

各類型痢疾桿菌的營養需要

梁業楷 王華敦 方 綱

(中國醫科學學院)

痢疾桿菌的營養需要曾經過一些學者們的研究。Koser、Dorfman 與 Saunders 等氏^[1-5]發現多數痢疾桿菌需要尼克酸才能生長；尼克酸的某些衍生物如尼克醯胺、輔酶 I、輔酶 II 等也有促進生長的作用；而尼克醯胺的活動性較尼克酸、輔酶 I、輔酶 II 為強。Mizuno 與 Kosaka 二氏^[6]發現志賀氏痢疾桿菌 *Hanabusa* 株不需尼克酸亦能生長，唯較為遲緩。彼等以為尼克酸僅起輔助生長因素的作用。Bovarnick 氏^[7-10]發現天門冬醯胺與谷氨酸在中性溶液內加熱數天後的產物對痢疾桿菌的生長能代替尼克醯胺的作用，後經化學分析證實了這產物就是尼克醯胺。

Weil 與 Black 二氏^[11]發現汎酸對福氏痢疾桿菌中的某些菌株有輔助生長的作用。Hunter 氏^[12]更發現 1 株需尿嘧啶始能生長的福氏痢疾桿菌。Koser 等三氏^[3]發現維生素乙₁、乙₂、丙、β-丙氨酸及肌醇與痢疾桿菌的生長無關。

Koser 與 Rettger 二氏^[13]曾以各種氨基酸及其他化合物作為氮源研究志賀氏痢疾桿菌的生長。他們發現甘氨酸、賴氨酸、苯丙氨酸與組氨酸、尿酸及次黃嘌呤等都不能使之生長。他們又曾將甘氨酸、纈氨酸、天門冬氨酸、谷氨酸、酪氨酸、賴氨酸、色氨酸、氨基乙磺酸、肌酸等等任二種化合物加入基礎培養基中，亦不能使痢疾桿菌生長，因此認為志賀氏痢疾桿菌並不能以上列各化合物作為氮源。Mizuno 與 Kosaka 等氏^[6,14,15]曾研究志賀氏痢疾桿菌 *Hanabusa* 株的營養需要，發現僅需谷氨酸即可生長。Аристовская 與 Стахорская 二氏^[16]發現福氏與宋內氏痢疾桿菌在含有天門冬醯胺或甘氨酸或谷氨酸的培養基中生長最好，在含精氨酸與胱氨酸的培養基中，則這二種氨基酸很少為細菌所攝取，酪氨酸更不能進入菌體內。Johnson 與 Mays 二氏^[17]曾報告過 1 株志賀氏痢疾桿菌需脯氨酸始能生長。

由以上文獻材料可見有關痢疾桿菌的營養需要，目前的認識還很不一致。這一方面可能是由於各研究者所用的菌株的種或型的不同，也可能是由於他們所用的研究方法不同。鑒於痢疾桿菌營養需要的研究對於了解這些細菌的分類學關係、變異規律、分離和保存培養基的設計以及菌苗製備等實用問題均有重大意義，因此我們研究了一些近年來在北京分離的屬於各類型的痢疾桿菌菌株對於生長因素、碳、氮源的營養需要。

試驗材料與方法

菌株：試驗所用痢疾桿菌菌株都是 1954—1955 年間在北京分離的。菌種都用冰凍乾燥保存，每次試驗開啓 1 管，經過血清學鑑定後再使用。

1957 年 10 月 28 日收到。

培養基：所用之各種藥物都是化學純品。

1. 基礎液：鹽類混合液之成分仿 Johnson 氏^[18]，並稍有修改。它含有 KH_2PO_4 0.5 克、 Na_2HPO_4 4.0 克、 Na_2SO_4 0.8 克、 NaNO_3 1.0 克、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.5 克、蒸餾水（以玻璃蒸餾器 3 次蒸餾）1 公升。

2. 氨基酸的使用量仿 Koser 等氏^[3]。其濃度為：l(+) 谷氨酸 0.5 克/公升，l(+) α -丙氨酸 0.5 克/公升，甘氨酸 0.2 克/公升，l(+) 鹽酸賴氨酸 0.2 克/公升，l(-) 色氨酸 0.2 克/公升，l(-) 鹽酸組氨酸 0.2 克/公升，dl 纈氨酸 0.1 克/公升，l(-) 亮氨酸 0.1 克/公升，dl 苯丙氨酸 0.1 克/公升，l(-) 胱氨酸 0.1 克/公升，l(-) 脯氨酸 0.1 克/公升，l(-) 羧脯氨酸 0.1 克/公升，dl 蛋氨酸 0.1 克/公升，l(+) 鹽酸精氨酸 0.1 克/公升，l(-) 酪氨酸 0.05 克/公升。

3. 生長因素的使用量為：尼克醯胺 0.3 毫克/公升、汎酸鈣 1.0 毫克/公升、尿嘧啶 20.0 毫克/公升。

4. 葡萄糖的使用量為：2.0 克/公升。

所有培養基成分除葡萄糖單獨滅菌後加入外，其餘各成分一併加入，以 8 磅 15—20 分鐘高壓滅菌，滅菌後 pH 為 6.8—7.2，分裝每管 2 毫升，分裝後孵育 1 天，證明無污染後始用作試驗。

接種物的準備：每次試驗均用由乾燥保存的菌種重新分離的培養物。在肉湯瓊脂斜面上培養所得的菌體用基礎液洗滌 3 次後，再用基礎液製成懸液。用硫酸鋇比濁管估計菌液濃度後，稀釋成為每毫升約含有 3,000—4,500 個菌，以 0.1 毫升接種於 2 毫升的待試的培養基中。每種培養基同時接種 2 管。每一菌株每次試驗均同時接種肉湯 1 管作為陽性對照。

接種的各管置於 37°C 溫箱內孵育，每隔一定時數肉眼觀察有無生長，共觀察 48 小時。

試 驗 結 果

甲、生長因素的需要：試驗了福氏痢疾桿菌 1b 型 1 株，2a 型 2 株，3 型 1 株，4a 型 3 株，5 型 1 株，6 型 1 株；宋內氏痢疾桿菌 3 株；志賀氏痢疾桿菌 1 株和史密氏痢疾桿菌 1 株。在不同氮源的含葡萄糖基礎培養基中對於尼克醯胺、汎酸鈣和尿嘧啶的需要，試驗結果見表 1。由此可知：

(1) 在含葡萄糖和谷氨酸的培養基中，福氏痢疾桿菌 1b、2a、3、5、6 型的生長需要尼克醯胺。福氏痢疾桿菌 3 型在有尼克醯胺的培養基中的生長情形是不規律的，有幾次試驗在 22 小時獲得生長，有幾次在 72 小時後尚未見生長。如果在培養基中同時加入尼克醯胺和汎酸鈣即可使之規律地在 22 小時內生長。3 株福氏痢疾桿菌 4a 型在含尼克醯胺、汎酸鈣、尿嘧啶、葡萄糖及 Koser 氏 15 種氨基酸混合物的培養基中不能生長。

(2) 宋內氏痢疾桿菌的生長並不需要有機氮源、汎酸鈣和尿嘧啶，但需要尼克醯胺。

(3) 志賀氏痢疾桿菌的生長不需要尼克醯胺、汎酸鈣和尿嘧啶；但尼克醯胺有促進生長的作用，尿嘧啶和汎酸鈣共同存在時也有促進生長的作用。

(4) 史密氏痢疾桿菌的生長需要尼克醯胺，但不需要汎酸鈣和尿嘧啶。

表 1 尼克醯胺、汎酸鈣、尿嘧啶與痢疾桿菌生長的關係

培 養 基 成 分				福 氏 痢 疾 桿 菌						宋內氏	志賀氏	史密氏
鹽類、碳源及氮源	尼克醯胺 (mg/l)	汎酸鈣 (mg/l)	尿嘧啶 (mg/l)	1b 型 (1株)	2a 型 (2株)	3 型 (1株)	4a 型 (3株)	5 型 (1株)	6 型 (1株)	痢疾桿 菌(3株)	痢疾桿 菌(1株)	痢疾桿 菌(1株)
基 礎 液 + 葡 萄 糖	—	1.0	20.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	0.3	—	—	—	—	—	—	—	—	22	—	—
	0.3	1.0	—	—	—	—	—	—	—	22	—	—
	0.3	—	20.0	—	—	—	—	—	—	22	—	—
	0.3	1.0	20.0	—	—	—	—	—	—	22	—	—
基 礎 液 + 葡 萄 糖 + 谷 氨 酸	—	1.0	20.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	0.3	—	—	22	22	22/-	—	22	22	10	—	—
	0.3	—	20.0	22	22	22/-	—	22	22	10	—	—
	0.3	1.0	—	22	22	22	—	22	22	10	—	—
	0.3	1.0	20.0	22	22	22	—	22	22	10	—	—
基 礎 液 + 葡 萄 糖 + Koser 氏 15 種 氨基酸混合物	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	28	—
	—	—	20.0	—	—	—	—	—	—	—	28	—
	—	1.0	—	—	—	—	—	—	—	—	28	—
	—	1.0	20.0	—	—	—	—	—	—	—	22	—
	0.3	—	—	22	22	22	—	22	22	10	22	22
肉 湯 對 照	—	—	—	8	8	8	8	8	8	8	8	8

說明：1. “—”表示孵育 48 小時後未見生長；

2. 數字表示肉眼可見混濁生長的時數；

3. 數字/-結果不定，有時 22 小時後即可見有生長，有時 72 小時後尚未見生長。

乙、各種氮源的需要：根據以上試驗結果，採用加上葡萄糖、尼克醯胺、汎酸鈣和尿嘧啶的鹽類混合液為基礎培養基，以各種氨基酸單獨加入或以 15 種氨基酸混合加入，試驗其支持痢疾桿菌生長的能力，試驗結果見表 2。由此可知：

(1) 所試驗的 3 株宋內氏痢疾桿菌都可以用無機氮化合物為氮源。在各種氨基酸中，谷氨酸有明顯的刺激生長的作用，能使宋內氏痢疾桿菌的生長在 10 小時內達到肉眼可見的程度。至於其他氨基酸在使用 0.5 克/公升的濃度時也都需要 22 小時才能看到生長，與沒有加入氨基酸的培養基所需的孵育時間相同。

(2) 所試驗的 1 株志賀氏痢疾桿菌和 1 株史密氏痢疾桿菌都能在含 Koser 氏 15 種氨基酸混合物的培養基中生長，而在僅含有單寧氨基酸的培養基中不能生長(史密氏痢疾桿菌有時可利用色氨酸)。

(3) 所試驗的福氏痢疾桿菌各型菌株利用單寧氨基酸的情形差別較大。2 株 2a 型和 1 株 6 型的菌株能利用較多種的氨基酸。3 株 4a 型的菌株在只含有一種氨基酸的培養基中都無生長，在含有 Koser 氏 15 種氨基酸混合物的培養基中也不能生長，但如培養基中的 15 種氨基酸每種濃度均提高為 0.5 克/公升時便能生長。至於其他如 1b、3 和 5 型菌株所能利用的單個氨基酸的種類也較少。

就各個氨基酸的被利用的情況來看，谷氨酸能被多數福氏痢疾桿菌所利用(1b、2a、

表 2 氨基酸與痢疾桿菌生長的關係

[illegible]

說明：1. 氨基酸濃度欄中，上項爲仿 Koser 氏混合液之濃度；

2. 空白者為沒有做該濃度的試驗。

3、5、6各型),其次爲精氨酸、亮氨酸,再次爲色氨酸、胱氨酸與賴氨酸,至於其他氨基酸則能被利用的更少。

不同濃度的氨基酸對菌株的生長也有關係:有些菌株本來在低濃度時是不能生長的,如果將濃度提高便可使之生長或加速生長,如胱氨酸對福氏 1b、2a、3 型菌等是。相反地,

賴氨酸在高濃度時對於福氏 2a 型菌的生長反而有抑制作用。

丙、碳源的需要：於基礎液內加入尼克醯胺、汎酸鈣、尿嘧啶或谷氨酸，但無葡萄糖時，各類型痢疾桿菌菌株均無生長；如於此培養基中再加入 Koser 氏 15 種氨基酸混合物時，僅有宋內氏和史密氏痢疾桿菌生長，而以前者比後者生長較快。至於福氏及志賀氏菌則需有葡萄糖存在時才能生長。試驗結果見表 3。

表 3 葡萄糖與痢疾桿菌生長的關係

培 養 基 成 分					福 氏 痢 疾 桿 菌						宋內氏	志賀氏	史密氏
鹽類及氮源	尼克醯胺 (mg/l)	汎酸鈣 (mg/l)	尿嘧啶 (mg/l)	葡萄糖 (gr/l)	1b 型 (1株)	2a 型 (2株)	3 型 (1株)	4a 型 (3株)	5 型 (1株)	6 型 (1株)	痢疾桿 菌(3株)	痢疾桿 菌(1株)	痢疾桿 菌(1株)
基 礎 液	0.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	0.3	1.0	20.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
基 礎 液 + 谷 氨 酸	0.3	1.0	20.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
基 礎 液 +	0.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	22	—	48
	0.3	1.0	—	—	—	—	—	—	—	—	22	—	48
Koser 氏 15 種氨基酸混 合物	0.3	—	20.0	—	—	—	—	—	—	—	22	—	48
	0.3	1.0	20.0	—	—	—	—	—	—	—	22	—	48
	0.3	—	—	2.0	22	22	22	—	22	22	10	22	22
肉湯對照	—	—	—	—	8	8	8	8	8	8	8	8	8

討 論

尼克醯胺是細菌最普通的生長因素之一，換言之，細菌合成此化合物的能力最易消失。尼克醯胺可供合成輔酶 I 及輔酶 II 之用，而後二者均係某些脫氫酶系統的輔酶，在菌細胞呼吸過程中，担任遞氫體的任務。根據我們上述的試驗結果，可以認為尼克醯胺對多數痢疾桿菌菌株是必須的，僅有志賀氏菌在培養基中含無機鹽，葡萄糖和多種氨基酸時，才可以不需尼克醯胺而能緩慢生長，這與 Mizuno 氏的結果相符。志賀氏菌可能具有一種酶系統以使數種氨基酸相互作用後產生一種尼克醯胺的替代物或甚至就是尼克醯胺。

至於汎酸鈣和尿嘧啶是否為痢疾桿菌所需要，根據本文試驗結果，可認為尿嘧啶對所試驗的 14 株痢疾桿菌菌株均無明顯的作用。而汎酸鈣對福氏第 3 型菌株則有促進生長的作用。這與 Weil 及 Black 二氏報告某些福氏痢疾桿菌菌株需要汎酸作為輔助生長因素稍有相同之處。

痢疾桿菌按其對生長因素與氮源的不同，可分成下列三類：(1)只需無機鹽和生長因素即能生長的有宋內氏菌；(2)兼需氨基酸和生長因素才能生長的有福氏 1、2、3、4、5、6 型與史密氏菌；(3)只需氨基氮便能生長的有志賀氏菌。這可認為是前二者的中間類別。Isbell 氏^[10]曾指出宋內氏菌不需有機氮即可生長，與本文試驗結果相符。

至於福氏 4a 型菌的營養需要較為複雜，有待進一步深入的研究。

在異營菌中，機體能的來源主要從葡萄糖取得。Gale 氏^[25]曾指出谷氨酸進入某些

格蘭氏陽性細菌(如鏈球菌)時,需葡萄糖供給能量。但氨基酸亦可供作碳源及能源, Kligler 與 Grosowitch 氏等^[20-23]曾報告在無葡萄糖的培養基中不加入尼克醯胺,痢疾桿菌亦可生長。Stephenson 氏^[24]亦指出某些格蘭氏陰性細菌(如大腸桿菌、產氣桿菌等)能生長於無機鹽、谷氨酸及其他氨基酸的混合物中,而不需要葡萄糖。根據我們上述試驗結果,亦證明在有尼克醯胺和多種氨基酸的培養基中,宋內氏及史密氏痢疾桿菌可無需葡萄糖便能生長。

在各種氨基酸中,谷氨酸為多數痢疾桿菌所利用。細菌需谷氨酸才能生長,可認為這些菌株沒有合成谷氨酸的酶系統,而谷氨酸在代謝過程中佔重要地位。由於氨基移轉作用可變為其他氨基酸及 α -酮戊二酸,後者參加三羧酸循環。這變化可見於許多細菌如大腸桿菌、痢疾桿菌中。Irlandson 氏^[26]亦曾報告痢疾桿菌對各種氨基酸的氧化分解時,谷氨酸的呼吸率甚強。凡此亦都說明谷氨酸可供作某些痢疾桿菌的碳及氮源之用。

結 論

研究 14 株各類型痢疾桿菌與生長因素、氮、碳來源等營養需要與生長的關係後,得到下面的幾點結論:

一、尼克醯胺是大多數痢疾桿菌生長時所必需的生長因素。

二、宋內氏痢疾桿菌只需在含有無機鹽、尼克醯胺、葡萄糖的綜合培養基中即能生長,並不需要有機氮源。

三、福氏 1b、2a、3、5、6 型痢疾桿菌需在含有無機鹽、尼克醯胺、葡萄糖及谷氨酸的綜合培養基中便能生長。但其中福氏 3 型菌以有氫酸鈣存在時生長最好。

四、志賀氏、史密氏痢疾桿菌需在含有無機鹽、尼克醯胺、葡萄糖及多種氨基酸的綜合培養基中始能生長。

五、福氏 4a 型痢疾桿菌需在含有無機鹽、尼克醯胺、葡萄糖及多種氨基酸,且每種氨基酸的濃度較高時的綜合培養基中才能生長。

六、谷氨酸在所試驗的 15 種氨基酸中最易為痢疾桿菌所利用,即多數菌株需谷氨酸才可生長。

七、不同濃度的不同氨基酸能影響菌株的生長。

註:本文蒙中國協和醫學院張寬厚教授指正,特此致謝。

參 考 文 獻

- [1] Koser, S. A., Dorfman, A. & Saunders, F.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **38**:311, 1938.
- [2] Koser, S. A. & Dorfman, A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **60**:2004, 1938.
- [3] Dorfman, A., Koser, S. A., Reames, H. R., Swingle, K. L. & Saunders, F.: *J. Inf. Dis.*, **65**:163, 1939.
- [4] Dorfman, A., Koser, S. A., Horwitt, M. K., Berkman, S. & Saunders, F.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **43**:434, 1940.
- [5] Koser, S. A., Dorfman, A. & Saunders, F.: *J. Biol. Chem.*, **138**:69, 1941.
- [6] Mizuno, D. & Kosaka, S.: *Jap. Med. J.*, **3**:99, 1950.
- [7] Bovarnick, M. R.: *J. Biol. Chem.*, **148**:151, 1943.
- [8] Bovarnick, M. R.: *J. Biol. Chem.*, **149**:301, 1943.
- [9] Bovarnick, M. R.: *J. Biol. Chem.*, **151**:467, 1943.

- [10] Bovarnick, M. R.: *J. Biol. Chem.*, **153**:1, 1944.
- [11] Weil, A. J. & Black, J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **55**:24, 1944.
- [12] Hunter, S. H.: *Arch. Biochem.*, **4**:119, 1944.
- [13] Koser, S. A. & Rettger, L. F.: *J. Inf. Dis.*, **24**:301, 1919.
- [14] Mizuno, D. & Kosaka, S.: *Jap. Med. J.*, **3**:107, 1950.
- [15] Mizuno, D. & Irige, S.: *Jap. Med. J.*, **4**:279, 1951.
- [16] Аристовская, Т. В. и Страхорская, Л. К.: *ЖМЭИ* (11): 43, 1953.
- [17] Johnson, R. B. & Mays, C. G.: *J. Bact.*, **67**:542, 1954.
- [18] Johnson, R. B.: *J. Bact.*, **68**:604, 1954.
- [19] Isbell, H., Wooley, J. G., Butler, R. E. & Sebrell, W. H.: *J. Biol. Chem.*, **139**:499, 1941.
- [20] Kligler, I. J. & Grosowitch, N.: *Nature*, **142**:76, 1938.
- [21] Kligler, I. J. & Grosowitch, N.: *J. Bact.*, **38**:309, 1939.
- [22] Kligler, I. J. & Grosowitch, N.: *J. Bact.*, **42**:173, 1941.
- [23] Kligler, I. J. & Grosowitch, N.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **52**:332, 1943.
- [24] Stephenson, M.: *Bacterial Metabolism* p. 189, 1950.
- [25] Gale, E. F.: *Advances Protein Chem.*, **8**:285, 1953.
- [26] Erlandson, A. L. & Ruhl, R. E.: *J. Bact.*, **72**:708, 1956.

THE NUTRITIONAL REQUIREMENTS OF VARIOUS TYPES OF SHIGELLA

LIANG YEH-KAI, WANG HUA-TUN & FANG KANG

(Chinese Academy of Medical Sciences, Peking, China)

The nutritional requirements of growth factors, nitrogen, and of carbon of 14 strains of various types of *Shigella* have been investigated, and the following conclusions were obtained. 1) Nicotinamide is the essential growth factor for most strains of *Shigella*. 2) *Sh. sonnei* can grow on synthetic media containing only inorganic salts, nicotinamide and glucose, while organic nitrogenous source is not required. 3) *Sh. flexneri* 1b, 2a, 3, 5 and 6 can grow on media containing inorganic salts, nicotinamide, glucose and glutamic acid. However, in the presence of calcium pantothenate, *Sh. flexneri* type 3 grows much better. 4) *Sh. dysenteriae* 1 (*Sh. shigae*) and *Sh. dysenteriae* 2 (*Sh. schmidtzi*) can grow on synthetic media involving inorganic salts, nicotinamide, glucose and several amino acids. 5) The nutritional requirements of *Sh. flexneri* type 4a are the same as those of *Sh. dysenteriae* 1 and *Sh. dysenteriae* 2, but a higher concentration of amino acids is required to support its growth. 6) Among the 15 amino acids studied, glutamic acid is most easily utilized by *Shigella*, i. e., most strains require glutamic acid for growth. 7) Various concentrations of different amino acids may influence the growth of *Shigella*.