

# 梭狀芽孢桿菌屬培養技術上的商榷\*

胡 乃 豐

(貴陽醫學院細菌科)

梭狀芽孢桿菌屬的分離與鑑別方法,已有多種,但其最基本的要求不外使一定的有限空間的氧壓降低,並保持這一厭氣環境;或是在一定的培養基內加入種種能夠降低氧化還原勢能的物質。總之,無論應用哪一種技術,其目的是以人工方法造成缺氧或無氧的條件,以利細菌的生長。

製造人工厭氣的方法,見諸文獻者殊多,如在使用 Novy 氏或 Smillic<sup>[1]</sup> 氏厭氣缸時,則排除其中的空氣或代以惰性氣體;若為 McIntosh-Fields 器時則以電流通過鉀化石棉,使器內氧氣與所供給的氫氣經觸媒作用而被耗盡;其他尚有 Rosenthal<sup>[2]</sup> 氏鉻硫酸法以及 Buchner<sup>[3]</sup> 氏的焦性沒食子酸法等。在造成人工氧化還原勢能降低的培養基方面,則有 Brewer<sup>[4]</sup> 氏的硫乙醇酸鈉以及含有其他還原劑如抗壞血酸的培養基等。這些人工厭氣環境的製造方法,視物質條件之不同,國內各地在採用上亦各隨其便。但上述各厭氣環境,常由于水份過多,或須使用其他的輔助方法如加表面覆蓋物等都使分離與鑑定工作發生一定的困難。

關於 Buchner 氏的焦性沒食子酸鹼液吸氧法,因所需物質易於獲取,故在國內應用較廣。但如在較大的有限空間內進行培養時,其缺點仍是水份過多。而且在使用焦性沒食子酸與苛性鈉之量與濃度上,各家記載亦有出入。如 Buchner 氏在 60.0 立方厘米之空間內焦性沒食子酸約半藥匙, 20% NaOH 3.0—5.0 毫升; Jordan<sup>[5]</sup> 氏則以 1000.0 立方厘米空間用焦性沒食子酸 10.0 克, 1% NaOH 150.0 毫升, Н. Л. Утевский<sup>[6]</sup> 在 200.0 立方厘米左右空間內用焦性沒食子酸 1.0 克,及重碳酸 1.0 毫升;而王逸民氏在利用普通瓊脂平板直接造成厭氣環境時,所使用的焦性沒食子酸為 1.0 克, 10% NaOH 1.0 毫升。王逸民氏<sup>[7]</sup> 的厭氣培養法,在應用上殊為方便,但我等在採用之後,感覺在某些方面尚有修改之餘地。如焦性沒食子酸的用量,在我們的實驗中,每一培養空間為 65.0 立方厘米, 0.4 克即足以達到破傷風梭狀芽孢桿菌生長的厭氣環境。這一資料與 Н. Л. Утевский 所介紹的用量殊為接近。

\* 1956年6月1日收到。

本文承于本崇副教授具體指導,特致謝意。

在用生化反應初步鑑定菌種時，Smith 氏<sup>[8]</sup>曾介紹了高層瓊脂。經我們使用後，亦感覺某些方面應有所修正。為節約人力與物力，並可能更好地便於梭狀芽孢桿菌屬的分離與鑑別，以利於教學和臨床檢驗工作，茲將我們對於此屬細菌的培養技術上的一些觀察結果提供商榷。

### (一) 造成有限的厭氣環境，焦性沒食子酸與氫氧化鈉用量上的探討

在有限空間內用焦性沒食子酸與氫氧化鈉造成厭氣環境的辦法，特別在用普通瓊脂平板直接造成厭氣環境時，無論在教學或檢驗工作過程中都極為方便，既易於操作，而且不受標本數量上的限制，且可得隨時觀察。但關於此二種藥品用量上的比例，以及氫氧化鈉的濃度與容積上的關係，各文獻記載又有出入。因此，如在用普通瓊脂平板直接造成厭氣環境時，能確定藥品用量上的比例以及濃度與容積上的關係，則可能更有效地控制這一人為的外界環境。

在造成平皿空間厭氣環境時（保持足夠量的焦性沒食子酸，氫氧化鈉的容量，視濃度的大小而有增減）曾觀察到：(1) 當使用濃度低（%）的氫氧化鈉時，則 3% 或 4% 的瓊脂面上水份過多，菌落因擴散生長而不便於純種分離。(2) 6% 的瓊脂雖能多少限制細菌的擴散，但在製作有一定的困難。(3) 氫氧化鈉濃度高（20%）時，有使 3% 及 4% 瓊脂面上乾燥的作用；但在這樣的情況下，細菌的生長顯然不滿意，因此即首先探求在這樣的培養技術中，所使用的氫氧化鈉是否有最適宜的容積與濃度的存在。

### 甲. 氫氧化鈉濃度與容積的改變對於培養平皿空間厭氣環境的影響

## 材料與方法

1. 菌種：破傷風梭狀芽孢桿菌，為本試驗室在臨床標本中所分離。保存於煮肉基內每 15 日移種一次。如用高層肝化湯培養 7 日之濾液（1:200 生理鹽水稀釋後），0.1 毫升注射於 20—22 克小白鼠皮下，48 小時即將小鼠殺死。

破傷風梭狀芽孢桿菌所需的厭氣環境較嚴格，因此，在觀察平皿空間厭氣環境時，均採用此菌為代表。

試驗中所用的接種物：新移於煮肉基 18 小時的破傷風梭狀芽孢桿菌，一般只取一鉗環接種於試驗用的培養基內。

2. 3% 與 4% 肝化湯瓊脂平板（pH 7.6）。平皿為實驗室常用的（直徑約 9.0 厘米，高約 1.5 厘米）。每一平皿所用的肝化湯瓊脂量為 12.0 毫升。經傾注平板後，放於 37°C 孵育過一夜，使其表面乾燥。

3. 培養平皿空間厭氣環境的形成。在用平皿培養時，國內多採用如下的方法：先在一塊 14 × 15 平方厘米的玻璃板上放置以脫脂棉花或紗布包裹的焦性沒食子酸，於此小包上滴加氫氧化鈉，再立即將接種了的培養皿覆蓋於其上，皿邊緣與玻璃板交界處，則

以熔蠟密封,使這一有限空間與外界隔絕,借藥品的吸氧作用而漸成爲厭氣環境。這一方法的缺點在於棉花等常不能把所可能存在於空間內的液體吸附於其上,因此常有液體流散於皿邊與玻板之交界處。在開啓平皿培養時,由於陰壓的關係,溢液多飛濺於培養面上,因而影響了結果的觀察;且棉紗等不能收回再用。

因此,乃以直徑約 7.5 厘米,高約 0.8—1.0 厘米的小平皿替代棉紗等作爲藥品的盛器。此種盛器經清洗後不須消毒即可再備用。工作時,先將焦性沒食子酸放置於小皿內之一側,俟標本接種於培養面後,再加氫氧化鈉於鄰近焦性沒食子酸處,將接種平皿覆蓋於其上,皿邊與玻板交界處以熱熔的蠟質(蜂蠟與凡士林 = 3:1) 密封。此時將玻板略爲傾斜使藥品混合後,即放置孵箱中培養。經用上述簡單的辦法之後,溢液及其飛濺的缺點可以完全避免。

培養平皿空間的估計:高約 1.5 厘米,直徑約 9 厘米之平皿,其總容積爲 88.0—90.0 立方厘米,培養基佔去 12.0 立方厘米,直徑 7.5 厘米小平皿的體積爲 11.0—12.0 立方厘米,故實際剩下的有限空間爲 65.0—66.0 立方厘米這也即是將其中吸去一定游離氧的空氣體積。

必需先行觀察的應當是氫氧化鈉的濃度與容積的改變對於培養平皿空間厭氣環境的影響。希望能確定一個適宜的劑量,一方面不致使 3% 或 4% 肝化湯有脫水現象,另一方面這一有限空間內的水份也不能過多,但無論如何,培養的生長情況必須良好。

如據 Jordan 氏等的方法,則在 65.0—66.0 立方厘米的空間內應用焦性沒食子酸 0.65 克。因此,在觀察氫氧化鈉不同濃度與用量上所產生的影響時,先暫時固定焦性沒食子酸的用量爲 0.65 克,至於此一空間所需氫氧化鈉的濃度與用量,亦依據 Jordan 氏之用量而分別算出。但其容量在百分之一毫升時,則採用四捨五入的辦法,如用 1%

表 1 不同濃度與用量的 NaOH 影響平皿空間水份的情形

NaOH 的 %	NaOH 的用量 (毫升)	3% 肝化湯瓊脂平板 (培養 48 小時)			4% 肝化湯瓊脂平板 (培養 48 小時)		
		NaOH 總量 (毫升)	吸水或失水量 (毫升)	玻板上凝結水份	NaOH 總量 (毫升)	吸水或失水量 (毫升)	玻板上凝結水份
1%	9.8	9.00	-0.8	大量	9.1	-0.7	大量
2%	4.9	4.3	-0.6	大量	4.0	-0.9	大量
3%	3.3	2.8	-0.5	中等量	2.9	-0.4	中等量
4%	2.8	2.7	-0.1	中等量	2.6	-0.2	中等量
5%	2.0	2.1	+0.1	微量	2.2	+0.2	微量
6%	1.6	2.1	+0.5	極微量	2.3	+0.9	極微量
7%	1.4	2.2	+0.8	無	2.3	+0.9	無
8%	1.2	2.4	+1.2	無	2.5	+1.3	無
18%	0.52	1.4	+0.9	無	1.4	+0.9	無
20%	0.48	1.3	+0.8	無	1.5	+1.0	無

NaOH, 照計算為 9.75 毫升, 實際用 9.8 毫升。

這一試驗的結果, 說明 5%—6% 的 NaOH 對於 3% 或 4% 的肝化湯瓊脂內水份的奪取最微, 而其本身水份被蒸發的可能亦最少。但在實際應用上似乎以使用 6% 的 NaOH 最為理想。因將培養放於室溫內冷卻後可見盛載平皿的玻板上只凝結有極微少的水份。至於 NaOH 的濃度高於或低於 6% 時, 則此有限的培養環境即將顯過於乾燥或過於潮濕, 此外破傷風梭狀芽孢桿菌在用不同濃度 NaOH 所造成的厭氣環境中均有擴散生長, 但在較乾燥的培養基表面上, 其擴散的菌膜較為薄弱。

因考慮到 48 小時的培養時間, 不可能保證新分離菌種的良好生長, 同時也須明確在延長培養時, 平皿空間內水份變化的情況。在延長培養至 72 小時, 可見培養基內的水份在繼續失脫, 其吸收於氫氧化鈉溶液中之量亦有增加, 但仍以 6% NaOH 及 3% 瓊脂的環境為最好, 因在玻板上所凝結的水份較之 4% NaOH 及 4% 瓊脂的環境為少。又在 3% 及 4% 瓊脂面上破傷風梭狀芽孢桿菌生長良好的情況, 殊無顯著的不同。

表 2 延長培養時平皿空間水份變化情況

NaOH %	NaOH 用量	3% 瓊脂 平板 培養 48 小時後			3% 瓊脂 平板 培養 72 小時後			4% 瓊脂 平板 培養 48 小時後			4% 瓊脂 平板 培養 72 小時後		
		NaOH 總量 (毫升)	吸水或失水量 (毫升)	玻片上凝結水份	NaOH 總量 (毫升)	吸水或失水量 (毫升)	玻片上凝結水份	NaOH 總量 (毫升)	吸水或失水量 (毫升)	玻片上凝結水份	NaOH 總量 (毫升)	吸水或失水量 (毫升)	玻片上凝結水份
2%	4.9	4.2	-0.7	大量	4.0	-0.9	極大量	3.9	-1.0	大量	4.2	-0.7	大量
4%	2.8	2.7	-0.1	中等量	2.9	+0.1	中等量	2.6	-0.2	中等量	3.3	+0.5	中等量
6%	1.6	2.3	+0.7	極微	2.4	+0.8	極微	2.4	+0.8	極微	2.9	+1.3	極微
8%	1.2	2.3	+1.1	無	3.0	+1.7	極微	2.1	+0.9	無	3.4	+2.2	極微
10%	1.0	1.8	+0.8	無	3.0	+2.0	無	1.7	+0.7	無	3.5	+2.5	極微

## 乙. 平皿空間內焦性沒食子酸最適宜量的確定

如上所述關於焦性沒食子酸的用量, 各文獻殊不一致。在確定 NaOH 之濃度與用量時, 曾將其用量暫時固定為 0.65 克。這一用量顯然地雖可以造成使破傷風梭狀芽孢

表 3 焦性沒食子酸最適宜量之確定

焦性沒食子酸之量 (克)	4% NaOH 使用量 (毫升)	生長情形	6% NaOH 使用量 (毫升)	生長情形
0.65	2.8	+++	1.6	+++
0.5	1.9	+++	1.25	+++
0.4	1.5	+++	1.0	+++
0.3	1.12	++	0.75	++
0.2	0.75	+	0.5	++
0.1	0.375	-	0.25	+

註: +++ 擴散大, 菌膜厚; ++ 擴散大, 菌膜較薄; + 擴散小, 菌膜薄; - 擴散小, 菌膜甚薄, 生長較差; - 無生長或甚微。

桿菌生長良好的厭氣平皿空間,但如能確定其最適宜的使用量(以3%肝化湯瓊脂為培養基)亦有其實際的意義。

表3代表多次試驗的結果。可見0.4克焦性沒食子酸與6%NaOH,1.0毫升同在時,為最適宜的使用量。

## (二) 硼酸或水化氯醛培養基抑制細菌擴散生長的觀察

含有梭狀芽孢菌屬各菌種的標本中,常有其他菌種混合同在,而其中之若干種則又有顯明的擴散性生長。現行培養方法是將標本之一部分先行加溫(如75°C),以殺死不產芽孢的菌種如普通變形桿菌,以易于分離梭狀芽孢桿菌。但如產氣莢膜桿菌,即不易形成芽孢;而且特別是在臨床標本中,致病性的梭狀芽孢桿菌,常不易形成芽孢,其經受較高溫度的抵抗力亦較弱。(本文之另一部分證明在加熱殺菌後獲得較少菌種的試驗中,可說明此點)如標本不加溫,則分離純種的過程可能遇見重重困難。在使用6%的瓊脂培養基時,雖有限制細菌擴散性生長的作用,但其製備過程殊不方便。如所周知,硼酸或水化氯醛有抑制許多喜氣性菌種擴散性生長的作用。本試驗企圖觀察這兩種藥品對於主要的幾種梭狀芽孢桿菌的作用情形。

## 材料與方法

1. 菌種 共使用9種,其中5種屬於梭狀芽孢桿菌屬中常見的菌種。其餘4種為喜氣性菌種,其中一部分有擴散生長的特性,另一部分取其為代表菌種,但多少都屬於標本中較易於發現的菌種(各菌種名稱見表4)。

試驗時每次所使用的接種物:(1)厭氣性菌種:先接種於煮肉基中,孵育於37°C,經18小時,以一鉗環接種培養基。(2)喜氣性菌種:先接種於5毫升肝化湯中,孵育於37°C,經18小時,以一鉗環接種培養基。

### 2. 培養基

(1) 硼酸肝化湯瓊脂。溶化的3%肝化湯瓊脂,加入一定量的藥用硼酸粉,使其最後濃度為0.05%,0.1%,0.15%,0.2%及0.3%。搖動之,使硼酸溶化。均調整其pH為7.6,分裝試管,每管12.0毫升。

(2) 水化氯醛肝化湯瓊脂。因水化氯醛蒸餾水溶液經高壓滅菌時將失去其抑制細菌擴散生長的作用;故將其一定量加入消毒的蒸餾水中,作成5%的溶液,在100°C水浴上加溫10分鐘滅菌(曾使用蔡氏濾器,但此法並不節約),然後將其一定量在無菌操作下,加在盛有12毫升,3%肝化湯瓊脂內,並儘量搖勻。共作成0.025%,0.05%與0.1%水化氯醛三種培養基。

上述兩類的培養基,均分別傾注成平板,並放於37°C下過夜,使其表面乾燥以備接種。

3. 培養方法 所有被試驗的菌種均培養在相同的厭氣環境中。簡言之，即由 6% 氫氧化鈉 1.0 毫升與焦性沒食子酸 0.4 克所造成的厭氣情況下。所有的標本均置於 37°C 下 48 小時，即開啓進行觀察。

## 試 驗

從表 4 及表 5 中可以看出不同濃度的硼酸或水化氯醛，在 3% 肝化湯瓊脂基內抑制各種細菌的擴散情況，顯然是有差別的。

表 4 不同濃度的硼酸對於各菌種擴散生長的抑制情況

菌種名稱	培 養 基 菌落形狀	3% 肝化湯瓊脂平板	3% 肝化湯瓊脂平板所含硼酸濃度		
			0.05%	0.1%	0.15%
普通變形桿菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	— 整個培養基面 薄膜性	— 大片擴散 薄膜性	6—7 微有擴散 單個存在	4—5 微有擴散 單個存在
大腸桿菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	2—3 — 良好	1—2 — 良好	0.5—1 — 較差	0.5 — 較差
金黃色葡萄球菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	0.5—1 — 良好	針尖 — 較差	針尖 — 較差	針尖 — 極差
枯草桿菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	4 放射狀條紋 良好	3—4 同左 良好	3 同左 良好	2 同左 較差
破傷風梭狀芽孢桿菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	— 大片放射狀擴散 良好	4 放射狀條紋 良好	1—2 放射狀條紋 較差	針尖 無擴散 極差
產氣莢膜桿菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	3—4 — 良好	2—3 — 良好	2 — 良好	1 — 良好
腐敗梭狀芽孢桿菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	7—8 放射狀條紋 良好	5—6 同左 良好	4—5 同左 良好	3 同左 良好
薄組織梭狀芽孢桿菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	2 — 良好	1—2 — 良好	1 — 良好	0.5 — 較差
產芽孢梭狀芽孢桿菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	6 放射狀條紋 良好	5 同左 良好	3—4 同左 良好	2 同左 良好

表 5 不同濃度的水化氯醛對於各菌種的抑制情況

菌種名稱	培 養 基 菌落形狀	3% 肝化湯瓊脂平板	3% 肝化湯瓊脂平板所含水化氯醛濃度		
			0.025%	0.05%	0.1%
普通變形桿菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	— 整個培養基面 薄膜性	— 大片擴散 薄膜性	3—4 微有擴散 單個存在	2—3 微有擴散 單個存在
大腸桿菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	2—3 — 良好	2—3 — 良好	2 — 良好	1 — 較整
金黃色葡萄球菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	0.5—1 — 良好	1 — 較差	針尖 — 極差	針尖 — 幾無生長
枯草桿菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	4 放射狀條紋 良好	3—4 同左 良好	2—3 無放射狀條紋 較差	1—2 無放射狀條紋 較差
破傷風梭狀芽孢桿菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	— 大片放射狀擴散 良好	1 放射狀條紋 較差	0.5 無放射狀條紋 極差	針尖 同左 極差
產氣莢膜桿菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	5 — 良好	4—5 — 良好	4 — 良好	2—3 — 良好
腐敗梭狀芽孢桿菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	7—8 放射狀條紋 良好	2—3 同左 良好	2 同左 良好	1—2 同左 較差
溶組織梭狀芽孢桿菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	2 — 良好	2 — 良好	1 — 較差	針尖 — 極差
產芽孢梭狀芽孢桿菌	直徑(毫米) 擴 散 生長情形	6 放射狀條紋 良好	4 同左 良好	2—3 同左 良好	1 放射狀條紋 較差

在用水化氯醛作抑制劑時，其 0.025% 的濃度對於普通變形的生長與擴散不顯重大的影響，可是破傷風梭狀芽孢桿菌已受到相當強大的抑制。至於培養基內含 0.1% 的硼酸時，普通變形桿菌的擴散生長已受到相當的抑制，而破傷風梭狀芽孢桿菌的生長情況則無大的變化。同時，其他已試各菌種的生長情況亦都良好。因此初步認為含 0.1% 硼酸的 3% 肝化湯瓊脂，可能方便分離培養梭狀芽孢桿菌屬中各病原菌的作用。

### (三) Smith 氏高層瓊脂發酵管製作法和使用上的修改

在確定梭狀芽孢桿菌屬各菌種的過程中，發酵試驗為必須步驟之一。但同時既須使用若干種的碳水化合物，又須有一定的厭氣環境（如厭氣缸），以致操作困難，且不便

於隨時觀察。此外，此屬各菌種對於指示劑多少均有還原作用，故一般先在培養基內加入指示劑的辦法亦無實際意義。Smith 氏等曾應用 0.15% 高層瓊脂半固體基作發酵管的基礎。這一方面可以容易地獲得所必需的厭氣環境，另一方面又能隨時觀察發酵的情況。

按 Smith 氏等的試驗方法：在含有 1% Tryptone (胰酶朊) 的腦或心肌浸出液內加入 0.15% 瓊脂，作成高層瓊脂半固體，並以此為基礎，而製備成含糖的 (1%) 發酵管。然後接種所欲檢定的菌種。在檢查發酵情況時，所用的指示劑為溴麝香草酚藍。先用吸管吸取培養液一滴放於潔淨之玻片上，再滴加指示劑測定。如此每天觀察一次，連續執行 5—7 日。如前所述，Smith 氏等的這一發展確實是方便了此屬各菌種發酵反應的觀察。但其所使用的試驗條件與方法，則似有修改的可能：曾觀察到用血化湯代替其所用的培養基基礎即甚滿意。再則溴麝香草酚藍所指示的酸鹼度範圍為 7.6—6.0，而梭狀芽孢桿菌生長過程中帶產生硫化氫等酸性物質，並非真正地分解了某種所加入的碳水化合物；腐敗梭狀芽孢桿菌與產氣莢膜桿菌並不分解甘露醇，但其培養成份與溴麝香草酚藍混合時，即顯酸性反應。如改用溴甲酚紫 (指示酸鹼度範圍為 6.8—5.2) 時，則仍然為鹼性。因此，曾試將 Smith 氏等高層瓊脂之製備與酸鹼反應的檢查作了一定的修改。當然這只是滿足了我們的客觀現實，並不具有與 Smith 氏等的試驗條件與方法作比較的意圖。顯然地，我們並未在試驗中使用原作者所介紹的基礎基作對照。

## 材料與方法

1. 菌種 產氣莢膜桿菌，腐敗梭狀芽孢桿菌，溶組織梭狀芽孢桿菌，破傷風梭狀芽孢桿菌及產芽孢梭狀芽孢桿菌。前三個菌種為衛生部生物製品檢定所所供給，後二個菌種為本試驗室所分離。所有菌種均保存於煮肉基內每 15 日移種一次。

試驗中的接種物：將菌種接種於煮肉基內，在 37°C 下經 18 小時孵育後移種一鉑環於 3% 肝化湯瓊脂平面，在厭氣情況下孵育 48 小時。以鉑針挑取典型菌落少許接種於 0.2% 血化湯高層半固體瓊脂中，經孵育 18 小時，即用以接種各種不同濃度的高層半固體或發酵管。在觀察各種發酵管時，則以瑞特氏吸管吸取所試菌種分別接種於每發酵管中。接種時是將吸管插入培養基底部然後提出。此法因接種量大 (約 1—2 滴)，可保證每管均生長良好；而且較之使用鉑環的操作簡單。

2. 培養基 (1) 高層血化湯半固體。為了確定那一種濃度的瓊脂半固體基更適宜於發酵試驗，用血化湯作基礎，製備了 0.05%，0.1%，0.15% 及 0.2% 的高層半固體基，其酸鹼反應均為 pH 7.4。各半固體均分裝於 10 × 100 毫米試管中，每管 3 毫升，經高壓消毒後備用。(2) 發酵管。在無菌操作的情況下，以不同濃度高層瓊脂半固體為基礎，當其甚熱時分別滴加 10% 各種碳水化合物的無菌蒸餾水溶液於其內，搖勻後，



分裝於 10 × 100 毫米試管內，每管 3 毫升，放 37°C 過夜，無菌時即合用。

3. 指示劑 0.04% 溴麝香草酚藍水溶液（柯氏實驗診斷技術全書第五版所配製）。

溴甲酚紫試紙。將濾紙剪成 10 × 1.5 厘米之紙條，浸入用 1.6% 溴甲酚紫酒精溶液作成的  $\frac{1}{50}$ ， $\frac{1}{100}$  及  $\frac{1}{200}$  稀釋的水溶液內，待其濕透後取出，烘乾備用。

## 試 驗

甲. 梭狀芽孢桿菌屬各菌種在不同濃度的高層瓊脂半固體中生長情況的觀察。

在試驗的最初，曾照原作者所介紹，0.15% 高層瓊脂半固體培養接種所用菌種，並照其辦法用 24 小時的培養 0.5 毫升作每一種培養基的接種物。但隨即發現此一接種量，就所進行的試驗來說，似覺太大，而不便於觀察瓊脂濃度對於生長情況的影響。經改用二鉑環為接種量後，此一困難即被解決。而且在確定了 0.2% 高層瓊脂半固體可以保證試驗菌種的良好生長之後，即用以培養接種用的菌種。表 6 可代表數次試驗後的情況。

表 6 不同濃度高層瓊脂半固體基中細菌生長的情況 (48 小時後)

瓊脂濃度 \ 菌種	破傷風梭狀芽孢桿菌	產氣莢膜菌	腐敗梭狀芽孢桿菌	溶組織梭狀芽孢桿菌	產芽孢梭狀芽孢桿菌
0	+	+	+	++	++
0.05%	++	++	++	+++	+++
0.1%	++	+++	+++	++++	++++
0.15%	+++	+++	+++	++++	++++
0.2%	++++	++++	++++	++++	++++

對照血化湯：“+”微混濁；“++”較混濁；“+++”混濁；“++++”極混濁。

乙. 發酵反應的觀察

在試驗的早期階段裏，曾以 0.1%，0.15% 及 0.2% 高層瓊脂半固體作基礎，製備成含 7 種碳水化合物（葡萄糖、乳糖、麥芽糖、蔗糖、甘露醇、柳苷及甘油）的發酵管，共 3 種各 5 組。每組各管分別如前法種入所述菌種，經孵育後，照 Smith 氏等的方法以溴麝香草酚藍檢視其酸鹼反應。在觀察過程中，發現了如下的幾個問題：(1) 用瑞特氏吸管吸取培養物作發酵反應觀察，每一組即需 7 支；而且連續觀察數日，對於每管的培養基來說，每次所取出之量是相當多的；(2) 玻片之清潔情形相當重要，不太清潔的玻片，常使指示劑的顏色不鮮明；(3) 溴麝香草酚藍在酸鹼反應的指示上，特別在早期，常令人困惑。因此即以鉑環替代吸管，並試以溴甲酚紫為指示劑。

試驗結果證明：1.6% 溴甲酚紫酒精溶液經蒸餾水稀釋 50 倍所染成的濾紙條，有指示所試各菌種對 7 種碳水化合物發酵反應的作用，因其所顯示的顏色較為鮮明（與

$\frac{1}{100}$ 、 $\frac{1}{200}$  倍稀釋液染成的紙條相比)。又在用鉑環挑取每管培養物之前後，均須通過火焰消毒。由於微量灰份之存留，以致有時影響了正確反應的出現。此種情況，特別是在玻片上用鉑環混合時較之在試紙上塗抹時易於發生。但若將培養物輕放於試紙上，則可能避免此一缺點。必要時亦可將消毒鉑環在蒸餾水內清洗經燒灼後再使用。

經數次的試驗與觀察，認為以 0.1% 與 0.15% 高層瓊脂半固體基為基礎所製成的發酵管，對於糖分解組的梭狀芽孢桿菌其生長不如蛋白分解組的梭狀芽孢桿菌。但若以 2% 高層瓊脂半固體為基礎，所製成的發酵管在效用則可以比擬。

所試各菌種在 0.2% 高層瓊脂半固體發酵管中，經孵育 72 小時用溴甲酚紫試紙即可將反應確定。

#### (四) 凝固蛋白基與凝固血清基的製備及其效用的觀察

Smith 氏等用 8% 蛋粉與腦或心肌浸出液作成凝固蛋白基以檢查梭狀芽孢桿菌屬各菌種蛋白液化的情況。液化蛋白的性能，在此屬各菌種的鑑別上為必須資料之一種。因此曾試以攪伴均勻的完全雞蛋成份替代蛋粉，並以血化湯為基礎作成凝固雞蛋基以觀察此屬細菌的蛋白液化作用。但因在高壓滅菌之後，雞蛋成份多附着於管壁，致使觀察細菌的生長時發生困難。最初認為，就容量而言，8 與 92 之比可能過大。以後雖將雞蛋成份逐漸減少到 1:100，但經高壓後，雞蛋成份仍形成若干絮狀物及微粒，致使液體部分仍顯一定的混濁。後改以蛋白代替全蛋成份。此時培養基的液體成份雖較澄明，但顯現細菌生長並不旺盛。根據梭狀芽孢桿菌屬各菌種在以血化湯製成的 0.2% 高層瓊脂半固體中生長良好的資料，即試圖以此為基礎而製備更方便於達到檢查目的的培养基。

## 材料與方法

1. 菌種 用上述試驗中所使用的 5 種梭狀芽孢桿菌。試驗用的接種物為培養在 0.2% 高層瓊脂半固體內經 18 小時的菌種。

2. 培養基 (1) 凝固蛋白基。以 0.2% 瓊脂血化湯 (pH 7.4) 為基礎，分裝於 10 × 100 毫米小試管中，每管 3 毫升；將雞蛋放與冷水中。徐徐加熱，經煮沸 10 分鐘後，傾去沸水，而換以冷水。當其不燙手後，取出，除去外殼，並剝去凝固蛋白層。用小刀切成約 3.0 立方厘米的小方塊。所切成的蛋白小方塊即放於蒸餾水內。當其達到所需數量後，則以鑷子夾取分放於盛有高層瓊脂的試管內，每管一塊，經高壓滅菌後備用。(2) 凝固血清基。將人血清或牛血清放平皿之蓋內，在 100°C 水浴上使其凝固。待冷後，將其剝下，亦如上法將其作成了立方厘米的小方塊，其他製備過程同凝固蛋白基。

消毒終了時，所放入的蛋白塊或凝固血清塊均沉於管底，高層十分澄清。

## 試 驗

每種細菌均分別以無菌瑞特氏吸管移種於凝固蛋白基及凝固血清基內，吸管直插至底部，種入量約1—2滴。每孵育24小時後觀察一次，各菌種的生長均甚旺盛。在孵育72小時後，見溶組織梭狀芽孢桿菌與產芽孢梭狀芽孢桿菌生長的試管內，蛋白塊及血清塊均變小。以鉗針輕刺之，即破裂成碎塊。至於有破傷風梭狀芽孢桿菌，腐敗梭狀芽孢桿菌及產氣莢膜桿菌生長的各管、蛋白塊及血清塊的大小無顯明改變；以鉗針刺之時，仍保有韌性。

## 討 論

梭狀芽孢桿菌屬中各病原菌的傳染，在日常生活中雖不多見，但其臨床症狀則相當重篤；至於非常時期，其傳染的可能性更將增多。當然在預防與醫療上，目前已有可觀的成就。不過我們在臨床檢驗工作中尚感覺到處理這一屬病原菌有關標本時不易獲得滿意的結果；在準備教學上所需的實驗時，把握亦不大。因此，曾就所能得到之文獻進行綜合，並企圖擬具一個比較可行的培養技術。在初步獲得上述結果之後，曾用以分離泥土、馬糞及個別的臨床標本，並分離了破傷風梭狀芽孢桿菌、產氣莢膜桿菌、第三桿菌等。不過例證不多，尚不足以考驗是否試驗室中的觀察結果即足以用於實際。理論與技術上的缺點亦不在少數。因此先草擬成文，以求指正。此外，在試驗過程中亦發現一些問題，茲一併提出。

在取泥土與馬糞為標本時，曾以加溫75°C半小時的方法以殺死不產生芽孢的細菌，但發現3%肝化湯瓊脂培養中厭氣菌菌種之種類少於未經如此處理者。經降低至56°C半小時，其結果並無多少改善。因此，以後在檢查幾份泥土與馬糞的標本以及臨床標本時，即完全放棄了加溫這一過程。並以含有0.1%硼酸基與普通瓊脂對照接種，見到在此兩種環境裏培養所生長的細菌無顯然的差別。故認為在梭狀芽孢桿菌屬的分離培養時，加溫一法似乎是害多益少的。

在使用藥品抑制細菌的擴散生長方面；以0.1%硼酸的培養基優於水化氯醛，但經過硼酸處理後的細菌，其產毒力是否有改變，則未經試驗。至於其他藥品如萬分之一十二烷基硫酸鈉，因無此藥品未作比較。

水化氯醛對於梭狀芽孢桿菌屬中各致病菌種顯有不同程度的抑制作用，是否可以利用其不同的濃度放於培養基內以補助菌種的鑑定，殊為一有意義的問題。但上述試驗中，因缺少水腫梭狀芽孢桿菌及鳴疽梭狀芽孢桿菌等菌種，故此問題的可能性如何，有待今後的努力。這裏也應當提到，在使用此種藥品作抑制擴散生長的試驗中，未將梭狀芽孢桿菌屬各主要的病原菌完全檢查過，確是一個大的缺點。

在觀察已知各菌種的液化凝固雞蛋白和血清時，見到溶組織梭狀芽孢桿菌與產芽孢梭狀芽孢桿菌對二者均有作用，而其他各菌種對二者均無作用。故似乎凝固雞蛋白與血清是可以互相代替的。至於真正的液化與否，應以凝塊的變小為主要的憑證。而凝塊經鉑針穿刺時是否碎裂，為輔助認識方法之一。因據 Topley 氏等破傷風梭狀芽孢桿菌並不真正地溶解凝固雞蛋白或血清，僅使變軟，按上述方法培養後，此種凝塊不變小，也不發生碎裂。

## 結 論

(一) 在造成平皿空間的厭氣環境時，6% NaOH 1.0 毫升與 0.4 克焦性沒食子酸是最適當的使用量。如改用小平皿為盛器時，可避免藥物溶液飛濺的缺點，使標本不致於受到不必要的損失。

(二) 在 3% 瓊脂肝化湯中加入硼酸 (0.1%) 或水化氯醛 (0.05%) 時，有抑制所試各菌種擴散生長的作用，方便了純種的分離。在這兩種藥物中，初步認為硼酸優於水化氯醛。

(三) 用 0.2% 高層瓊脂血化湯半固體為基礎所製成的 7 種碳水化合物發酵管。在已試的 5 種梭狀芽孢桿菌生長後，用鉑環挑取其培養在溴甲酚紫試紙上檢查，72 小時內，即可確定其發酵反應。

(四) 以此種高層瓊脂半固體為基礎，放入小塊的凝固雞蛋白或血清，可以順利地觀察到已試的 5 種菌種對於此種凝塊的液化情形。

## 參 考 文 獻

- [1] Kolmer, J. A. *et al.*: Approved Laboratory Technic, 5th Edition.
- [2] Rosenthal, L.: "Chromium-sulfuric acid" method for anaerobic cultures. *J. of Bact.*, 34: 317—320. 1937.
- [3] Browning, C. H. *et al.*: Text book of Bacteriology, 11th Edition, 1949.
- [4] 蔡宏道等：實用臨床檢驗學下冊，上海宏文書局出版，1955。
- [5] Jordan, E. O. *et al.*: Text book of Bacteriology, 14 Edition, 1947.
- [6] 北京醫學院細菌學教研組、高級師資訓練班合譯：醫用微生物學及其技術綱要。人民衛生出版社，1955。
- [7] 同 [4]。
- [8] Smith, L. D. *et al.*: The anaerobic bacterial flora of clostridial Myositis. *J. of Bact.*, 51: 271—279. 1946.

## SOME SUGGESTIONS ON THE CULTURING TECHNICS FOR CLOSTRIDIA

HU NEI-FUNG

*Department of Bacteriology, Kweiyang Medical College*

Both in clinical bacteriological work and for the students' practice the culturing methods for clostridia used at present are often not satisfactory. We therefore made efforts to modify certain technical procedures particularly in regard to those used in the isolation and identification of this of bacteria. After preliminary trials, we found certain useful modifications, which are offered here for consideration.

1. In the literature, there are various methods for obtaining anaerobic environment, necessary for the isolation of species of Clostridia. The anaerobic Petri dish technic advocated by Wang I-min has been found simple and practical. In his original paper Wang used 1.0 gm. of pyrogallic acid and 1.0 cc. of a 10% solution of sodium hydroxide to produce the required anaerobic space. As to the quantities of the chemicals needed, there was, however no uniform information. Besides this, it was found that in the anaerobic spaces so produced the cultures were not so satisfactory as expected.

For these reasons, experiment of the anaerobic Petri dish method with special attention for studying the optimal quantities of chemicals and moisture were carried out. According to our experimental results, 0.4 gm. of the pyrogallic acid and 1.0 cc. of a 6% of sodium hydroxide added to the space enclosed in the bottom dish, which contained 12 cc. of a pH 7.6 3% liver digest agar, and sealed on a glass plate, produced an anaerobic environment, which was sufficient for a good growth of the *Clostridium tetani*. Under such a condition, there was also produced, the least amount of moisture.

The original paper suggested the use of gauze to absorb the above chemicals, but it has been found that in so doing the presence of the negative pressure in the dish often caused, during the opening of the dish, the formation splashing droplets, which frequently spoiled the culture. In our experiments, small Petri dishes of 6 cm. diameter were therefore used to hold the solution and this did not only prevent the formation of droplets, but also keep the set up clean.

2. In the clinical specimens obtained from infected wounds, there may be the presence of organisms with the nature of spreading growth, such as *Proteus vulgaris* and *Clostridium tetani*. This kind of growth is very unfavorable for the isolation of a pure culture. To overcome this difficulty, we tried to incorporate solution of boric acid or chloral hydrate at various concentrations into the pH 7.63% liver digest agar. It was found that a final dilution of 0.1% boric acid or 0.05% chloral hydrate gave the most favorable inhibitory action. Between

these two substances, the former was found more preferable, because it insures not only a better growth of the *Clostridium tetani*, but also a good growth for the other species of this genus.

3. Sugar fermentation and protein liquification are two biological tests often used for the identification of the species of Clostridia. Smith recommended a high column of 0.15% brain and heart infusion broth agar with 1% tryptone as the medium base of the sugar test and an 8% egg powder in brain and heart broth for protein liquification. We considered that this medium base was rather costly and was not a medium base available in most of the small laboratories. Besides, the cloudiness of the egg powder in brain and heart infusion broth was a disadvantage in the detection of the culture. By our experimentation, it was found that a pH 7.4 of 0.2% peptic blood digest agar in high columns were a good substitute for the medium base of the sugar test, because it was observed that in such a medium *Cl. tetani*, *Cl. welchii*, *Cl. septicum*, *Cl. sporogenus*, and *Cl. histolyticum* grew satisfactorily.

We tried to put a small cube of coagulated egg white or human serum into each of the high column of the 0.2% peptic digest agar as a substitute for the Smith's egg in brain and heart infusion broth. After autoclaving, we inoculated the 5 species of Clostridia as mentioned above and it was observed, within 72 hours of incubation, that the species which possess the activities of protein liquification, exhibited the ability of liquifying the protein cubes.

Smith used the solution of bromthymol blue on a glass plate to detect the pH changes in the fermentation tubes. In our opinion, this indicator was somewhat too "sensitive", owing to the fact that some species of Clostridia would produce certain substances such as hydrogen sulfide which might render the medium slightly acidic, especially in the early stage of incubation. This slight shifting of acidity might be mistaken for the splitting of the sugars. By trial we finally found that a good substitute for the bromthymol blue is a strip of filter paper permeated with bromcresol purple. This indicator paper was made by wetting an ordinary filter paper with a 1.6% bromcresol purple which had been diluted 50 times with 95% ethanol and dried in the incubator. We inoculated the 5 species of Clostridia into the fermentation tubes consisted of 7 kinds of sugars, and dipped loopful of the contents of the tubes separately on our indicator paper every day. In so doing, it enabled us to determine definitely the pH changes of the 5 known organisms within 72 hours during incubation.

We adapted these modified technics to examine a few specimens from clinic and soil with satisfactory results.