

痢疾桿菌分離培養基的研究

II. 牛胆汁透析物培基的研究*

鄭翼宗 羣玉崑

(北京醫學院微生物學教研組)

在報告 I 中著者發現牛膽汁透析物(暫稱透析膽鹽)培基，在目前情況是值得推廣利用的一種痢疾分離培養基。為了肯定和提高該培基的利用價值，著者對其基礎培基內各因素從各方面加以適當的改良，並且用多數新分離各型痢疾桿菌及大腸桿菌等和 SS 培基及遠藤培基作廣泛的比較，結果得到一種更適合於實際應用的痢疾分離培養基。茲將其概略報告於下。

實驗材料及方法

1. 供試菌：

(1) 本教研組保存菌株：

大腸桿菌：大北、大_s、大_F 等 3 株

痢疾桿菌：志賀氏菌；協、錢、志、S 等 4 株

金黃色葡萄球菌：St、St 抗(抗磺胺菌株)等 2 株

(2) 新分離菌株：

大腸桿菌：大₁、大₂、大₃……大₁₀ 等 10 株。(1956 年北京市兒童醫院細菌化驗室從該院痢疾病人糞便分離的)

痢疾桿菌：(1954 年及 1955 年中央衛生研究院微生物學系在北京分離的)

志賀氏菌：105, 331……等 15 株

史氏菌：173, 288……等 6 株

福氏菌：17, 20……等 35 株

宋內氏菌：134, 145……等 10 株

共 66 株。

* 1956 年 10 月 13 日收到。

2. 接種菌量：

牛心浸湯培養 18 小時的菌液—白金耳（大腸菌有時增量到 0.3cc）稀釋於 3cc 生理食鹽水內，取一白金耳塗於平皿。

3. 牛胆汁透析物及膽鹽第 3 號

和報告 I 相同。

實驗結果

（一）基礎培基的改良

1. 各種鹽類的問題

關於基礎培基中鹽類所起的作用，Leifson^[1]已經作了基本的研究。最近坂崎氏等^[2]對各種鹽類量的關係，也作了詳細的試驗。在鹽類中枸櫞酸鈉的選擇作用是比較重要的，關於這點從 Bangxang 等氏^[3]的報告以及著者等^[4]關於痢疾糞便標本保存液的研究也可以看得出來。著者參考前人的工作成就，把枸櫞酸鈉儘可能提高到 1.5%，而硫酸鈉則減少到 0.5%。經過試驗證明比枸櫞酸鈉 0.85% 及硫酸鈉 0.85% 者為合適。此外因枸櫞酸鐵不容易溶解，就用枸櫞酸鐵胺代替，同時為了增加對大腸菌的抑制作用再加上第二磷酸鈉至 0.1%。

2. 牛心浸液的應用

著者和陸氏^[5]發現新分離各型痢疾桿菌株的營養要求甚為複雜，在某些菌株（尤其是志賀氏菌），其要求是特別嚴格的。對這些營養要求複雜而嚴格的菌株，以 Bacto-SS 培基中所含的肉膏及蛋白胨的質及量來做為營養源是很不夠的。關於這方面有上野氏^[6]、坂崎氏等^[7]的報告。另一方面 Leifson^[1]已經注意到枸櫞酸鹽對大腸菌的抑制

表 1 牛心浸液、牛肉浸液及肉膏液的比較（肉膏：日本三共製藥廠出品）

（18 小時培養大腸菌 0.3cc 稀釋於 3cc 食鹽水，痢疾桿菌 1 白金耳

稀釋於 5cc 食鹽水內，取一白金耳塗於平皿）

基礎液	菌株 胆鹽培基	大腸菌	志賀氏菌				宋內氏菌 1520
			Y 72	Y 73	540	1034	
牛心浸液	S S 培基	250	900	500	3000	200	4000
	透析胆鹽培基	500	1200	500	4000	300	5000
牛肉浸液	S S 培基	200	300	200	3000	200	3000
	透析胆鹽培基	500	300	250	3000	200	4000
肉膏液	S S 培基	4000	500	450	4000	200	3000
	透析胆鹽培基	6000	1000	500	5000	300	3000

註：SS 培基：按 Bacto SS 培基的鹽類成分加膽鹽第 3 號；蛋白胨和鹽類和報告 I 相同。

透析胆鹽培基：按改良基礎培基的鹽類成分加牛膽汁透析物，菌落數全部以數字表示。

作用。在牛肉浸液培基中比在肉膏或蛋白胨培基中大。鑑於上面兩點，著者利用牛心浸液為基礎，和牛肉浸湯及肉膏湯培基作了比較，其結果發現在牛心浸液培基中痢疾桿菌發育的特別好，菌落大，而大腸菌則受到很好的抑制。見表 1。

從表 1 可以看見牛心浸液對大腸菌的抑制作用和牛肉浸液是一樣的，但對痢疾菌的發育比牛肉浸液好，菌落也大。肉膏液雖然對痢疾菌的發育比牛肉浸液好一些，但對大腸菌的抑制力却相差很多。

(二) 透析胆鹽的濃度問題

為了平均各批牛膽汁質量的不同，著者儘可能用大量的牛膽汁作透析，經 3 次透析後把透析物混合。經多次比較結果透析胆鹽的含量以 1.0% — 1.2% 為最合適的。0.85% 時對大腸菌的抑制力就差一點，到 0.75% 以下時抑制作用就顯然地低降。反之比 1.2% 越高，則對痢疾菌的生長影響越多。雖然如此，為了安全起見我們認為把膽汁透析物以已知菌株作一次初步試驗來決定其用量還是比較穩當的。

(三) 關於球菌類及變形桿菌的問題

在實地工作中，球菌類及變形桿菌也是妨礙分離病原菌的重要因素之一。對球菌類特別是某些菌株，例如 St 抗菌株（抗礦胺性葡萄菌株）的抑制作用，透析胆鹽比之胆鹽第 3 號是稍微差一些。但是有煌綠的存在時，對球菌的抑制幾乎是不成問題了。至於對變形桿菌的作用，透析胆鹽培基和 SS 培基是完全一樣的。

(四) 牛膽汁透析物培基的製備法

總結上面的成績，著者決定本培養基的組成如下：牛心浸液（500 克牛心，除油，絞碎，浸於 1000 cc 自來水中一夜，煮沸 5 分鐘，過濾）1000 cc，蛋白胨 7.5 克， Na_2HPO_4 （無水）1 克，瓊脂 18 克，枸櫞酸鈉 $2\text{H}_2\text{O}$ 15 克，硫代硫酸鈉 $5\text{H}_2\text{O}$ 5 克，枸櫞酸鐵胺 1 克，乳糖 15 克，牛膽汁透析物 10 克，中性紅 0.037 克，煌綠 0.33 毫克；pH 7.2。

為了實地工作方便起見，著者按照 Hynes^[7]、Bader^[8] 等的辦法擬定本培基的製法如下。其原則是：(1) 儘可能不加熱；(2) 隨時可以簡便地製備出必要的最小量，以免時間及材料的浪費；(3) 這樣經常就可以利用新鮮的平皿培基。

製備法

1. 牛心浸湯瓊脂：牛心浸液 1000 cc，蛋白胨 7.5 克， Na_2HPO_4 （無水）1 克，瓊脂 18 克，煮沸溶解後，修正 pH (7.2)，分裝（每瓶含 100 cc）滅菌後，可以長期保存於冰箱。

2. 鹽類混合液：枸櫞酸鈉 $2\text{H}_2\text{O}$ 30 克（國貨含 5% H_2O 者應該用 36 克），硫代硫酸鈉 $5\text{H}_2\text{O}$ 10 克，枸櫞酸鐵胺 2 克；以上以熱的滅菌蒸餾水溶解為 100 cc，不需要滅菌，可以長期保存於冰箱。

3. 平皿的製備：上述牛心浸湯瓊脂 100 cc 加溫溶解，加上乳糖 1.5 克，牛膽汁透

析物 1.0 克；加溫溶解後再加入鹽類混合液 5cc, 0.5% 中性紅水溶液 0.75cc, 煙綠水溶液 (33 毫克溶於 100cc 蒸餾水) 0.1cc。pH 不需要再修正 (還是 7.2)，分注 20cc 於平皿。把上蓋打開一部分，待凝固後，放在 37°C 暖箱 30 分鐘，最多至 1 小時，或室溫 2—3 小時，使平皿上面蒸乾。平皿製備後保存於室溫並爭取在 48 小時以內利用。

(五) 本培基與 SS 培基及遠藤培基的比較

1. 對大腸桿菌的抑制作用

(1) 對不同菌量的抑制作用

從表 2 可以看出透析胆鹽培基的抑制力和 SS 培基是相差很少的。不加透析胆鹽的基礎培基的抑制大腸菌作用雖然不大，但比遠藤培基則大 2 至 3 倍。

表 2 對不同菌量的抑制作用

菌量	培基	大腸菌株		
		大北	大S	大F
一 白 金 耳	SS 培基	0	0	0
	透析胆鹽培基	0—25	0	0—30
	基礎培基	3000	3000	5000
	遠藤培基	10,000	5000	10,000
0.1cc	SS 培基	60	0	30
	透析胆鹽培基	150	0	75
0.3cc	SS 培基	200	6	80
	透析胆鹽培基	500	30	200

註：大腸菌 18 小時牛心湯培養不同量稀釋於 3cc 食鹽水內取 1 白金耳，菌落數以實數表示。

(2) 對不同菌株的抑制作用

在北京兒童醫院細菌室從痢疾病人糞便新分離的菌株 10 株和本教研組保存菌株大北比較的結果如表 3。

表 3

培基	大腸菌株										
	大北	大 ₁	大 ₃	大 ₄	大 ₅	大 ₆	大 ₈	大 ₁	大 ₄	大 ₆	
SS 培基	200	12	0	10	400	2	100	5	0	20	100
透析胆鹽培基	500	50	0	100	700	25	300	10	0	30	200
遠藤培基	平皿上全面是厚的菌苔，不能算出菌落數。										

註：18 小時牛心湯培養 0.3cc 稀釋於 3cc 食鹽水內取 1 白金耳，菌落數以實數表示。

從表 3 可以看出不同菌株的抵抗力有相當的差異，但比之本教研組保存菌株大部大多數都是抵抗力較弱，只有一株較強。但是比之遠藤培基上的無數菌落是有顯著差別的。

總之，從上面結果證明，本培基對大腸菌的抑制作用，無疑的是非常優秀的。雖然比之 SS 培基稍有遜色，但從在遠藤培基上有幾萬的菌落在本培基上只剩下幾百的事實看來，和 SS 培基的差異可以說是很少的。

2. 對各型痢疾桿菌的影響

用多數新分離各型菌株在各種培基上比較其生長情況，結果見表 4、5、6 及 7。

表 4 志賀氏痢疾桿菌的生長情況
(18 小時牛心湯培養 1 白金耳稀釋於 3cc 食鹽水內，取一白金耳塗於平皿)

菌株 培基	新 分 離 菌 株												保 存 菌 株				
	105	331	540	575	715	1034	1077	1126	1139	1315	1612	1682	5467	志	協	錢	S
SS 培基	0	+++	+++	++	+++	200	++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	0	0	0
透析胆鹽培基	0	+++	+++	++	+++	200	++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	300	0	0
鹽培基 改良基礎	100	+++	+++	+++	+++	400	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	300	0	100
基礎培基	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	400	+++
遠藤培基	+++	+++	+++	++	++	200	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	200	+++

註：舊基礎：SS 培基的基礎培基。改良基礎：以牛心浸湯為主的改基礎。

菌落數 1000 以下者以實數表示。++ 2000 左右，+++ 3000 左右，++++ 4000 左右。

表 5 史氏痢疾桿菌的生長情況

菌株 培基	173	288	294	358	504	1120
	+++	+++	++++	++	++++	++++
SS 培基	+++	+++	++++	++	++++	++++
透析胆鹽培基	++++	++++	++++	++++	++++	++++
基礎培基	++++	++++	++++	++++	++++	++++
遠藤培基	++++	++++	++++	++++	++++	++++

註：菌落數 +++ 3000 左右，+++ 4000 左右，++++ 5000 左右。

表 6 福氏痢疾桿菌的生長情況

菌株 培基	17	20	50	171	304	306	311	312	317	318	319	395	407	414	461	484	520
	200	+++	++	+++	+++	200	+	500	0	0	+++	++	++	++	++	++	++
SS 培基	200	+++	++	+++	+++	200	+	500	0	0	+++	++	++	++	++	++	++
透析胆鹽培基	++++	++++	++	++++	++++	600	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
基礎培基	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
遠藤培基	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

菌株 培基	525	539	700	729	739	746	804	811	816	817	1045	1089	1146	1230	1322	1325	1367	1525
S S	+++	30	+	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+
透析胆鹽 基 础 遠 藤	+++	800	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

表 7 宋內氏病桿菌的生長情況

菌株 培基	134	145	386	1349	1355	1384	1414	1455	1520	1534
S S 培基	0	+++	0	200	10	60	10	+++	+++	70
透析胆鹽培基	++	+++	++	++	++	+	++	+++	+++	500
基礎培基	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
遠藤培基	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

1) 表 4 的實驗結果可以看到基礎培基改良後 (1) 牛膽汁透析物培基對志賀氏菌的生長顯然有所改進，特別是 105，“S”等在舊的基礎培基上不能生長的菌株也有一部分生長。(2) 絶大部分的新分離菌株，生長和在遠藤培基上一樣，只有一株 105 是對膽鹽特別敏感的。(3) 在保存菌株中“錢”在任何培基中都生長不好，“協”和“S”對膽鹽也都是敏感的。(4) 在對膽鹽的抵抗力上，新分離菌株和保存菌株之間似乎有顯然的不同。

2) 從表 5 可以看出，所有史氏菌株在透析胆鹽培基上生長比在 SS 培基上好，而且完全和在遠藤培基上一樣。

3) 從表 6 可以看出大部分福氏桿菌在透析胆鹽培基上生長很好；不只彌補了 SS 培基的缺點而且有時還勝過遠藤培基。但還有一部分菌株對胆鹽是敏感的，可是比之志賀氏菌的敏感程度是比較輕的。

4) 從表 7 可以看到宋內氏桿菌大部分對胆鹽是比較敏感的。但透析胆鹽培基的抑制力比之 SS 培基顯然是低的多。

5) 在以上各表(4、5、6、7)的試驗中，不加透析胆鹽的基礎培基比之遠藤培基對所有各型菌株都是影響很少的，而且在表 1 我們已經看到其對大腸菌的抑制遠勝過遠藤培基，因此為了使對胆鹽敏感的一部分菌株能夠生長，基礎培基是完全可以代替遠藤培基的。

(六) 大腸桿菌和痢疾桿菌混合液的分離試驗

在牛心湯中培養 18 小時的大腸桿菌 0.3cc 及痢疾桿菌 1 白金耳混合於 3cc 生理食鹽水內，取出 1 白金耳塗在平皿上。所得結果和上面分開單獨試驗時完全一樣，見表 8。

表8 混合菌液生長情形

菌液菌落 培基	大腸菌加志賀氏菌		大腸菌加福氏菌	
	大北	志 1612	大北	福 312
SS 培基	250	2000	250	500
透析胆鹽培基	500	2000	500	3000

遠藤培基上菌落不能分開，無法分離。

(七) 人工便的分離試驗

健康人糞便姆指頭大一塊和痢疾桿菌的 18 小時牛心湯培養物 1 白金耳混合於 3cc 生理食鹽水中，取一白金耳塗於平皿上。試驗結果和上面完全一樣，見表 9。

表9 人工便生長情形

菌落 培基	糞便加志賀氏菌		糞便加福氏菌	
	大腸菌	志 1612	大腸菌	福 312
SS 培基	500	2000	500	500
透析胆鹽培基	1000	2000	1000	3000

遠藤培基上菌落不能分開，無法分離。

(八) 病人糞便的實地工作

鑑於上述實驗室內成績，1954 年夏天在北京第一兒童醫院細菌室經黃文哲大夫作初步臨床試驗（共 72 例）後，1955 年夏方、都、黃及鄭等人^[9]於北京兒童醫院大量進行病人糞便的痢疾桿菌分離工作。因胆鹽第 3 號不能大量供應，祇得單和遠藤培基作比較，總計檢驗 563 件各種急性腸道功能紊亂的兒童患者糞便標本的結果，在胆汁透析物培基上檢出痢疾桿菌者 88 件，而在遠藤培基上陽性者 59 件，胆汁透析物培基較遠藤培基是顯著為優的 ($X^2 = 6.58$, P 值小於 0.02, 大於 0.01)。而且胆汁透析物培基在患者前採取的典型痢疾糞便的陽性率可以達到 57.7%，關於其詳細結果將另有報告。

(九) 中性紅的問題

以中性紅為指示劑時，菌落的顏色在大腸菌是紅色而痢疾桿菌是微黃色或無色的。但用牛心浸液或牛肉浸液為基礎時，在 SS 培基及透析胆鹽培基上某些菌株（我們所試驗的痢疾桿菌 66 株中 5 株即志賀氏 Y72, Y73, 福氏 17, 317, 318 等）却呈薔薇紅色。最近 Бубес 氏^[10]的報告也提到同一的觀察。但是若以肉膏湯為基礎時這些菌株的菌落也是無色或呈微黃色的。這個現象的原因可能有兩個因素，第一個因素是牛心浸液或牛肉浸液含有微量的葡萄糖，而肉膏却是不含糖的。第二個因素是這些菌株在代謝過程中產鹼力量不夠。因此絕大多數的痢疾桿菌雖然因牛心浸液或牛肉浸液中微量的葡萄糖而產生少量的酸，但這些酸很快就被細菌代謝產物的鹼性物質中和。而少數特殊痢疾桿菌則因其產鹼力不夠就不能把酸中和，因而呈紅色了。著者^[10]在關於 Russel

雙糖培基作用機轉的研究中已經報告某些痢疾桿菌產鹼力是比較弱的。

爲了解決這個問題，著者從指示劑變色域的關係起見決定以溴甲酚紫 (B. C. P.) 代替中性紅 (B. C. P. 的製法：0.1 克 B. C. P. 加入 7cc N/20 NaOH，在瑪瑙乳鉢內，邊加邊磨，完全溶解後再加蒸餾水 43cc，總量爲 50cc 即成爲 0.2%) 用量是每 100cc 培基加 0.2% B. C. P. 2cc 以 B. C. P. 為指示劑時大腸菌的菌落呈黃色，痢疾菌菌落呈紫色。因 B. C. P. 的變色域是 5.2 (黃色) 到 6.8 (紫色) 所以假如某些痢疾桿菌的產鹼力不夠而呈弱酸性時 (最低也在 pH 6.6 左右)，其菌落仍然還是紫色。這樣 Y72, Y73 等在中性紅爲指示劑時不能和大腸菌鑑別的菌株也就容易分別出來了。B. C. P. 在透析胆鹽培基上對痢疾桿菌也沒有特殊的抑制作用。

以 Y72 等菌株和大腸菌或健康人糞便混合後試驗其分離效果時都得到很滿意的結果。

討 論

爲了提高透析胆鹽培基的效用，著者在基礎培基內各因素加以改良。其中牛心浸液的應用是特別有意義的。痢疾桿菌因之受到生長的促進，而對大腸桿菌的抑制作用則得到增強。對痢疾桿菌生長的促進，無疑地是因其營養料豐富之故，但其詳細因素還有待於將來的研究。至於對大腸菌的抑制作用在牛心浸液及牛肉浸液中比之肉膏中較大的原因何在，更值得進一步的深入研究。

經過基礎培基的改良，透析胆鹽培基比 SS 培基優越的事實，雖然因胆鹽第 3 號不易買到不能在實地工作上作充分比較，但從本實驗各表中很明顯地可以看得出來。

各型痢疾桿菌中有些菌株對胆鹽還是相當敏感的。爲了培養出這些菌株，可以平行應用不加透析胆鹽的基礎培基和透析胆鹽培基平行應用，利用前者可能比遠藤培基是更好的。

用中性紅爲指示劑時有少數痢疾桿菌菌落可能變紅的事實在我們的新分離菌株中也可以看到。

這些菌株在牛肉湯爲基礎的 SS 培基也是一樣變紅的。Byбес 氏^[10]在他的胆汁培基中也觀察到同樣的現象。著者以 B. C. P. 代替中性紅完全解決了這個問題。

透析胆鹽培基唯一的缺點，可能在於其不能像 SS 培基那樣完全把指示劑 (中性紅或 B. C. P. 等) 集中在菌落上面，因之菌落顏色不十分突出地明顯。但是關於這點很多實地工作同志們都認爲對挑選菌落來講還是沒有特別妨礙的。

結 論

(一) 著者利用牛心浸液並改良鹽類成分，得到良好的基礎培基。

(二) 經過改良的透析胆鹽培基，雖然因材料關係未能在實地工作上作充分比較，

但在多數新分離菌株的實驗證明中，比之 SS 培基是很優秀的。

(三) 本培基比遠藤培基的優點不只在實驗室中，而且已經在實地工作上得到充分的證實。

(四) 為了使少數對膽鹽特別敏感的菌株生長，可以並用基礎培基。

(五) 在本培基中也有少數痢疾菌株在中性紅為指示劑時呈紅色菌落。以溴甲酚紅 (B. C. P.) 代替中性紅就完全解決這個問題。

參 考 文 獻

- [1] Leifson, E.: *J. Path. Bact.* 40: 581, 1935.
- [2] 扳崎、山田：日本細菌學雜誌 8 (1): 75, (2): 199, 1953。
- [3] Bangxang, E. & Eliot, C. P.: *Am. J. Hyg.* 31: Sec. B, 16, 1940.
- [4] 鄭翼宗等：北京醫學院學術討論會報告。1955。
- [5] 鄭翼宗、陸秀芳：北京醫學院學術討論會報告。1955。
- [6] 上野：熊本醫學雜誌 22: 171, 1948。
- [7] Hynes, A.: *J. Path. Bact.* 65: 427, 1949.
- [8] Bader, R. E.: *Z. Hyg. Infektkr.* 131: 157, 1950.
- [9] 方 純、都本榮、黃文哲、鄭翼宗：尚未發表的材料。
- [10] С. Ф. Бубео： *Лабораторное Дело* 2: 23, 1956.
- [11] 鄭翼宗等：台灣醫學會雜誌 7: 45, 1949。

STUDIES OF NEW CULTURE MEDIA FOR THE ISOLATION OF *SHIGELLA* GROUP

II. FURTHER STUDY ON OX-BILE DIALYSATE AGAR

CHENG I-TSUNG & CHIAN YÜ-KUN

Department of Bacteriology, Peking Medical College, Peking

Further study was made on ox-bile dialysate agar.

1. For the base of ox-bile dialysate agar, beef-heart infusion was found to be superior to beef extract and beef infusion.

2. Descriptions are given of the modified composition of the media. B.C.P. was used as the indicator instead of Neutral Red since colonies of some of *Shigella* strains appeared red on N.R. A simple way of preparing the media is also demonstrated.

3. The growth of available stock cultures and strains recently isolated both of *B. coli* (stock cultures 3, strains recently isolated 10) and all types of *Shigella* group (stock cultures 4, strains recently isolated 72.) was compared on ox-bile dialysate agar, S-S agar and Endo's medium. It has been shown that the ox-bile dialysate agar is preferable to the others.

4. Comparative study of the effect of ox-bile dialysate agar and Endo's Medium on the isolation of *Shigella* group from 563 fecal specimens of acute intestinal disorders at Peking Children Hospital has also shown that ox-bile dialysate agar is much superior to Endo's medium.