

痢疾桿菌分離培養基的研究

I. 各種膽鹽的比較*

(去氧膽汁酸鹽加牛膽汁酸鹽培养基及牛胆汁透析物培养基的初步成績)

鄭 翼 宗**

(北京醫學院微生物學教研組)

腸系病原桿菌的分離培养基,目前在國內廣泛應用者有遠藤培养基及中國藍培养基等。這些培养基對腸系病原桿菌抑制作用很小,並且又能夠抑制一部分腸內球菌類的生長,但其對大腸桿菌等非病原桿菌的抑制能力是極為微弱的。它們的鑑別作用專靠菌落的顏色及其形狀。

1935年 Leifson^[1]所提倡的“去氧膽汁酸鹽培养基”受到各方面的注意,並被承認為一種良好的選擇性鑑別培养基。該培养基對大腸桿菌等非病原桿菌的抑制作用是非常顯著的,而對於沙門氏菌屬的抑制作用則很小,但對痢疾桿菌屬却存在着一些缺點。Leifson記載30株福氏痢疾桿菌中,只有一株不生長,而數株志賀氏桿菌和多數株宋內氏桿菌則全部被抑制。

所謂 Bacto-SS 培养基是為了彌補去氧膽汁酸鹽培养基的缺點,而設計的一種膽鹽培养基。該培养基對大腸桿菌等以及球菌類的抑制作用,不遜於去氧膽汁酸鹽培养基,而其對腸系病原桿菌特別是痢疾桿菌的抑制作用則比後者較小。因此該培养基在世界各方面受到廣泛的追試。和其他培养基的比較(包含遠藤培养基、中國藍培养基、“E. M. B.”氯化銣培养基、亞硫酸銨培养基、Kauffmann氏培养基以及去氧膽汁酸鹽培养基及 Mac Conkey氏培养基等)都證明 SS 培养基是比較優秀的。應用 SS 培养基於各種腸系病原菌的分離方面者有 Surraco^[2], Hardy^[3], Rose 與 Kolodny^[4]等氏的報告。特別對於痢疾桿菌的分離方面的試驗則有 Mayfield, Goeba^[5], Pot^[6], Candill^[7]等氏的研究;其他 Neter 與 Clark^[8], 及 F. Roland^[9]等氏也得到同樣的結果。在我國則有陸氏^[10]、金氏^[11]等的報告。以

* 1956年10月13日收到。

** 現在北京結核病研究所。

上諸家的報告雖然都肯定了 SS 培养基的優點,但該培养基對某些痢疾桿菌特別是志賀氏痢疾桿菌及宋氏痢疾桿菌的抑制作用還是不小的。另外,該培养基之主要成分“胆鹽第 3 號”的組成尚未公開。近幾年來為了解決“胆鹽第 3 號”的問題,在各國都有一些研究,有人企圖以胆汁酸代替,有人就以乾燥胆汁粉末稱為胆鹽來代用。(坂崎及山田^[12])

在文獻上可以看到蘇聯的 Васто-Ж 培养基以及 Проскирев 培养基對於分離腸系病原桿菌的優越性。但其中胆鹽成分的組成,目前還沒有機會知道。最近 Бубес 氏^[13],報告以一種牛胆汁培养基可以代替 Проскирев 培养基, Бубес 氏培养基的組成如下:肉或胎盤消化液,魚的自溶液,或普通肉湯蛋白陳的瓊脂培养基 1000 cc 加上乳糖 10 克,硫代硫酸鈉 8.5 克,枸橼酸鈉 10 克,第二磷酸鈉 3 克及有角家畜(牛、羊)胆汁 90 cc, 1% 中性紅水溶液 3cc,此外為了抑制球菌類的生長可以再加上 2% Rosalic 酸酒精溶液 2cc。

著者鑑於目前國家的需要,自 1954 年起初步比較各種胆鹽在分離培养基上的作用,發現有幾點值得注意的,茲報告於下。

實驗材料及方法

1. 供試菌

(1) 本教研組保存菌株:

- 1) 大腸桿菌——大北、大_S、大_F等 3 株。
- 2) 痢疾桿菌——志賀氏桿菌: 志、協、錢等 3 株;福氏桿菌: 福 1 株。
- 3) 傷寒桿菌——T_H 1 株。

(2) 新分離菌株: (1954 年中央衛生研究院微生物學系在北京分離的)

志賀氏痢疾桿菌: 105, 331, 540, 575, 715, 1034, 1077, 1126, 1139, 1315 等 10 株。

2. 接種菌量

牛心浸湯培養 18 小時的菌液一白金耳稀釋於 3cc 生理食鹽水內,取一白金耳塗於平皿。

3. 培养基

(1) 基礎培养基:

牛肉浸液 1000 cc. Proteose Peptone, Difco, 5 克。乳糖 10 克,枸橼酸鈉 2H₂O 8.5 克,硫代硫酸鈉 2H₂O 8.5 克,枸橼酸鐵 1 克,煌綠 0.33 毫克,中性紅 0.025 克,瓊脂 18 克。

(2) 平皿: 在以上基礎培养基中加上各種胆鹽後作成平皿,每皿含 20cc 培养基。

4. 胆鹽

(1) “胆鹽第 3 號”: Bacto-Bile Salts No. 3. Difco.

(2) 去氧胆汁酸鹽: Sod. desoxycholate, Difco.

(3) 牛膽胆汁酸鹽: Sod. taurocholate, Merck.

(4) Plattner 結晶: 為牛膽胆汁酸鹽 (Sod. taurocholate) 及甘胺胆汁酸鹽 (Sod. glycocholate) 的混合物。

按下法製取: 牛胆汁 100cc 加活性炭, 使其吸取胆鹽成分; 然後把活性炭濾過, 蒸發水分後, 以熱純酒精抽出。等酒精冷卻後加乙醚使產生沉澱至上清不再混濁為止。將沉澱以濾紙濾過, 乾燥; 就可以得到結晶狀粉末。

(5) 透析胆鹽: 以玻璃紙作成袋狀, 內放牛胆汁 250cc, 在 500cc 雙蒸水中透析; 將外面雙蒸水每隔兩天換 1 次, 共 3 次, 每次所得外面的透析水在水鍋上用蒸發皿蒸發, 等尚未完全乾涸以前移至暖箱。待乾後以刀刮下, 研磨, 很容易就可以得到粉末狀的胆汁透析物共 9 克左右。(暫稱為透析胆鹽)。

實 驗 結 果

實驗 I 各種胆鹽的初步比較

將各種胆鹽及牛胆汁加在基礎培养基上作成平皿, 初步比較其對大腸桿菌、痢疾桿菌及傷寒桿菌等少數菌株的作用, 其結果見表 1。

表 1 各種胆鹽對於生長的作用

胆鹽及含量	菌 株	大 腸 菌 大 北	痢 疾 桿 菌		傷 寒 菌 T _H
			志	福	
胆鹽第 3 號 0.85%		10	+++	++++	++++
去氧胆汁酸鹽 0.5%		5	+	++++	++++
牛膽胆汁酸鹽 0.85%		500	+++	++++	++++
Plattner 結晶 0.85%		300	+++	++++	++++
去氧胆汁酸鹽 0.5% 加 牛膽胆汁酸鹽 0.35%		3	+++	++++	++++
去氧胆汁酸鹽 0.5% 加 Plattner 結晶 0.35%		4	+++	++++	++++
透 析 胆 鹽 1.0%		20	+++	++++	++++
牛 胆 汁 10.0%		750	+++	++++	++++
遠 藤 培 基		10000	+++	++++	++++

註: 大腸菌的菌落數以實數表示; 痢疾桿菌及傷寒桿菌的菌落數如下

+ 1000 左右, ++ 2000 左右, +++ 3000 左右, ++++ 4000 左右。

從表 1 可以看到 (1) 在遠藤培养基上, 有 1 萬個菌落的大腸菌, 在基礎培养基加牛胆汁 10% 時, 就被抑制到 1 千次下 (750)。牛膽胆汁酸鹽及 Plattner 結晶比胆汁抑制力更大 (500 以下), 但去氧胆汁酸鹽和胆鹽第 3 號的抑制作用是非常顯著的; 大腸菌被抑制到 10 個菌落以下甚至於零。而透析胆鹽的抑制作用也和它差不多一樣 (20 個左右或

零)。(2) 傷寒桿菌 (T_H) 及福氏痢疾桿菌 (福) 在各種胆鹽或牛膽汁培养基上,均和在遠藤培养基上生長的一樣。(3) 但志賀氏痢疾桿菌 (志) 則有所不同;去氧胆汁酸鹽 0.5% 有相當的抑制作用 (菌落減少到 $\frac{1}{2}$ 左右);胆鹽第 3 號也稍微有一些抑制。但透析胆鹽、牛膽胆汁酸鹽、Plattner 結晶及牛膽汁都和遠藤培养基一樣。值得注意的是在去氧胆汁酸鹽 (0.5%) 加上牛膽胆汁酸鹽 (0.35%) 或 Plattner 結晶 (0.35%) 時,其對大腸菌的抑制作用仍然非常顯著而其對志賀氏菌的抑制作用則被中和。

以上幾點說明去氧胆汁酸鹽,對大腸菌抑制力很大,但對志賀氏菌也有相當的抑制作用,而牛膽胆汁酸鹽及 Plattner 結晶則對志賀氏菌不抑制,但其對大腸菌的抑制力是比較不夠的。胆鹽第 3 號的優點就是在其兼備以上兩方面的好處,即對大腸菌抑制力大而對志賀氏菌則不太抑制。關於這一點著者發現去氧胆汁酸鹽加上牛膽胆汁酸鹽或 Plattner 結晶就完全可以和胆鹽第 3 號發生同樣的效果,甚至於可以比它還好。透析胆鹽雖然對大腸菌的抑制力稍微差一點,但其對志賀氏菌的影響比之胆鹽第 3 號是更小的。

實驗 II. 對多數志賀氏菌株的進一步研究

根據上述結果,著者認為主要問題存在於一般被認為抵抗力最弱的志賀氏菌及宋內氏菌等。因此先用多數新分離的志賀氏菌作進一步的研究。其結果見表 2。

表 2 幾種胆鹽對志賀氏菌株的作用

胆 鹽	大 腸 菌	保存志賀菌株		新 分 離 志 賀 菌 株												
		大北	大S	大F	協	錢	105	331	540	575	715	1034	1077	1126	1139	1315
胆鹽第 3 號	0.85%	3	0	2	0	0	0	+++	+++	++	+++	200	++	+++	++	++
去氧胆汁酸鹽	0.5%	0	0	0	0	0	0	+++	+	++	+	200	++	+	++	++
去氧胆汁酸鹽	0.5%	0	0	0	250	0	300	+++	+++	++	+++	200	++	+++	++	++
加牛膽胆汁酸鹽	0.35%															
透 析 胆 鹽	1%	10	0	10	300	0	200	+++	+++	++	+++	200	++	+++	++	++

註:菌落數 500 以下者以數字表示; + 1000 左右; ++ 2000 左右; +++ 3000 左右。

從表 2 可以看到 (1) 在基礎培养基上各種胆鹽對大腸菌的作用都和實驗 I 一樣; (2) 而對志賀氏菌的關係則有兩點值得注意的: (i) 各菌株之間抵抗力有顯然的差別 (協, 錢, 105 等特別弱, 1034 次之, 其他菌株都比較強); (ii) 對各菌株的抑制作用在某些菌株 (540, 715, 1126 等) 以透析胆鹽及去氧胆汁酸鹽加牛膽胆汁酸鹽者為最小, 胆鹽第 3 號和它們一樣或稍微差一些, 而去氧胆汁酸鹽則最大。在另一些菌株 (331, 575, 1034, 1077, 1139, 1315 等) 則所有胆鹽的抑制作用都差不多。菌株 '協' 和 '105' 對去氧胆汁酸鹽及胆鹽第 3 號是特別敏感的, 完全受抑制而在透析胆鹽或去氧胆汁酸鹽加牛膽胆汁酸鹽培养基則可以生長出來一部分。但菌株 '錢' 在任何胆鹽培养基都不能生長。

以上事實說明，雖然在各種菌株間有所不同，但總的來講，對於志賀氏菌的抑制作用，可以說是去氧胆汁酸鹽最大，胆鹽第 3 號較小，而去氧胆汁酸鹽加牛膽汁酸鹽以及透析胆鹽則為最小的。

實驗 III. 去氧胆汁酸鹽和牛膽汁酸鹽以及透析胆鹽量的比例問題

為了更明確去氧胆汁酸鹽和牛膽汁酸鹽及透析胆鹽量的關係，著者挑選幾個菌株，在兩種胆鹽的各種比例下觀察細菌的生長情況（見表 3）。

表 3 不同比例去氧胆汁酸鹽及牛膽汁酸鹽的作用

去氧胆汁酸鹽 牛膽汁酸鹽			菌 株			志 賀 菌				
			大北	大s	大F	協	715	1034	1126	志
0.5%	—		0	0	0	0	800	200	+	+
0.5%	加	0.35%	0	0	0	250	+++	200	+++	+++
0.3%	加	0.55%	10	0	30	500	+++	200	+++	+++
0.17%	加	0.68%	30	0	30	500	+++	200	+++	+++
0.12%	加	0.73%	+++	0	+++	500	+++	++	++++	+++
胆 鹽 第 3 號		0.85%	1	0	2	0	+++	200	+++	+++
透 析 胆 鹽		1.0%	10	0	15	300	+++	200	+++	+++
透析胆鹽 0.6% + 去氧胆汁酸鹽 0.3%			10	0	0	250	+++	200	+++	+++

註：菌落數 1000 以下者以數字表示；+ 1000 左右；++ 2000 左右；+++ 3000 左右；++++ 4000 左右。

從表 3 可以看到（1）隨着去氧胆汁酸鹽的減少和牛膽汁酸鹽的增加而志賀菌的生長也逐漸增多，但同時對大腸菌的抑制則逐漸減少。直到去氧胆汁酸鹽 0.12% 加牛膽汁酸鹽 0.73% 時雖然連 1034 都生長的很好，但對大腸的抑制作用，也就幾乎消失了。為了一方面盡可能抑制大腸菌而另一方面使志賀菌也不太受抑制，著者認為去氧胆汁酸鹽 0.5% 加牛膽汁酸鹽 0.35% 的比例是最合適的。在這種比例下，其作用比胆鹽第 3 號是好的。（2）透析胆鹽的作用雖然稍為遜於去氧胆汁酸鹽 0.5% 加牛膽汁酸鹽 0.35% 的混合物，但比之胆鹽第 3 號是差不多的。透析胆鹽的缺點主要是在於大腸菌集落的顏色不能像去氧胆汁酸鹽，胆鹽第 3 號或去氧胆汁酸鹽 0.5% 加牛膽汁酸鹽 0.35% 那樣的集中而鮮明。但若在透析胆鹽 0.6% 加上 0.3% 去氧胆汁酸鹽時，則大腸菌集落的顏色就完全集中起來，而對大腸菌的抑制和志賀菌的生長來講，也就比胆鹽第 3 號好一些了。

討 論

關於各種胆鹽對傷寒桿菌的作用，過去有 Kleinsorgen^[14]；辻^[15, 16]及鷹取^[17]等氏的報告，但是對痢疾桿菌的作用則除了 Leifson 氏^[1]對去氧胆汁酸鹽的報告以外，還沒有人把各種胆鹽分開來比較，更沒有人把它們之間的互相關係闡明出來，從上面的實

驗,著者發現若去氧胆汁酸鹽適當地加上牛膽汁酸鹽時,去氧胆汁酸鹽對大腸桿菌的優良的抑制作用以及使培养基中的顏料(中性紅等)集中在菌落上的性質都仍然存在,而其對痢疾桿菌的抑制作用則顯著地被緩和,結果就可以勝過胆鹽第3號了。甘胺胆汁酸鹽因買不到成品,不能直接觀察其作用,但從 Plattner 結晶的成績看來很可能也是和牛膽汁酸鹽一樣的。在本試驗雖然所用的去氧胆汁酸鹽和牛膽汁酸鹽都是進口貨,但從牛胆汁分離精製這些胆鹽並不困難,我們相信不久就會有國貨可以供應的。

基礎培养基加上牛胆汁的作用,從對大腸菌的抑制作用看來和 Byöec 氏的成績是符合的。但牛胆汁比之透析胆鹽它對大腸菌的抑制力是相差很遠的。透析胆鹽對大腸菌的抑制作用比之去氧胆汁酸鹽加牛膽汁酸鹽或胆鹽第3號稍微差一點,但對痢疾桿菌的生長是很好的。透析胆鹽的缺點,可能是在於它不能很鮮明地把培养基中的顏料集中在集落上。這是由於透析胆鹽的主要成分是牛膽汁酸鹽和甘胺胆汁酸鹽,而去氧胆汁酸鹽的含量比較少的原因。若在透析胆鹽中加上少量去氧胆汁酸鹽時,一方面就可以完全鮮明地把培养基中顏料集中於菌落上,另一方面也就可以提高其對大腸菌的抑制力。

儘管透析胆鹽還有令人不滿的地方,但鑑於去氧胆汁酸鹽或胆鹽第3號價錢貴,目前尚無國貨,而進口貨也不易買到等等總的來講還是值得應用的。更兼其製造方法簡單,不需要特別設備,不費時間,在一般的研究室或化驗室隨時都是可以製造的。從經濟觀點來看,其成本比之去氧胆汁酸鹽或胆鹽第3號可以說是非常便宜的。

結 論

在 SS 培养基的基礎培养基上,比較各種胆鹽對志賀氏痢疾桿菌及大腸桿菌的作用,得到下面結論。

(一) 去氧胆汁酸鹽對大腸菌抑制力很大,但對某些志賀氏菌也有一定的抑制作用。牛膽汁酸鹽及 Plattner 結晶對大腸菌的抑制力比較差,但對志賀氏菌的生長影響很少。若在去氧胆汁酸鹽加上牛膽汁酸鹽或 Plattner 結晶時則對大腸菌的抑制力仍然很大,而對志賀氏菌生長的影響就顯然地減少。

(二) 去氧胆汁酸鹽 0.5% 加牛膽汁酸鹽 0.35% 的作用可以勝過胆鹽第3號。這樣我們就可以用已知的化學藥品來製備比 SS 培养基更好的分離培养基。

(三) 透析胆鹽(牛胆汁透析物)比胆鹽第3號對大腸菌抑制力稍微差一點,但對志賀氏菌的影響是比較少的。

(四) 透析胆鹽製法簡單,不需要特別設備,不花費長時間,在一般化驗室很容易自製,成本也低,因此在目前情況是值得推廣的。

參 考 文 獻

- [1] Leifson E.: *J. Path. Bact.* **40**: 581, 1935.
- [2] Sutraco: *Apartado de Los Archivos Uruguayos de Medicina*, **18**(6): 485—503, 1941.
- [3] Hardy and Co-workers: *Public Health Reports*, **57**: 521—524, 1942.
- [4] Rose and Kolodny: *J. Lab. & Clin. Med.* **27**: 1081, 1942.
- [5] Mayfield and Goeber: *Am. J. Pub. Health*, **31**: 363, 1941.
- [6] Pot: *The Lancet*, **1** **23**: 677, 1942.
- [7] Candill: *J. A. M. A.* **119**: 1402, 1942.
- [8] Neter E. R. & Clark P.: *Am. J. Digest. Dis.* **11**: 229, 1944.
- [9] F. Roland: *Ann. Inst. Past.* **73**: 68, 1947.
- [10] 陸氏: 中華醫學雜誌(英文版) **67**: 500, 1949.
- [11] 金氏: 微生物學報 **2**: 25—30, 1954.
- [12] 坂崎, 山田: 日本細菌學雜誌, **8**: (1) 75, (2) 199, 1953.
- [13] С. Ф. Бубес: *Лабораторное Дело* **2**: 23, 1956.
- [14] Kleinsorgen: *Zent. Bakt. Orig.* **104**: 439, 1927.
- [15] 辻: 日本微生物學病理學雜誌 **28**: 9, 1104, 1934.
- [16] 辻: 衛生學傳染病學雜誌 **30**: (3), (4) 181, 1934.
- [17] 費取: 日本細菌學雜誌 **7**: (4) 311, 1952.

STUDIES OF NEW CULTURE MEDIA FOR THE ISOLATION OF *SHIGELLA* GROUP

I. DESOXYCHOLATE-TAUROCHOLATE AGAR AND OX-BILE DIALYSATE AGAR

CHENG I-TSUNG

Department of Bacteriology, Peking Medical College, Peking

On the basis of comparative study of the effect of a number of bile salts on the S. S. agar base, descriptions are given of the composition and properties of several culture media for the isolation of *Shigella* group from fecal specimens.

1. Desoxycholate agar inhibited growth of *B. coli* extraordinarily but showed slight or remarkable inhibitory effect on some of the strains of *Shigella shiga*. Taurocholate agar or Plattner's-crystal (including sod. taurocholate and sod. glycocholate) agar showed weaker inhibitory effect on *B. coli* but supported good growth of *Shigella shiga* strains.

Addition of sod. taurocholate or Plattner's crystal to the desoxycholate agar permitted the media to maintain its remarkable inhibitory effect on *B. coli* and support good growth of *Shigella shiga*.

2. A preliminary study was made of the effect of several combinations of sod. desoxycholate and sod. taurocholate on the growth of several strains of *Shigella shiga* and *B. coli*. It became evident that desoxycholate (0.5%)—taurocholate (0.35%)—agar is preferable to bile salts no. 3-agar (S. S. agar), since it exerted a marked inhibitory effect on *B. coli* and yet permitted good growth of *Shigella shiga*.

3. Comparing with S. S. agar, ox-bile dialysate agar showed slightly weaker inhibitory effect on *B. coli* but supported better growth of *Shigella shiga*.

Addition of (0.3%) sod desoxycholate to (0.6%) ox-bile dialysate agar promoted the differential effect of the media and made it superior to S. S. agar.

4. Ox-bile dialysate can easily be prepared by dialysis in a clinical laboratory.