

布氏桿菌屬生物學特性的研究

I. 新分型法的研究報告

季麟征 李在連

(山東醫學院微生物學教研組)

緒 言

布氏桿菌的鑑定與分型,一般以凝集及凝集吸收試驗,染料抑制試驗,以及 CO_2 的需要, H_2S 的產生,生長速度等為依據。但由於各型間生物學特性之近似,實驗方法上的缺點及實驗結果的不規則,分型工作尚存在着許多困難,故有必要作進一步深入的研究。

根據近來國外文獻報告^[1,2],布氏桿菌在一定的條件下,可分解某些炭水化合物,可能利用其作為分型之依據。筆者曾以新設計的發酵培養基為基礎,試用幾種醣類,經多次研究與改進,結果認為選用葡萄糖、麥芽糖、甘露醇、鼠李糖、蔗糖、即可將布氏菌屬各菌正確的分為三型;並將舊有的染料抑制試驗,改為簡易的紙片法。此外,證實了脲素水解試驗,亦可作為輔助分型的參考。現將實驗方法及結果分別報告如下,並扼要的討論其反應機制。

材料與方法

I. 材料:

1. 菌種來源:本試驗採用了三套牛、羊、豕三型標準菌種。菌種來源為中央生物製品檢定所保存之蘇聯標準菌種;濟南獸醫院及本教研組保存者。此外,尚收集了布氏桿菌菌種 18 株進行試驗,其中 5 株為本院附屬醫院所分離;6 株來自山東省立醫院;濟南軍區 90 醫院分離者 1 株;山東傳染病二分院分離者 1 株及本醫學院在山東某農場調查時新分離者 5 株。以上新分離的菌種事先均由各該單位證明為布氏桿菌,並經本教研組作過詳細鑑定無誤。在試驗前將全部菌株重新分離,挑選光滑型菌落接種於增殖培養基(製備法詳後)上,孵育 48 小時後備用。

2. 培養基的設計與製備:以下各種培养基除脲素培养基外,都是我們自己設計的,經過多次試驗與改良證明較一般舊有培养基的效果更為良好。茲將培养基的成份,製備程序等介紹如下:

(1) 布氏菌屬增殖性斜面培养基

成份: 肝浸湯瓊脂 pH 7.0, 瓊脂 2%,	100 毫升
葡萄糖	1 克

酵母膏	0.1 克
血紅素	0.01 克
pH 7.0—7.2	

製備方法：取已矯正 pH 為 7.0 的無菌肝浸湯瓊脂 100 毫升，溶化後按以上劑量以無菌手續加入葡萄糖等其他成份。搖勻後分裝無菌中試管中，每管約 5 毫升。用 8 磅蒸氣壓力 15 分鐘滅菌，斜置使凝成斜面備用。布氏菌屬在這種培養基上繁殖極為旺盛。

(2) 布氏菌屬醣發酵培養基

成份：蛋白胨	0.5 克
酵母膏	0.5 克
氯化鈉	5 克
二氫基磷酸鉀(K_2HPO_4)	0.3 克
瓊脂	3 克
結晶紫(0.01%)	0.1 毫升
溴麝香草酚藍(1%)	3 毫升
水	1000 毫升
下述各種醣類中之一種	1.5%

pH 7.1

製備方法：於 2000 毫升三角燒瓶中按以上劑量加入蛋白胨、酵母膏、氯化鈉、 K_2HPO_4 、瓊脂及蒸餾水。溶化後，矯正 pH，然後加結晶紫及溴麝香草酚藍溶液；混勻，濾紙過濾，分裝於無菌 250 毫升之三角瓶中，每瓶 100 毫升，並分別加入葡萄糖、麥芽糖、甘露醇、鼠李糖及蔗糖(或菌藻糖)等 5 種糖。待糖溶化後，分別分裝於無菌華氏血清試驗管中(管口棉塞用紗布包裹)，每管約 2.5 毫升。分裝完畢，置 $100^\circ C$ 蒸氣滅菌器中滅菌 15 分鐘，保存於冰箱中備用。這種培養基為淺綠色半固體，細菌分解醣類後呈黃色，對醣類無作用者培養基呈藍色(因細菌分解蛋白質產生鹼性反應)。

(3) 染料抑制試驗瓊脂平板：即於肝浸湯瓊脂 100 毫升中另加葡萄糖 0.5 克，血紅素 0.01 克。用 8 磅蒸氣 15 分鐘滅菌，澆注成平板，經 $37^\circ C$ 孵育一夜後，選擇表面乾燥無雜菌及皿蓋無水蒸氣者備用。

3. 染料抑制試驗濾紙片的製備：

(1) 染料配製法：本試驗選用了硫堇(Thionin)、鹼性復紅(Basic fuchsin)及派洛寧(Pyronin)、結晶紫(Crystal violet)、甲基紫(Methyl violet)等 5 種染料。經多次試驗，我們認為後兩種染料結果不恆定，故刪去，保留前三種。配製 1:400 的硫堇水溶液；1:200 鹼性復紅酒精(50%)液，及 1:500 的派洛寧水溶液。以上染料均須保存於棕色瓶中，緊塞瓶口，靜置 3—5 天，臨用前將染料溶液置於 $80^\circ C$ 水浴箱中加熱助其溶解。

(2) 濾紙片：採用一般較厚的濾紙，製成直徑 8 毫米的圓紙片。預先高壓滅菌，分別將紙片浸泡於各種染料溶液中，約每 10 毫升染料浸泡紙片 50 個，放置室溫 8—12 小時後傾棄染料，將已飽和吸收染料之紙片置無菌玻皿中(一片片的鋪開)，斜開皿蓋，置 $37^\circ C$ 溫箱中使之乾燥。這種帶有染料的紙片可以較長期的保存應用。

II. 試驗方法：

取在增殖性培養基上生長 48 小時的布氏菌，每個斜面分別加入無菌鹽水 1.5 毫升，洗下菌苔，用此濃厚的菌液進行下列試驗。（菌液濃度約 60 億/毫升）。

1. 醣發酵試驗：取半固體糖發酵培養基，順序排列於試管架上，置阿諾氏蒸氣滅菌器中熔化，在未凝固之前（即涼至 42—45°C 時）以無菌手續於每管中加入布氏菌菌液 0.1 毫升，混勻，待凝固後置 37°C 中有 10% CO₂ 環境孵育 48 小時。由於 CO₂ 的作用，發酵管顏色變為黃綠色，再移置 37°C 孵箱繼續培養 24—48 小時觀察結果。一般布氏菌經 96 小時的孵育，即可根據糖發酵反應，即分解醣類產酸者呈黃色，不分解醣類者呈藍色而定型。

2. 染料抑制試驗：每一菌株用表面乾燥的瓊脂平板一個，於平板中央加上述濃厚菌液 1 小滴（約 0.05 毫升）。再用曲玻棒或曲形取菌環將菌液塗佈於瓊脂表面，或用無菌棉拭子置菌液中蘸濕，塗抹於瓊脂表面。接種時務求細菌分佈均勻，為此，塗抹後再密集劃綫則結果更佳。即以無菌鑷子取染料濾紙片貼於瓊脂平板上，每一平板可置 3 個不同染料紙片，其間距離應適宜（見圖版 I, 6—8）。平皿蓋上最好墊一濾紙片以吸收多餘的水份，倒轉平皿，標明試驗號，置 37°C, 10% CO₂ 孵育 48 小時觀察結果。

3. 脲素試驗：於 Rustigian 及 Stuart 二氏的液體脲素培養基中接種上述菌液約 0.1 毫升。接種後在 25 分鐘及 3 小時各觀察結果一次，至 8—10 小時再觀察一次，便可得出分解脲素的結果。

試 驗 結 果

1. 醣發酵試驗結果：三型布氏菌對醣的分解作用各有一定的規律性。葡萄糖與甘露醇兩種醣起了對照的作用；對前者所有的布氏菌均能分解，後者則皆為陰性。而三型布氏菌對麥芽糖、鼠李糖及蔗糖的分解作用各不相同，可以作為分型的依據。我們所應用的 9 株（每型各 3 株）標準菌種，經多次重複試驗，每次均得到相同的結果（見表 1 及圖版 I, 1—3）。我們曾試驗了 18 株山東地區新分離布氏桿菌的糖發酵反應，結果均僅發酵葡萄糖。這些菌株如按前面標準布氏菌種的糖發酵規律加以判斷，則應認為都是羊型布氏桿菌。此點與各該菌種來源單位及我們以其他方法（染料抑制、凝集素吸收試驗、脲素水解試驗及 H₂S 等）鑑定的結果相符。

2. 染料抑制試驗：我們以各種不同濃度的三種染料進行試驗證明，適用於普通濾紙片的染料濃度為：硫堇 1:400，復紅 1:200，派洛寧 1:500。用標準菌種經多次試驗證實（表 1 及圖版 I, 6—8），紙片染料抑制試驗法較恆定，呈現結果顯明。對染料敏感的菌株可於紙片周圍出現 2—12 毫米的抑菌圈；不敏感菌株則無抑菌圈，或僅現 1 毫米以下的無菌帶。標準菌種對染料的反應規律見表 1，而目前（1956—1957）山東地區新分離的 18 株布氏菌則均為羊型，即所有菌株均不受硫堇等三種染料所抑制。此結果與糖發酵反應及其他試驗相符。

3. 脲素水解試驗結果：豕型布氏桿菌可在 15—25 分鐘出現陽性；羊型可在 1—3 小時出現陽性反應；而牛型則需 8—10 小時（表 1）18 株新分離的菌種均在 1—3 小時內出現陽性反應。試驗證明，布氏桿菌對脲素分解作用恆定，試驗方法又簡易迅速，一般化驗室可利用此試驗作初步分型。

表1 標準布氏菌的醣發酵、染料抑制試驗及脲素水解試驗結果

型別	菌種來源	編 號	醣 發 酵 試 驗					染料抑制試驗(抑菌毫米)			脲素水解試驗(時間)	結 論
			葡萄糖	甘露醇	麥芽糖	鼠李糖	蔗糖	硫 革 (1:400)	復 紅 (1:200)	派洛寧 (1:500)		
牛 型	北京	25(55001)	+	-	-	+	-	8	0	0	8—10小時	標準牛型
	山醫	9(59)	+	-	-	+	-	12	0	0	8—10小時	標準牛型
	獸院	22(82)	+	-	-	+	-	8	0	0	8—10小時	標準牛型
羊 型	北京	26(55002)	+	-	-	-	-	0	0	0	1—3小時	標準羊型
	山醫	10(60)	+	-	-	-	-	0	0	0	1—3小時	標準羊型
	獸院	22(38)	+	-	-	-	-	0	0	0	1—3小時	標準羊型
豕 型	北京	27(55003)	+	-	+	-	+	0.5	4	4	15—25分鐘	標準豕型
	山醫	11(61)	+	-	+	-	+	0.5	3	3	15—25分鐘	標準豕型
	獸院	24(111)	+	-	+	-	+	0	4	5	15—25分鐘	標準豕型

【註】 北京=北京中央生物製品檢定所
 山醫=山東醫學院微生物學教研組
 獸院=山東濟南獸醫院

+=發酵產酸,無氣
 ---不發酵

綜合以上醣發酵、染料抑制試驗、及脲素分解等試驗可得出如下的反應規律,歸納 28 株布氏菌的試驗結果,列舉於表 2。這些規律給我們提供了較為正確的分型結論。

表2 布氏菌屬新分型法綜合結果一覽表

型 別	說 明	項 目 試驗結果	醣 發 酵 試 驗					染料抑制試驗			脲 素 水 解
			葡萄糖	甘露醇	麥芽糖	鼠李糖	蔗 糖	硫 革	復 紅	派洛寧	
牛 型	反應規律		+	-	-	+	-	+	-	-	8—10小時
	陽性數/總數		3/3	0/3	0/3	3/3	0/3	3/3	0/3	0/3	3/3
羊 型	反應規律		+	-	-	-	-	-	-	-	1—3小時
	陽性數/總數		21/21	0/21	0/21	0/21	0/21	0/21	0/21	0/21	21/21
豕 型	反應規律		+	-	+	-	+	-	+	+	15—25分鐘
	陽性數/總數		3/3	0/3	3/3	0/3	3/3	0/3	3/3	3/3	3/3

討 論

醣發酵:一般教科書及文獻中指出,布氏菌屬對任何醣類皆無發酵作用,僅能利用微量的葡萄糖^[3-9],但與以上結果相反,Pickett (1955)^[1,2]指出,倘減少培養基中的氮源,增加醣的含量和大量接種細菌,在一定條件下,布氏菌屬可以發酵某些醣類。根據 Pickett 氏所提出的原則並參照 Hugh 氏^[10]糖發酵培養基的成份,我們設計了現用的半固體醣發酵培養基。選擇了葡萄糖等 5 種醣作為分型的醣發酵培養基。通過 28 株標準及新分離布氏菌多次重複試驗,各菌皆表現恆定的有規律的發酵反應,故我們認為醣發酵試驗能作為布氏菌屬正確分型的有用方法。

布氏菌屬之所以在一般培養基中不表現發酵作用，乃因該菌屬分解糖類時形成的微量酸類物質，被該菌利用氨基酸時脫氨作用產生的鹼性代謝產物所中和。一般細菌將氨基酸脫氨後產生的相應脂肪酸具有較低的酸度，而所產生的氨又屬鹼性，故使培養基鹼化。即：



因而，布氏菌的醣發酵試驗培養基中的氮源應盡量減少，並須降低培養基的 pH，以盡量避免脫氨作用所起的影響。但必須指出，如果培養基仍與通常發酵管一樣成為液態，則仍不能得到預期的結果。如果於液體發酵管中（不加 0.3% 的瓊脂），接種布氏菌後加上一層無菌液體石蠟，對某種糖類則可表現發酵反應而產酸。不加石蠟的對照管則表現不出酸性反應（見圖版 I, 4—5）。

結果證明，加入少量瓊脂（0.3%）使培養基成為半固體狀態應測定發酵反應中的必要性。亦證明了，布氏菌利用醣類乃屬於發酵型，非氧化型。至於普通的醣發酵培養基，種菌後加液體石蠟，即使長期培養，却始終陰性，我們推斷主要是因為其中蛋白胨過多，醣的含量少，不利於布氏菌的發酵反應。至於大量接種細菌的目的在於加速細菌生長及利用既成的酶，以促進發酵反應。此種半固體醣發酵培養基亦可利用作為腸道菌屬快速生化反應試驗（4 小時即可讀取結果）。並可用以研究對醣類發酵微弱、不規則、或在一般條件下無發酵反應的菌類。

Huddleson 氏^[11-13]，首先利用染料抑制試驗將布氏菌屬分型。以往最常用者為平板法，其缺點是染料原液不恆定，不易掌握培養基中的染料含量，培養基用量多且需臨時製備，接種菌量的多寡難得一致，而影響試驗結果。此外培養基中含有染料對細菌生長是不利因素，故布氏菌在其上生長緩慢（約需 1 週）。為了克服以上缺點，蘇聯學者 Здродовский 氏等試驗室多年採用改良的半液體培養基的試管染料抑制試驗法^[14]；近年來 Cruickshank 氏^[15]推薦用濾紙條染料抑制試驗法；Pickett 氏（1952）使用錠劑染料作分型試驗^[16]；但以上各種改良法均存在一定的缺點和技術性困難。因而，我們改用了濾紙片法，即將染料在一定條件下吸收在紙片上作染料抑制試驗，既克服了以上缺點，又簡化了手續。在選用的 5 種染料中，發見結晶紫及甲基紫的結果不恆定，同時，也同意其他作者的建議^[13,14]，如僅用硫堇與復紅兩種染料，即能明確的將布氏菌分為三型。用我們設計的瓊脂平板作染料抑制試驗，細菌生長迅速，1—2 天即可定型，倘若以普通瓊脂平板代替，在 2—3 天內亦可得到滿意結果。

Püschell^[17]首先發見布氏菌可分解脲素，以後其他作者^[18,19]也指出布氏菌分解脲素具有規律性。Pickett 氏^[16]的實驗證明 12 株豕型菌均在 15 分鐘內出現陽性反應，牛型及羊型無一在 55 分鐘內出現陽性者。我們的試驗證明，雖用通常的 Rustigian 及 Stuart 二氏脲素培養基，豕型布氏菌在 15—25 分鐘內出現陽性反應，但若延長觀察時間，本試驗也能以區別羊型及牛型布氏菌。前者在 1—3 小時內，後者則需 8—10 小時出現陽性。因此認為脲素水解試驗也有輔助分型的價值。

在研究過程中我們也試驗了布氏菌對 CO₂ 的需要，H₂S 的產生及還原硝酸鹽^[20]的能力。但上述試驗結果不太穩定，在分型上價值不大。

本試驗因限於菌種來源，僅試驗了 28 株布氏菌菌種，結果雖然良好，但醣發酵試驗對

非典型及亞型布氏菌株的反應規律究屬如何,尚須作進一步的研究。

總 結

本文報告布氏菌屬生物學特性之初步研究結果。與一般教科書之敘述稍有不同,即我們證明了:在一定條件下,布氏菌可以分解某些醣類,並可根據其發酵反應規律,將布氏菌分為牛、羊、豕三型。經多次試驗與改進,我們在特製的半固體醣發酵培基中選用葡萄糖、麥芽糖、甘露醇、鼠李糖及蔗糖(或菌藻糖)等5種醣類。其發酵反應規律為:牛型布氏菌分解葡萄糖及鼠李糖;羊型僅能分解葡萄糖;而豕型則可分解葡萄糖、麥芽糖及蔗糖。此外,我們並將舊有的染料抑制試驗,改為利用濾紙片法,操作簡便可靠,且能迅速得出結果。至於布氏菌對脲素的水解作用及硝酸鹽還原試驗的反應,試驗證明前者有輔助分型價值。最後並簡要地討論了各種生化反應的機制問題。

註:本研究工作承教研組荆永誌副主任的指導及司繞旺、鞠文煥等同志提出寶貴意見,特表謝忱。

參 考 文 獻

- [1] Pickett, M. J. and Nelson, E. L.: *J. Bact.*, **68**: 333—339, 1955.
- [2] Pickett, M. J.: *Am. J. Med. Tech.* May—June, 1955.
- [3] Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunology, vol. 1, pp. 934, The Williams and Wilkins Co., 1955.
- [4] Zinser's Textbook of Bacteriology, pp. 493, New York, Appleton-Century Crofts, Inc. 1952.
- [5] 余 濱: 細菌學, 人民衛生出版社, 1956年 第一版, 217頁。
- [6] 中國醫科大學編: 醫學微生物學, 1956, 213—313頁。
- [7] MaAlpine, J. M. and Slanetz, C. A.: *J. Infect. Dis.*, **42**: 73—78, 1928.
- [8] McCullough, N. B. and Beal, G. A.: *J. Inf. Dis.*, **89**: 266—271, 1951.
- [9] 趙宗智: 中國微生物學會第二屆全國會員代表大會論文摘要, 1956年 7月, 93—98頁。
- [10] Hugh, R. and Leif, E.: *J. Bact.*, **66**: 24—26, 1953.
- [11] Huddleson, I. F. and Abell, E., J.: *Bact.*, **13**: 13, 1927.
- [12] Huddleson, I. F. and Abell, E., J.: *Infect. Dis.*, **43**: 81, 1928.
- [13] Huddleson, I. F. and Hallmam, E. T., J.: *Infect. Dis.*, **45**: 293, 1929.
- [14] Г. А. 伊瓦申佐夫等著, 陳鏞譯: 急性傳染病學教程——布氏桿菌病, 1956, 201—308頁, 人民衛生出版社。
- [15] Cruickshank, J. C.: *J. Path. Bact.*, **60**: 328—329, 1948.
- [16] Pickett, M. J.: *J. Lab. Clin. Med.*, pp. 200—205, 1952.
- [17] Puschel J.: *Klin. wscrh.*, **15**: 375, 1936.
- [18] Pacheco, G. and Thiogo de Mello, M., *J. Bact.*, **59**: 689—691, 1950.
- [19] Renoux, G. and Quatrefages, H.: *Ann. Inst. Pasteur*, **82**: 289, 1951.
- [20] Zobell, C. E. and Meyer, K. F.: *J. Infect. Dis.*, **51**: 99—108, 1932.

PHYSIOLOGICAL STUDIES OF BRUCELLAE

I. SPECIATION WITHIN THE GENUS *BRUCELLA*

CHI LING-CHEN and LI TSAI-LIEN

(Department of Microbiology, Shantung Medical College, Tsinan)

In this investigation procedures were developed for qualitative fermentation tests with *Brucellae*. Nine (9) strains of standard and eighteen (18) newly isolated cultures of *Brucellae*, on the basis of fermentation pattern of glucose, mannitol, maltose, rhamnose and sucrose, fell into three well defined groups: i.e. *abortus*, *melitensis* and *suis*. The first two sugars were positive and negative controls and the latter three sugars differentiated the three species within the genus *Brucella*.

A paper disc technique of differential dye sensitivity test with thionin, basic fuchsin and pyronin was described which was proved to be more reliable and easier to perform than the old plate or paper strip technique. We have also observed that the ability and speed of different strains of brucellae to break down urea, as reported by others, were well related to their species designations.

Lastly, the mechanisms of the above tests were briefly discussed.