

自制SS琼脂培养基的研究*

何亦祥 娄绍琦·鲁志新 张容

(沈阳军区卫生防疫检验所)

分离肠道菌的选择性培养基,目前以苏联的 Bakro-arap “K” 与美国 Difco 厂的 Bacto SS agar 效果较好。近年来,国内有许多人对此类培养基进行研究,并取得了一定的成绩^[1-6]。但其中大部分由于培养基中胆盐成份欠纯,应用效果受到了一定的限制。为此,我们采用了质量较纯的混合胆盐^[9]的制法,并综合其他有利因子制成一种 SS 琼脂培养基。经初步试验,获得了良好的效果。现将实验结果报告如下。

材料和方 法

1. 培养基

(一) 自制 SS 琼脂:

(1) 成份:

基础液(酸浸牛肉汁 ¹⁾)	840	毫升
蛋白胨	5.0	克
琼脂	13.5	克
磷酸氢二钠	2.0	克
枸橼酸	0.327	克
乳糖	10.0	克
枸橼酸钠	8.5	克
硫代硫酸钠	8.5	克
枸橼酸铁	1.0	克
混合胆盐	8.5	克
煌绿	0.33	毫克
中性红	0.025	克
pH	7.0	

(2) 制法:

基础液 840 毫升(加下列溶液后总量成为 1000 毫升)加入蛋白胨和琼脂,加热溶化,修正 pH 至 7.2,灭菌备用。于使用前溶化,待冷至 70°C 时依次加入下列各溶液,充分混合后立即倾注平皿。

- ① 缓冲液(磷酸氢二钠 20 克、枸橼酸 3.27 克,加蒸馏水至 100 毫升) 10 毫升
- ② 乳糖 20% 溶液 50 毫升

* 1958 年 7 月 12 日收到。

1) 酸浸牛肉汁的制备:牛肉 1 份、蒸馏水 3 份,加 1% 量之 N·HCl,浸一夜后,煮沸 10 分钟,过滤,修正 pH 至 7.4,灭菌备用。

③甲液(枸橼酸鉄 2 克、枸橼酸鈉 17 克、硫代硫酸鈉 17 克,加蒸餾水至 100 毫升)	50 毫升
④乙液(混合胆盐 17%水溶液)	50 毫升
⑤0.1% 煌綠水溶液	0.33 毫升
⑥1% 中性紅水溶液	2.5 毫升

为观察培养基内各成份对培养效果的影响,而作了系统的比較試驗。每当进行某一成份比較时,只将此成份作不同种类或不同浓度的調整,其他成份按上述成份不变。

(二) Бакто-агар “Ж” 成品,系苏联 гамалея 流行病微生物研究所制品,批号为 N 155, 5/VIII 1953。

2. 試驗用菌种:

(一) 实验室菌株:

大腸菌: C₁、C₃、C₄、C₅。(系于去氧胆酸鈉-枸橼酸鈉琼脂上所选择生长能力不同,并經生化学鑑定确认的大腸菌菌株)。

痢疾菌: 志賀氏、舒密次氏、宋内氏及福氏 1a、1b、2a、2b、3、4a、4b、5、6 各型及 x、y 变种等痢疾菌。

沙門氏菌: 副伤寒甲、乙、丙、伤寒、紐因吞沙門氏菌。

(二) 地方菌株:

宋内氏痢疾菌: 173-55、174-55、182-55、792-57、793-57 等 5 株。

3. 方法及結果判定:

将上述各菌种分別接种于肉湯管内,經 37°C 培养 18—20 小时,以生理盐水稀釋至 10⁻⁴—10⁻⁶。

取上述稀釋菌液一白金耳,滴于平皿中央,以 Conradi 氏玻棒涂布全面。每种細菌接种三个同种培养基。經 37°C 20 小时培育后,計算三个同种平皿之平均菌落数,并挑选 15 个菌落測定其平均直径。记录其結果。

結 果

1. 对自制 SS 琼脂成分有效諸因素的研究:

(一) 基础液的比較——細菌所需营养素有不同,痢疾菌属各型新分离的菌株及某些菌型之沙門氏菌,如伤寒、副伤寒甲、仙台及猪伤寒沙門氏菌等,对营养的要求尤較严格。边野喜氏、早川氏^[10]和郑翼宗氏^[7]等曾报告,选择适合的基础液不但可促进病原菌的发育,且可适当的抑制大腸菌的生长。

我們以 0.5% 牛肉膏、牛肉汁及酸浸牛肉汁三种基础液做了比較試驗,結果如表 1。

由表 1 看出,在以酸牛肉汁制备的培养基上,病原菌发育良好,菌落大,大腸菌几乎全部被抑制。以牛肉汁制备的培养基对大腸菌的抑制能力較差;以牛肉膏制备的培养基更差。二者对大腸桿菌 C₃、C₅ 的作用很小。

(二) 蛋白胨的比較——各种蛋白胨、胨所含主要氨基酸質量均有所不同^[11],而腸系菌对氨基酸的利用亦不一致。我們將現有的 8 种蛋白胨、胨,进行了比較,观察其对腸系病原菌的生长及对大腸菌的抑制能力(表 2)。

表 1 不同基础液对细菌生长影响的比较

菌 种	菌 落 数			菌 落 直 径 (mm)		
	酸浸牛肉汁	牛 肉 汁	牛 肉 膏	酸浸牛肉汁	牛 肉 汁	牛 肉 膏
大腸菌 C ₁	0	0	9(-)	—	—	0.90
大腸菌 C ₂	0	143(+)	432(+++)	—	1.92	2.46
大腸菌 C ₃	11(-)	264(+)	186(+++)	0.70	2.42	2.78
甲型副伤寒沙門氏菌	340	366	356	1.20	1.00	0.90
伤寒沙門氏菌	237	195	211	1.96	1.64	1.18
福氏痢疾菌 1b 型	47	18	13	1.82	1.84	1.36
福氏痢疾菌 2a 型	335	377	362	1.96	1.96	1.22

註 (一) 菌落周围无沉淀产生; (+) 有少量沉淀; (++) 有明显沉淀; (+++) 培养基全面生成沉淀。

表 2 8种蛋白胨(蛋白胨)对细菌生长影响的比较

菌 种	菌 落 数								菌 落 直 径 (mm)							
	德	中	日	英胨	英胨	美胨	美胨	自胨	德	中	日	英胨	英胨	美胨	美胨	自胨
大腸菌 C ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
大腸菌 C ₂	469 (++)	426 (+++)	535 (+++)	316 (+)	384 (+++)	543 (+++)	595 (+++)	462 (±)	1.42	1.55	1.65	1.47	1.62	1.52	1.75	1.38
大腸菌 C ₃	190 (-)	214 (-)	182 (-)	163 (-)	123 (-)	238 (-)	198 (-)	0	1.19	1.11	1.19	1.20	1.16	1.70	1.66	—
甲型副伤寒沙門氏菌	1511	1408	1694	1742	1556	1246	1844	1646	1.59	1.34	1.38	1.36	1.36	1.46	1.51	1.51
伤寒沙門氏菌	146	178	132	94	131	118	151	83	1.07	1.16	0.88	1.06	1.19	0.89	0.95	0.73
福氏痢疾菌 1b 型	149	155	142	145	147	175	136	149	1.70	1.25	1.14	1.21	1.53	1.20	1.24	1.57
福氏痢疾菌 2a 型	398	311	693	522	361	304	286	331	1.87	1.98	1.69	1.54	1.94	1.96	1.94	1.63

註：德 —— Pepton cus Casin E. Merck
 中 —— 蛋白胨(生物培养基用)上海
 日 —— 吨鈴ペプトン, 日本共荣。
 英胨 —— Peptone B. D. H.
 美胨 —— Tryptose B. D. H.
 美胨 —— Bacto-Pepton Difco.
 美胨 —— Bacto-Peptose Difco.

自胨 —— 自制蛋白胨: 牛肉 1 份加水 3 份, 滴定 pH 至 8.2, 加 0.5% 胰酶, 于 52°C 水浴内消化 2 小时, 然后矫正 pH 为 7.2, 煮沸 10 分钟滤过, 滤液在 80°C 下浓缩至原体积之 1/10 即成。用时每升培养基加 30 毫升。

結果以英胨、英胨、德胨及自制胨較好。一般的說, 英胨及英胨所制之培养基, 对病原菌的生长及对大腸菌的抑制作用均佳, 但菌落直径結果不及德胨(菌落直径, 大腸菌以小为佳, 病原菌則相反)。自制胨对大腸菌的抑制作用較其他胨显著, 且沉淀最少。这充分說明, 制备 SS 琼脂时, 蛋白胨有选择的必要。

(三) 培养基中加缓冲盐問題 —— 胆盐在弱酸性溶液中即形成胆酸而沉淀^[9]。大腸菌生长时分解乳糖产酸, 可使培养基中胆盐沉淀与中性紅結合集聚于菌落上, 故于 SS 琼脂上菌落甚易識別。但如培养基缓冲作用甚小, 大腸菌之产酸易扩散于整个培养基中, 形成全面胆酸沉淀, 影响病原菌菌落的挑选。为消除此过多的沉淀, 加入适量的缓冲盐, 至为必要。我們用 0.1% 及 0.2% 的磷酸氢二鈉进行观察, 并按 Clark & Lubs 二氏缓冲盐配法, 加相应量的枸橼酸, 保持培养基 pH 为 7.0。結果如表 3。

表3 加缓冲盐对细菌生长影响的比较

菌种	菌数与沉淀			菌落直径(mm)		
	0.1%	0.2%	0	0.1%	0.2%	0
大肠菌 C ₁	0	0	0	—	—	—
大肠菌 C ₄	404(++)	306(+)	415(+++)	2.24	1.94	1.98
大肠菌 C ₆	464(+)	305(±)	432(++)	2.10	1.95	2.23
甲型副伤寒沙门氏菌	1580	1300	864	1.90	2.10	1.98
伤寒沙门氏菌	77	60	69	2.06	2.22	2.48
福氏痢疾菌 1b 型	130	139	135	2.39	2.15	2.54
福氏痢疾菌 2a 型	154	164	134	2.84	2.84	2.66

註: 0.1%——1000 毫升培养基中含磷酸氢二钠 1 克, 枸橼酸 0.164 克;

0.2%——1000 毫升培养基中含磷酸氢二钠 2 克, 枸橼酸 0.327 克;

0——不含缓冲盐之对照培养基。

由表 3 可看出, 培养基含有缓冲盐能够减少因大肠菌生长而形成之沉淀, 其中含 0.2% 磷酸氢二钠的培养基对大肠菌的抑制能力亦有所增加。

(四) 自制混合胆盐与去氧胆酸钠的比较——我们将混合胆盐(0.85%)与去氧胆酸钠(0.5%)分别加入 SS 培养基中进行比较, 结果如表 4。

表4 自制混合胆盐与去氧胆酸钠的比较

菌种	菌落数		菌落直径(mm)	
	混合胆盐	去氧胆酸钠	混合胆盐	去氧胆酸钠
大肠菌 C ₁	86(-)	0	<0.40	—
大肠菌 C ₄	132(±)	111(++)	2.41	1.88
大肠菌 C ₆	11(-)	60(-)	<0.40	1.33
甲型副伤寒沙门氏菌	306	248	1.86	1.38
伤寒沙门氏菌	159	114	2.27	0.90
福氏痢疾菌 1b 型	565	476	1.80	1.44
福氏痢疾菌 2a 型	788	645	1.97	1.72

由表 4 可看出, 对大肠菌的抑制作用, 含去氧胆酸钠的培养基较含混合胆盐者为优; 对病原菌的生长, 后者的效果则超过前者, 菌数普遍多菌落且大。

在含混合胆盐的培养基上, 大肠菌生长所产生的沉淀是云雾状, 颗粒细小且少扩散于培养基中, 不影响对菌落的观察; 含去氧胆酸钠的培养基的沉淀呈为粗大的颗粒, 并易扩散到培养基中而影响菌落的观察。

(五) 培养基中枸橼酸钠与硫代硫酸钠的浓度问题。对培养基中盐类浓度的探讨, 我们是分两步进行的:

第一步, 找出适于细菌生长的盐类浓度范围。根据实验, 这个范围是在 1.28% 以下。高于 1.28%, 虽大肠菌生长无几, 病原菌生长也遭到甚强的抑制。

第二步, 在适于细菌生长的盐类浓度范围内进一步做比较试验, 找出最适浓度。结果如表 5。

表 5 不同浓度的盐类对细菌生长影响的比较

菌 种	菌 落 数				菌 落 直 径 (mm)			
	0.75%	0.85%	0.92%	1.02%	0.75%	0.85%	0.92%	1.02%
大腸菌 C ₁	0	0	0	0	—	—	—	—
大腸菌 C ₄	436(-)	208(-)	97(-)	6(-)	2.69	2.06	1.62	1.00
大腸菌 C ₅	0	0	0	0	—	—	—	—
甲型副伤寒沙門氏菌	561	551	384	333	2.14	2.18	1.59	1.88
伤寒沙門氏菌	219	345	204	236	3.09	3.05	2.39	2.39
福氏痢疾菌 1b 型	708	536	255	285	2.45	2.46	1.59	1.31
福氏痢疾菌 2a 型	602	623	341	291	2.86	2.86	2.27	1.85

註：枸橼酸鈉、硫代硫酸鈉用量相同，表內百分数表示在培养基中的含量。

如表 5 所示，在一定范围内，枸橼酸鈉及硫代硫酸鈉含量增加对大腸菌有显著抑制作用，对病原菌的作用则不及对大腸菌显著。試驗結果中以 0.85% 較为适合。

2. 自制 SS 琼脂与 Бакто-араp “Ж” 的比较：

用本实验室保存的各型痢疾菌，各羣沙門氏菌（代表株）及大腸菌等，将自制 SS 琼脂与 Бакто-араp “Ж” 做了比較試驗。实验結果：二种培养基对大腸菌的抑制作用相差无几，对痢疾菌，自制 SS 較 Бакто-араp “Ж” 的效果好。受試的福氏痢疾菌 3 型、4b 型及 x 变种在 Бакто-араp “Ж” 上受抑制，2b 型等生长亦不佳；舒密次氏痢疾菌、福氏痢疾菌 4a 型、y 变种等在自制 SS 琼脂上的結果略逊于 Бакто-араp “Ж” 的結果。二者对沙門氏菌的結果相似。

在实验室中保存的痢疾菌，尤其是宋内氏痢疾菌，容易变异。为观察新分离的痢疾菌在自制 SS 琼脂上生长情形。我們用地方分离的 5 株宋内氏痢疾菌与实验室保存的宋内氏痢疾菌 (51334)，在自制 SS 琼脂与 Бакто-араp “Ж” 上做了比較試驗。結果在二培养基上宋内氏痢疾菌的生长，因菌株而不同。单为 II 相的菌株，在二培养基上均被抑制，而具两相 (I 相及 II 相) 的菌株則可生长。新分离的菌較陈旧菌株生长为佳。其中自制 SS 琼脂对分离菌株的生长显示了較好的作用。

討 論

制备 SS 琼脂培养基时。选择适宜的胆盐是个首要的关键問題。以去氧胆酸鈉制备 SS 琼脂培养基，虽对大腸菌有很強的抑制作用，但对腸系病原菌，特别是对痢疾菌也有一定程度的抑制作用；以胆汁（或干燥胆粉、胆膏等）制成的 SS 琼脂对病原菌的抑制作用很小，但对大腸菌、腸球菌等的抑制也不显著，培养基的选择作用很差。有些作者为了增加培养基对大腸菌等的抑制能力，往往提高处方中枸橼酸鈉及硫代硫酸鈉的含量。但盐类的选择性不强，浓度过高时，大腸菌的生长虽受到抑制，对腸系病原菌的生长也有不良影响。而我們所选择的混合胆盐，經試驗結果証明，堪与 3 号胆盐媲美^[13]。按梁植权氏等^[9]的意見，混合胆盐是胆酸盐与去氧胆盐的混合物，在我們的实验中它显示了兼有胆汁与去氧胆酸鈉的优点，即对大腸菌、腸球菌等有相当強的抑制能力，对腸系病原菌的抑制作用又很小，較其余胆盐显著为优。因此我們认为混合胆盐是适于制备 SS 培养基的。

其次,制作 SS 琼脂还有一个重要因素,即枸橼酸钠和硫代硫酸钠浓度。枸橼酸钠和硫代硫酸钠在抑制大肠菌上有重要作用,在一定浓度范围内其对大肠菌的抑制作用较对肠系病原菌显著,但当浓度过高时,对病原菌的生长是不利的。国内各报告所述及的适合浓度范围颇不一致,由 0.85~1.4%,系因各家所用胆盐不同。培养基中的盐类浓度决定于胆盐的质量,如所用胆盐对大肠菌抑制作用强的,所需盐类就少,如用胆汁等就需提高盐类浓度。任何一种胆盐,都有与之相应的盐类浓度,在此浓度下,培养基的选择效果达到高峯,即在对病原菌抑制作用很小的同时,对大肠菌等的抑制作用仍相当强大。以混合胆盐所制的 SS 琼脂,这个浓度是以 0.85% 为最适合。

培养基中因大肠菌生长,过量的产酸,培养基面会有沉淀物生成,影响菌落的观察与挑选。但培养基如为碱性时,对病原菌的生长也不利。因此注意保持 SS 琼脂的 pH 为中性或弱碱性,甚为必要。我们在培养基中加磷酸氢二钠及枸橼酸解决了此问题。

結 論

(一) 在 SS 琼脂培养基的基础上,比较了该培养基中诸因素对大肠菌、痢疾菌、沙门氏菌的作用,得到如下结论。1. 梁氏混合胆盐适于制备 SS 琼脂培养基; 2. 制备 SS 琼脂所需的枸橼酸钠及硫代硫酸钠的用量不宜过高,自制 SS 培养基中以 0.85% 为最适浓度; 3. 酸牛肉汁为制备 SS 琼脂良好之基础液; 4. 英制蛋白胨和胰及德制蛋白胨较好,自制胰效果亦佳; 5. 培养基中加入适量的缓冲盐,可减少因大肠菌生长而产生的沉淀,并可增加培养基对大肠菌和肠球菌等的抑制能力。

(二) 自制 SS 琼脂培养基经实验证实,效果与苏联的 Бакто-арар “А” 相似。

参 考 文 献

- [1] 鄭翼宗:微生物学报, 5 (2) 127, 1957.
- [2] 金自桓:微生物学报, 2 (1) 25, 1954.
- [3] 程知义等:人民军医, 59 期, 17 页, 1956. 10.
- [4] 俞用川:微生物学报, 4 (2) 267, 1956.
- [5] 鄭翼宗等:微生物学报, 5 (2) 129, 1957.
- [6] 方綱等:中华医学杂志, 43: 514, 1957. 7.
- [7] 景冠华: SS 琼脂諸主要因素观察及牛胆汁簡易 SS 琼脂, 牛胆汁粉干燥 SS 琼脂的研究. 中国微生物学会第二届全国代表大会论文摘要, 1956. 1.
- [8] 楊均培等:用牛胆汁制簡易 SS 琼脂及常用鑑別培养基由疑似痢疾病人檢出病原菌的效果比較, 同上.
- [9] 梁植权等:中华医学杂志, 41: 640, 1955. 7.
- [10] 辺野冢正夫、早川武: SS 寒天培地に关する研究, 赤痢及ひ疫痢, 中外医学社, 昭和 29. 8.
- [11] 方景灿等:实用細菌学手册 148 页, 人民卫生出版社, 1954.
- [12] 景冠华:細菌檢驗用培养基手册, 112 页, 人民卫生出版社, 1955.
- [13] 何亦祥等: 12 种胆盐制备 SS 琼脂的实验比較. 待发表

ON THE STUDY OF SS AGAR MADE WITH MIXED BILE-SALT

HO YI-HSIANG, LOU SHAO-CHI, LOO CHIH-HSIN AND CHANG YUNG

Based on SS agar formula, a comparative study on factors that effect the growth of *B. coli*, *Salmonellae* and *Shigellae* were reported. The following conclusions were drawn:

1. The mixed bile-salt has been proved suitable for the preparation of SS agar.
2. The amount of citrate and thiosulfate used in SS agar should not be too high, a concentration of 0.85% was optimal.
3. Acid hydrolysate of beef was proved to be a good nutrient for SS agar preparation.
4. Local made peptone has been proved to give results as good as those imported.
5. The addition of suitable amount of buffer in the medium decreased the amount of precipitate caused by the growth of *B. coli* and increased the inhibiting action toward the latter and of enterococci.

It was concluded that the results obtained from the mixed bile-salt SS agar was as satisfactory as that obtained from Bacto agar “Ж”.