

細菌的微量培养方法

徐昭燊 馬树俊 周全义 黎希干

(內蒙古医学院, 呼和浩特)

緒 言

生物化学試驗, 在微生物学診斷中, 占有一定的地位。它們在腸道傳染病的診斷方面, 尤为重要。

目前國內所沿用的生化試驗方法, 共有兩個缺点: 第一, 就是耗費時間不少。每做一次生化試驗, 少則需要一天, 即在次日方能觀察結果。而有些試驗, 例如宋內氏痢疾杆菌之乳糖發酵試驗, 需要2天以上的時間。这就使細菌整個鑒定程序, 需要3—4天以上的時間, 方能完成^[1]。这对于傳染病之防治工作和流行病学之調查研究工作的要求, 是不能配合的。第二个缺点, 就是耗費材料頗多。每种細菌之鑒定, 需要作好几种生化試驗。由于今日医疗機構之大量扩充和增添, 标本檢查之总数亦日益增加。材料之耗費是非常可觀的。如能在同样的時間內, 使用同样数量的材料, 完成更多的标本的細菌檢驗工作, 这对于国家的衛生建設事業, 是非常有利的。

我們有鑒于此, 自1954年秋季, 根据 MacCreedy and Holmes 二氏^[2]应用微量的培养方法作腸道病原菌診斷之經驗, 对 Weaver 氏^[3]的微量培养方法, 做了一些研究和改进的工作。茲介紹如下:

材料和方法

材料

1. 糖發酵試驗。

(1) 基础培养基之成分:

肉	膏	0.3 克
蛋	白 朊	1.0 克
NaCl		0.5 克
酚	紅	0.002 克

琼	脂	0.3 克
蒸	餾 水	100.0 毫升

pH=7.2

分裝于 10×75 毫米的試管中，每管 0.3 毫升。灭菌备用。

(2) 糖溶液。將各种糖类，用蒸餾水配成 10% 的溶液，用 Seitz 氏濾器過濾灭菌。应用时可在 0.3 毫升上述的半固体培养基上加入一滴(約 0.06 毫升)使糖最后的濃度在 2% 左右。

溶解度較低的糖类，可以在加热溶化后過濾。Mackie 及 McCartney 二氏^[12]建議：貴重的糖类，可以配成 10% 的溶液，裝在螺旋盖小瓶中。連盖將整个瓶放在 60°C 的水浴中加热 1 小时灭菌，以避免過濾时之損失。Hannan 及 Weaver 二氏^[9]認為，有些糖类虽然在大培养中可以用高压蒸气的方法灭菌，但如用来做微量培养，有时就可能發生不正确的結果。然而，在我們的試驗中，尚未發現同样的情况。可是，高压蒸气可能使糖溶液的顏色变黑^[4]，則系事实。

2. 尿素酶試驗。培养基的成分^[5]如下：

尿	素	2.0 克
KH ₂ PO ₄		0.1 克
K ₂ HPO ₄		0.1 克
NaCl		0.5 克
酒	精	1.0 毫升
蒸	餾 水	99.0 毫升

pH=7.0

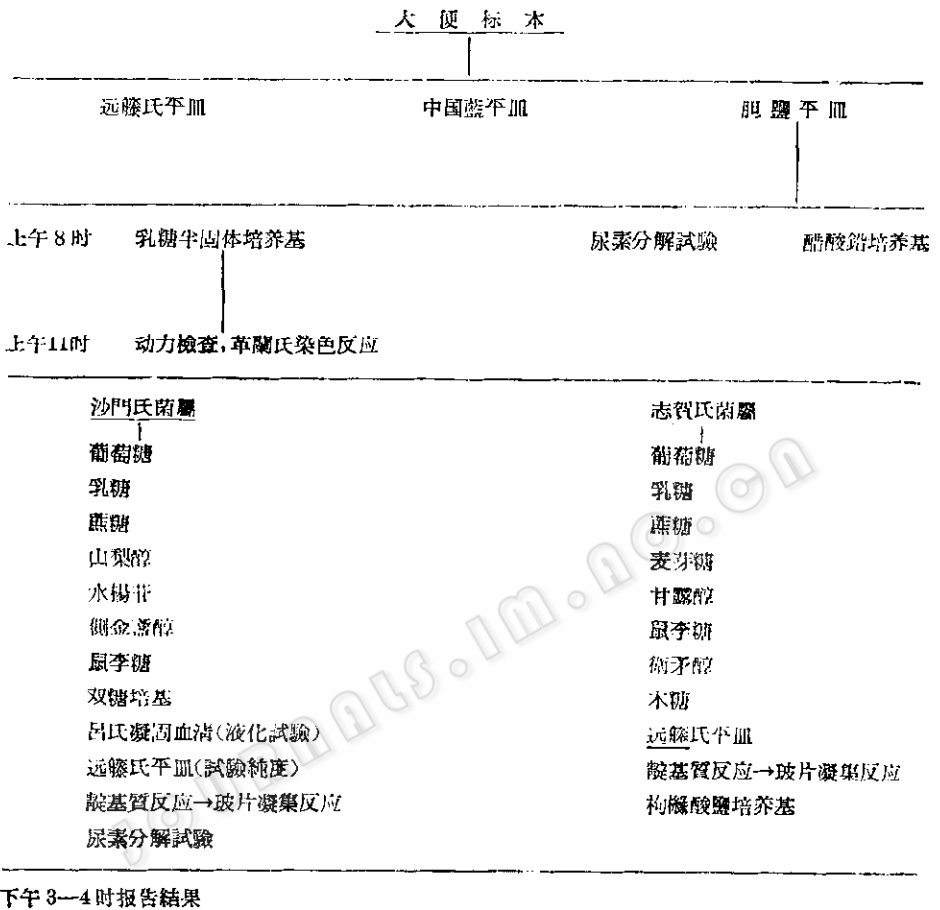
加 0.2% 酚紅水溶液 0.5 毫升。用過濾方法灭菌。分裝于 10×75 毫米的試管中，每管裝 0.3 毫升。

3. H₂S 試驗和胺基質試驗。培养基之成分和配制方法^[2]，并無特殊之处。但亦分裝于 10×75 毫米的試管中，每管 0.3 毫升。

实验方法

用白金耳或白金針將整个菌落取下，依次接种于乳糖酚紅半固体培养基，尿素培养基和醋酸鉛培养基內。放在 37°C 水箱中孵育。3 小时后取出观察結果。由乳糖管再度証实該菌能否發酵乳糖，并观察細菌有無动力。然后由乳糖管取出材料，接种到其他糖管中。以后再做塗片，用革蘭氏法染色，在显微镜下檢查。第二次接种的糖管亦放在 37°C 水箱中孵育 3 小时。和第一次接种的已孵育 6—7 小时的尿素培养基和醋酸鉛培养基，一同取出，观察結果見表 1。

表 1 用微量培養法檢驗腸道病原菌之程序：



結 果

我們取 14 種儲存菌種作試驗，其中 9 種曾反復作 2 次以上的實驗。結果見表 2。我們發現本方法具有下列三個優點：(1) 迅速。應用本方法，根據接種劑量之大小，可於 2—3 小時內得到生化反應之結果。(2) 正確。所得結果，95% 以上是和我們實驗室最近用大培養方法所作菌種鑒定的結果相符合的。(3) 操作方法簡便。經過我們將方法改進以後，手續已大為簡化。用白金耳將細菌種入即可。因此操作方法已不成為推廣微量培養方法之障礙。

討 論

郭可大氏的“抗生素放線菌的微量培養法”，在 1955 年的抗生素學術會議上曾受到

表 2 用微量培養方法作生化試驗的結果

細菌名稱	糖 分 解 反 應								動力	H ₂ S 試驗	尿素酶 試驗	胺基質 試驗	凝集反應	備 注	
	乳糖	葡萄糖	麥芽糖	甘露醇	蔗糖	糖									
						乳	糖								
志賀氏痢疾桿菌	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
施密次氏痢疾桿菌	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
弗氏痢疾桿菌	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	作2次	
宋內氏痢疾桿菌	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
異型志賀氏菌	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	作4次	
傷寒桿菌“H”型	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	作2次	
傷寒桿菌“O”型	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	作4次	
副傷寒桿菌“甲”	-	⊕	⊕*	⊕	⊕	-	-	+	-	-	-	-	-	作4次	*其中有一次試驗產氣較晚
副傷寒桿菌“乙”	-	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-	+	+	-	-	-	-	作3次	
副傷寒桿菌“丙”	-	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-	+	+	-	+	+	-	作4次	
腸炎桿菌	-	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-	+	+	-	-	-	-	作3次	
鼠傷寒桿菌	-	⊕	⊕*	⊕	⊕	-	-	+	+	-	-	-	-	作4次	*其中有一次麥芽糖產氣較晚
大腸桿菌	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-	+	+	-	-	+	-	-	
產氣桿菌	⊕*	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	+	+	-	-	-	-	-	*其中乳糖產氣較晚

(注) + 產酸(糖類分解反應)
 ⊕ 產酸與氣
 + 產生或陽性反應
 - 不產生或陰性反應。

了蘇聯微生物學家克拉西爾尼科夫通訊院士的贊揚^[1]。現在我們討論一下細菌的微量培養方法。這種方法在研究的过程中，當 1955 年 6 月 7 日中捷科學技術合作捷克專家拉士卡教授和馬列克教授來院參觀之時，曾垂詢甚詳。他們認為，這種微量培養方法之研究，在細菌學中是“重要的和必需的”。

這種細菌微量培養方法是 Weaver 氏^[17-18]所創造的。其基本原理是取大劑量的處於對數生長期中的細菌，接種至比較小量的培養基中，放在 37°C 水箱中培養。在這種條件下，細菌生長之潛伏期極短，根據接種量之大小，能於數分鐘至數小時內產生足夠量的生物化學反應產物，因而產生正確的試驗結果。自 1948 至 1951 年，他和他的同事們發表了五、六篇有關微量培養法之論文^[3,4,7,9,10]。他們利用微量培養方法，作糖類分解試驗、胺基質試驗、Voges-Proskauer 氏試驗、硝酸鹽還原試驗、和枸橼酸鹽中生長試驗等。證明微量培養方法，適用於絕大多數的細菌學檢驗工作中可能用到的生物化學試驗。Weaver 氏等認為，利用微量培養方法，可縮短生物化學反應所需用之時間，為其最大的優點。

自 1951 年開始，MacCready 及 Holmes 二氏^[11]在他們的檢驗室內開始使用微量培養方法，來檢定腸道病原菌。在 1953 年所作的總結中，他們指出，利用微量培養方法可於次日作出細菌學診斷。這比目前世界各國所沿用的需要 3—4 天以上的時間才能完成檢定的大培養方法^[12]，要優越得多。對於醫療診斷工作和流行病學調查研究工作將作出很大的貢獻。此外，他們又指出，在大培養方法中常應用的雙糖或三糖培養基，容易發生錯誤。例如 Morris 等氏^[13]曾遇到一種傷寒桿菌，在雙糖培養基的上層和底層，均發生酸性反應，而於單一的糖管中則完全不能發酵乳糖。同樣地 MacCready 及 Holmes 氏在檢驗室內亦遇到一些細菌，在 Kligler 氏培養基上所發生之反應與傷寒桿菌有異，但以後經證明確為傷寒桿菌。由於微量培養方法中不採用雙糖或三糖培養基，因此即能完全避免發生這種錯誤。

我們認為微量培養方法最大之優點有二：第一個優點是迅速。它在很短的時間中可獲得生化反應之結果；可以使臨床標本的檢驗工作大為加速。因而在同樣長的時間內，用微量培養法可以檢查出更多的標本。這對於腸道傳染病的防治工作，是很有利的。在提早和超額完成工作計劃上，我們認為微量培養方法的這個優點，是非常有意義的。微量培養方法第二個優點是節省材料。假如在大培養中每個雙糖管或單一糖管發酵要使用 5—10 毫升的培養基，那末這和微量培養方法中所用 0.3 毫升比較起來，就可以看出應用微量培養方法，可以為國家節省不少財富。這方面的節省也許看來不大，但是考慮到全國現在增添和擴充了許多醫療和研究機構。每個機構每年要求檢驗多少標

本和每个标本要求作多种的試驗。在各种糖类和試剂中必有一些是比較貴重和难于購到的。这一个优点之重要性,就非常明显了。

但是, Weaver 氏和他的同工所創造和应用的微量培养方法,还不是完美無缺的。此法既具有如上所述之优越点,为何至今尚未被推广应用?这就值得我們考虑了。我們認为他們的方法的主要缺点是,方法还不够簡便易行。要推广微量培养方法,必須克服这个缺点。否則,不論它有多大的优点,亦难于在常規檢驗工作中推广应用。因此,我們的主要工作,就在怎样使微量培养方法較为簡化。在下面,我們預备把此項研究工作的过程作一簡短的介绍。

在最初,我們重复了 Hannan 及 Weaver 氏^[3]的試驗方法。为了节省篇幅,不預备將他們的方法詳加介绍。經過試驗以后,我們認为他們的方法,具有如下的几个缺点:

1. 他們采用的培养容器是 5×50 毫米大小,一般作环狀沉淀反应的小試管,这样就給分裝培养基塞上或除去棉花塞、接种細菌、洗滌試管等工作,增加不少困难。操作既已十分繁重,又相当地耗费時間。并且使用这种小試管,还需要在一般實驗室中特別設置一套小的試管架。同时,此法也不能使用普通的水箱。否則,小試管極易在水箱中被打翻,从而容易引起實驗室傳染。

(2) 他們采用了牛心浸液作为培养基的基础。由于其中含有一种可發酵的物質,他們先种入产气杆菌,培养 40 小时。然后再用大腸杆菌試驗其中是否已無任何可發酵的糖类存在。这种作法,不仅操作手續过于繁复,而且必然会在基础培养基中引进一些产气杆菌的代謝产物,这些物質說不定会对于病原菌之生長發生不利的作用的。

我們曾試驗过牛心浸液,發現其中确含有一种可發酵的物質。不宜作为生化試驗用的培养液基础。

(3) 他們在培养基中加入 0.1% 的 KH_2PO_4 。我們認为在这些檢查是否有發酵或 pH 变化之試驗中,最好不加入这种具有緩冲作用之物質。

(4) 他們使用 20% 的糖类儲存溶液。这样高的濃度往往超过了一般糖类的溶解度。不易過濾。他們加至培养基中糖的最后濃度是 5%, 似亦过高一些。我們改用 1—2% 的濃度,材料节省不少,但証明完全可行。

(5) 他們同时使用溴甲酚紫和甲酚紅二种指示剂。其优点是前者在 pH 5.2—6.8 間由紫变黄色,后一种則在 pH 7.2—8.8 間由黄变成紫紅色。由此可观察到相当寬广的 pH 变化范围。但是我們認为,这样反而增加了观察結果方面的困难。在常規工作中,最好还是只采用一种适当的表現变化最明显的指示剂。

(6) 他們為了觀察細菌能否產氣，在已裝入小試管中的液體培養基上，加上一層 3 毫米厚、溶于蒸餾水中的 1% 的琼脂。這種方法，給檢驗工作者又增加了一項手續。而且，在口徑 5 毫米大小的小試管中加入琼脂，而不能在液體面上遺留空氣或氣泡，既不容易，又費時間。且琼脂溶于蒸餾水中，因其中無緩沖劑，經短時間保存后，極易因空氣中存在的二氧化碳而致使 pH 發生變化。因而，他們在琼脂內亦加入指示劑。凡已變酸性的琼脂，就不再使用。事實上，琼脂在數日之內就會變酸。因此，亦難免不造成一些人力和材料上的浪費。

(7) 他們用液體培養基，故不能觀察細菌之動力。而細菌動力之觀察，在鑒別方面，有時却是非常有用而且必要的。

其次，我們也檢查了 MacCready 及 Holmes 氏所推薦的，採用微量培養檢驗腸道病原菌的方法。他們採用的是 10×75 毫米大小的試管，我們認為是一個優點。這樣可以簡化操作手續。節省分裝接種和洗滌所需用的時間，可以利用普通的試管架和水箱。亦即是針對 Weaver 氏方法的第一個缺點，作了重要的改進。

他們所介紹的方法內容非常簡單。他們只說明所用的是一種含酚紅的液體培養基，而其真正的成分不詳。由於他們所用的還是液體培養基，所以他們還需用懸滴的方法，來觀察細菌的動力。且需在葡萄糖管中加上一層琼脂以方便於觀察產氣的情況。

我們認為他們的作法還過於繁復。在方法方面還有一些可以改進的地方。我們針對如上方法的改進工作說來是非常簡單的。我們只是把培養基從液體改成為半固體。這個改變雖極簡單，但是我們認為他能起一定的作用。它把操作手續大大的簡化了。甚至比大培養還要簡單一些。如此不僅可以正確地觀察細菌能否發酵某種糖類。而且不需要用一般大培養方法中用作單一糖管中之倒管，就能觀察到氣體的產生。同時根據細菌在糖管中之生長情況，還能正確地辨別細菌有無運動能力。這種微小的技術改進，對於微量培養方法之推廣，是會起一定作用的。

除了方法方面，我們認為他們的檢驗程序，也需要考慮修正的必要和可能。

(1) 我們認為將分離到的細菌，先接種至乳糖酚紅半固體培養基中，而不用他們採用的乳糖蔗糖酚紅液體培養基，比較好些（表 1）。這樣可以使可能發酵蔗糖的痢疾桿菌（弗氏痢疾桿菌）、異型志賀氏菌（*Bact. dispar*）和腸結腸炎桿菌（*Bact. enterocoliticum*）等不致可能被遺漏。

(2) 我們發現應用半固體培養基中生長的細菌，做玻片凝集反應，是完全可以的。但是我們建議在作凝集反應以前，取出一些蛋白胨水培養物，和單價診斷血清作凝集反應。而不採用他們倡議的一開始就用多價血清和乳糖蔗糖酚紅液體培養基（已被我

們改為乳糖酚紅半固体培养基)中生长的細菌來作凝集反应。我們这样作,可以根据生化試驗的結果先作出初步的診斷,然后選擇所需用的單价血清。这种方法和国内沿用的常規方法是接近一致的。

(3) 我們根据郑翼宗教授的建議,在檢定腸系病原菌的过程中將尿素酶試驗提早。这样可以幫助及早地檢出可能遇到的变形杆菌。

(4) 我們在檢驗腸系杆菌中,还增加了一管醋酸鉛培养基。这是因为我們發現他們所用的在管口插入醋酸鉛試紙片的方法,虽然是正确的,但有时結果表現得不够显著。我們在作尿素酶試驗和 H_2S 試驗时,就利用接种乳糖酚紅半固体培养基以后所剩余的細菌。(但所有的細菌,应尽可能地都接种到乳糖管中去。)發現于 3 小时后,多能出現結果。最迟于 7 小时后當我們作第二次观察时,均能出現显明的反应。

已經經過我們修改过的 MacCready 及 Holmes 二氏的檢驗程序,見表 1。根據我們用标准菌种所作的檢查,尚未發現大的問題。我們还打算和若干与我們有联系的微生物学檢驗室合作,用实际的临床标本予以考驗以后,可能还需要做一些修改的工作。希望对此問題有兴趣的同志,也对該程序与我們协同檢查,并提出意見。若因此能对全国範圍內的細菌学檢驗工作有所改进,這項工作將是很有意义的。

下列几点,我們仅提出与同志們討論:

(1) 用微量培养方法作生化試驗,不要求特殊严格的無菌技术。事实上即使將試管口的棉花塞除去,亦可不致影响反应之結果。这是由于少数的污染菌即使在最多繁殖 5—6 代的短時間內,所产生的代謝产物不多,对反应的結果影响不大,而結果的正确性,还是可以獲得保證的。这一点,在节省人力和時間方面,可能是一便利。

(2) 在微量培养方法中采用的是 $37^{\circ}C$ 的水箱,这是因为水的比热比空气大,可于数分鐘內使培养基从室温提高到 $37^{\circ}C$ 。假如使用的工具是 $37^{\circ}C$ 的暖箱,則于接种以前必須先將培养基放入温箱內預先加温,方能同样地縮短获得反应結果所需的時間。

(3) 接种細菌劑量之大小,和反应結果的出現時間,有極大的关系。假如將一个針尖大小的菌落种入微量培养试管中,需 $4\frac{1}{2}$ —5 小时方能保證反应之出現。但假如菌落之直徑大于 1.2 毫米,則可于 2 小时內,保證全部反应均能出現。在远藤氏和中国藍等培养基上,病原菌的菌落是很小的。这对于微量培养法的应用頗不适宜。但由于腸系病原菌在含有胆鹽之培养基上生长的菌落相当大(直徑往往超过 1.2 毫米)。据悉郑翼宗教授現已實驗成功一种制备方法非常簡單,而性能却超过 S. S. 琼脂之胆鹽培养基(尙待發表),由此可見,我們可以完全解决微量培养法中用来培养的原始菌落过小的問題。

(4) 在我們實驗進行的過程中，我們看到了 Snyder 氏^[1]關於利用紙片來保存鑒別性培養基的主要成分的報告。這種方法的優點是保存時間長，使用方便，節省儲藏空間，和便於運輸。此法亦適用於作多種生化反應，且能用來保存微量培養法所用之培養基。由於我們不易購到厚 1 毫米的濾紙，我們曾經使用過其他厚紙、棉花塊和紗布塊等。我們認為這種方法來保存培養基是有前途的。但如欲推廣此法的採用，則須由大規模生產的機構來製造此種特殊紙片。如由各化驗室自己製造此種紙片，則可能造成人力和時間、材料上的浪費。

我們認為採用微量培養方法，在實踐中可能還會遇到下述需要解決的一些問題。

(1) 假如在某一檢驗室內在某一階段中每天需要檢驗 500 個標本，那末原來可以平均分配在一天內完成的工作，例如接種單一糖管，現在就需要在上午 11 時前後比較短的時間內完成之，在標本檢驗較多的情況下，是否會發生困難。是否需要更換上下班的时间，或增添工作人員。那只有通過實踐才能知道了。

(2) 有些發酵作用出現比較晚的細菌，例如宋內氏痢疾桿菌之發酵乳糖是否也能在當天出現陽性結果的問題。根據我們所用少數菌種的試驗，證明在短時間內獲得結果是可能的。

(3) 是否可以在上午 8 時再增加一管葡萄糖耐紅半固體培養基的問題。我們認為這樣可以先觀察一下細菌發酵時能否產生氣體。如此在上午 11 時即可得出初步的診斷。即相當於使用雙糖培養基所能獲得的某些實驗資料，此時已能全部獲得。但是，一個菌落分種 4 管培養基（乳糖、尿素、醋酸鉛和葡萄糖培養基），是否能保證夠用，而不影響反應出現之時間。尚待考慮和試驗。

結 論

我們認為細菌的微量培養方法，具有迅速、正確、節省等優點。適用於作各種微生物的生物化學試驗。它們對於腸道傳染病之防治和調查研究工作，將會起巨大的作用。在方法上經過我們的改進以後，方法已大為簡化，已使這一類的檢驗工作，有可能真正的作到又多、又好、又快、又省。在經過實際考驗以後，它們很可能會替代現在經常使用的大培養方法。

参 考 文 献

- [1] 新华社: 抗生素学术会讨论科学家的论文和报告。人民日报, 1955年 12月 6日, 第一版。
- [2] 中国协和医学院细菌科: 细菌学实验大纲。北京健康书店。1951年, 第35页。
- [3] Arnold, W. M. and Weaver, R. H.: *J. Lab. Clin. Med.* **33**: 1334, 1948.
- [4] Bachmann, B. and Weaver, R. H.: *Am. J. Clin. Path.* **21**: 195, 1951.
- [5] Cheng, I. T. (郑冀宗) and Cheng, S. I.: *Taiwan Med. Journ.*
- [6] Cherry, W. B. et al.: *J. Lab. Clin. Med.* **44**: 51, 1954.
- [7] Fabrizio, A. and Weaver, R. H.: *Am. J. Clin. Path.* **21**: 192, 1951.
- [8] Fulton, M.: *Am. J. Clin. Path.*, **25**: 1229, Oct. 1955.
- [9] Hannan, J. and Weaver, R. H.: *J. Lab. Clin. Med.* **33**: 1338, 1948.
- [10] Hargrove, R. F. and Weaver, R. H.: *Am. J. Clin. Path.* **21**: 286, 1951.
- [11] MacCready, R. A. and Holmes, M. B.: *Am. J. Public Health.* **43**: 285, 1953.
- [12] Mackie, T. J. and McCartney, J. E.: *Handbook of Practical Bacteriology*, 9th ed. 1953. p. 166.
- [13] Morris, J. E. et al.: *J. Infect Dis.* **68**: 117, 1951.
- [14] Snyder, M. L.: *J. Path. Bact.*, **67**: 217, 1954.
- [15] Wadsworth, A. B.: *Standard Methods of the Division of Laboratories & Research of the New York State Department of Health*. 3rd ed. 1947. pp. 300-301.
- [16] Wassermann, M. M. & Saphra, I.: *J. Bact.* **69**: 97, Jan. 1955.
- [17] Weaver, R. H. et al.: *J. Bact.* **51**: 565, 1946.
- [18] Weaver, R. H.: *Am. J. Public Health.* **37**: 1201, 1947.
- [19] Weil, A. J. and Saphra, I.: *Salmonellae & Shigellae: Laboratory. Diagnosis Correlated with Clinical Manifestations and Epidemiology*. 1953. p. 92.

MICRO-CULTURE OF BACTERIA

HSU CHAO-HSIN, MA HSU-TSING, CHOU CHUAN-YI, AND LI SHI-GAN

Department of Bacteriology, Peking Medical College

1. In this report, a micro-culture for the determination of biochemical reaction of intestinal pathogens has been described. It is based upon the principle of rapid growth of large inoculum in a small amounts of culture media and incubated in water bath to obtain short lag periods.

2. In this report, the brief history of micro-culture for intestinal pathogens, details of cultivation, its advantages and disadvantages, as well as certain modifications made by the authors to improve such technique were briefly described and discussed.