a rapid decline of the pH of the media to 4.6. The actual cause of this phenomenon was not yet determined.

In the course of aeration or of oxygenation, the pH of the medium generally rose to 7.2—7.4 at the end of 24 hours, and then dropped gradually to about 6.4 at the end of 72 hours. When the cultures were examined at the end of 72 hours of aeration or of oxygenation, no evident variation in the morphology of colonies could be observed.

The possibility to prepare mallein in aerated deep cultures was briefly discussed.