

适于快速鉴定肠道致病菌的胰液消化基础培养基

王 瑞 新

(中国人民解放军陆军第 182 医院, 陕西咸阳)

Sanders 等^[1]曾将胰化蛋白胨、胰化酪蛋白用于快速鉴定肠道致病菌的糖发酵试验, 国内也曾做过类似试验^[2], 都得到满意结果。我们用胰液消化基础培养基制成的各种选择、分离、鉴别培养基也获得满意的效果。为了证明胰液消化培养基对肠道致病菌有增菌作用。本文着重作了生化分析及与常用培养基的比较等工作。现将研究结果分析如下。

材 料 与 方 法

一、胰液

取新鲜猪胰组织碎块 100 克, 放烧瓶内, 加入蒸馏水 300 毫升, 95% 酒精 100 毫升, 每天振荡数次, 3 天后过滤, 滤液即胰液, 冰箱保存备用。

二、培养基

1. 胰液消化基础培养基: 将牛肉膏 5 克、胨 5 克、蛋白胨 10 克溶于 900 毫升蒸馏水中, 调 pH 为 8.0, 加入胰液 100 毫升, 置 56℃ 水浴消化 2 小时后, 煮沸 10 分钟, 再调 pH 为 7.6, 加氯化钠 5 克, 过滤分装, 灭菌。

2. 未消化培养基(即普通肉膏汤): 以蒸馏水代替胰液, 其它成分同胰液消化基础培养基。

3. 胰液胆盐琼脂培养基: 将 20 克琼脂融化于胰液消化基础培养基内, 调 pH 7.2, 过滤分装, 灭菌。冷至 70℃ 时加入乳糖 10 克, 去氧胆酸钠 2.5 克, 盐溶液 50 毫升(柠檬酸钠 17 克、

硫代硫酸钠 17 克, 溶于 100 毫升蒸馏水), 0.1% 煌绿水溶液 0.33 毫升, 1% 中性红水溶液 2.5 毫升, 混匀制成平皿。

4. Бакто агар—ЖК 培养基(苏制)。

5. OXO—SS 琼脂(英国 OXO 厂出品)。

6. 中国蓝培养基。

7. 胰液中国蓝培养基: 胰液消化基础培养基代替牛肉膏肉汤, 其它成分同中国蓝培养基。

8. 胰液双糖培养基: 胰液消化基础培养基 100 毫升, 乳糖 1 克, 蔗糖 1 克, Andrade 氏指示剂 2 毫升, 混合, 灭菌。

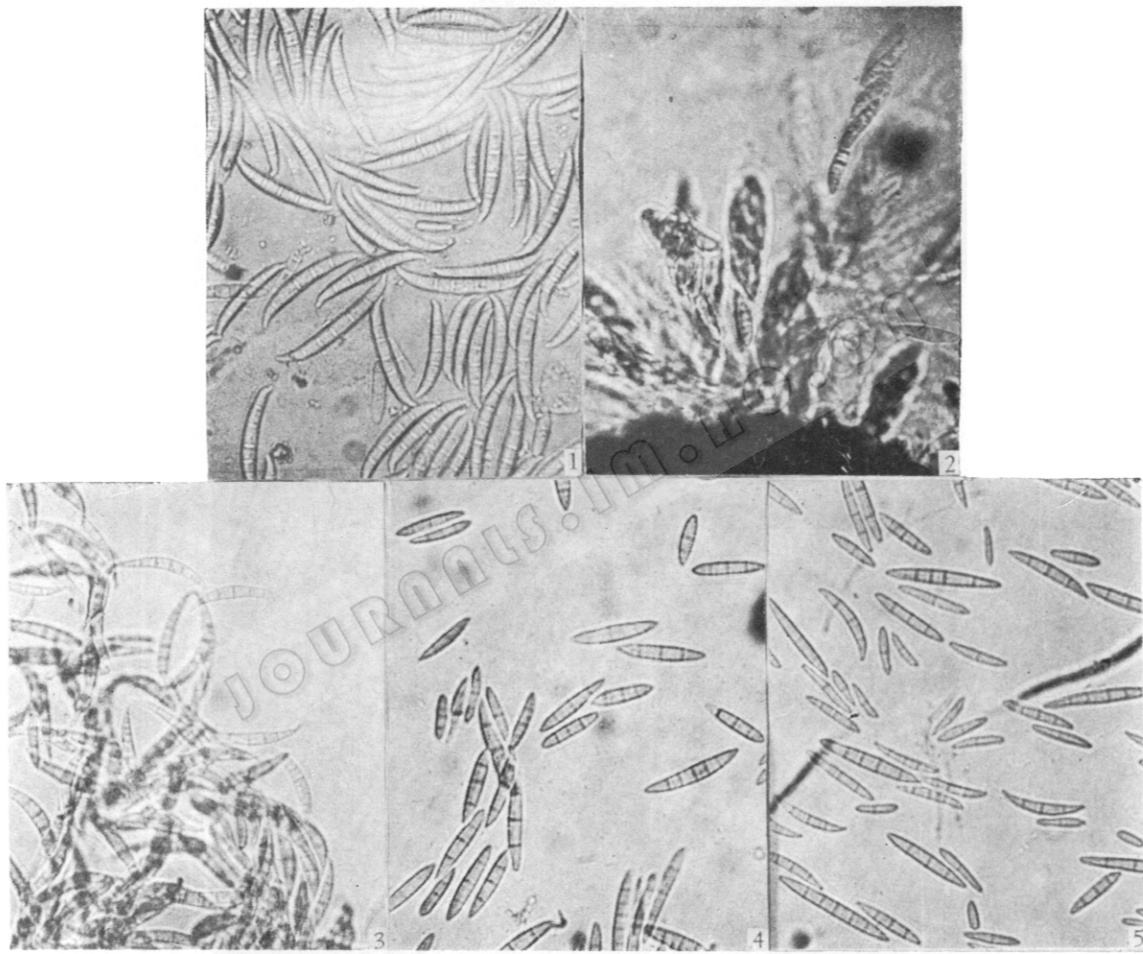
9. 胰液糖发酵液: 胰液消化基础培养基 100 毫升, 葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖、蔗糖各 1 克, 指示剂 2 毫升, 混合, 灭菌。

三、试验菌株

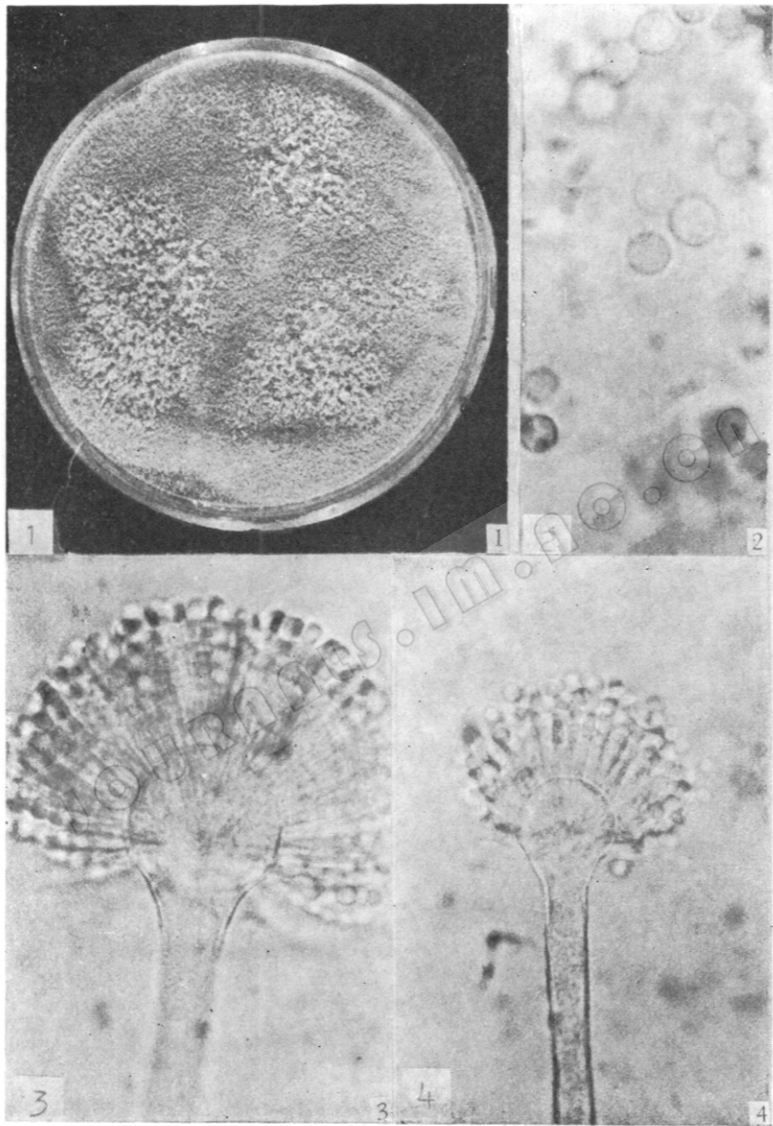
痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*), 施氏志贺氏菌 (*Sh. schmitzii*), 宋内氏志贺氏菌 (*Sh. sonnei*), 伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhosa*) TO、TH, 甲型副伤寒沙门氏菌 (*S. paratyphi* A), 乙型副伤寒沙门氏菌 (*S. paratyphi* B), 丙型副伤寒沙门氏菌 (*S. paratyphi* C), 致病性大肠杆菌 O₁₁₁。以上均由中国医科大学微生物教研室供给。

鲍氏志贺氏菌 (*Sh. boydii*), 福氏志贺氏菌 (*Sh. flexneri*) 1a、1b、2a、2b、4b、5、6、y, 肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*)。由中国医学科学院流行病学免疫学研究所供给。

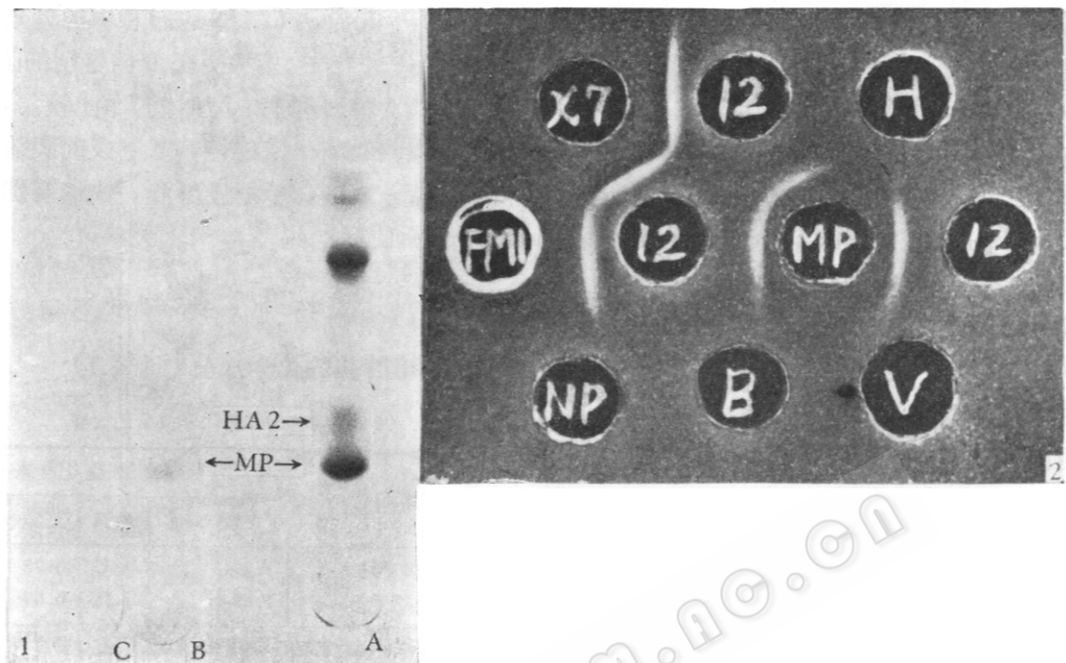
I. 上海地区麦类赤霉病的病原菌



几种镰刀菌的形态：1，2. 禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*)， 3. 木贼镰刀菌 (*F. equiseti*)，
4. 半裸镰刀菌 (*F. semitectum*)， 5. 同色镰刀菌 (*F. concolor*)。除 2 为子囊及子囊孢子外，其余
均为分生孢子形态。



1. AS 3.870 在察氏琼脂上的菌落 (25℃, 7 天) 2. 分生孢子 (×1,000)
3, 4. 大、小分生孢子头 (×400)



1. SDS-PAGE 电泳试验
A. “75-2” 病毒多肽 SDS-PAGE B. MP 回收液 SDS-PAGE (考马斯亮蓝染色)
C. MP 回收液 SDS-PAGE (糖蛋白染色)
2. 双向琼脂扩散试验
孔 12: 兔抗“75-2”MP 血清 MP: MP 回收液 X7: 甲型流感病毒 X7(H₃N₂)
SDS 裂解 (100℃ 2 分钟) FM1: 甲型流感病毒 FM1 (H₁N₁) SDS 裂解 (100℃
2 分钟) NP: “75-2” 核蛋白 B: 空白凝胶回收液 V: 兔抗“75-2”病毒颗粒血
清 H: 兔抗“75-2”血凝素血清

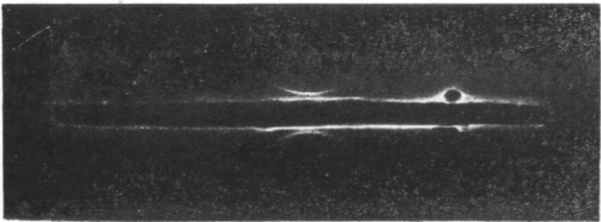


图 1 抗 IgG 免疫电泳纯度鉴定结果

大肠杆菌 1、2、3，枯草杆菌，肠球菌。由首都医院检验科分离供给。

所用试验菌种均经生化和血清学鉴定。

四、培养基 1、2 化学成分的测定

1. 用双缩脲^[3]反应测定培养基 1、2 中多肽类(三肽以上)及蛋白质含量。用 95% 酒精去除蛋白质,再测剩余的多肽含量。

2. 用 Nessler 法测定培养基 1、2 中去除蛋白质前后的总氮量及非蛋白氮含量。

3. 用 Пешков 游离色氨酸定量法测定培养基 1、2 的色氨酸含量。

五、五种培养基中氨基酸的定性^[4]

用纸层析法分别作培养基 1、2 及胰液的层析图谱;作灭活胰液加入未消化培养基中的层析图谱;作蒸馏水(代替培养基)中加 10% 胰液的层析图谱。以标准氨基酸层析图谱为对照。

六、观察细菌在不同培养基中的生长情况

1. 试验菌种在不同培养基上的生长情况:该菌首先在未消化培养基内培养 24 小时,稀释菌液为 100—200 倍,将稀释菌液分别接种在培养基 1、2、3、4 内,每种培养基 9.9 毫升内接种 100 倍稀释菌液 0.1 毫升。分别于 6、12、18、24 小时观察各菌生长情况,测定菌液光密度。

2. 常见肠道致病菌在不同培养基上的生长情况:用 10 种肠道致病菌的 200 倍稀释菌液,画线接种在五种培养基平皿内,37℃ 培养 6、8、10、12、15、18、24 小时观察结果。记录菌落形成时间。

3. 观察胰液胆盐琼脂及胰液中国蓝对大肠杆菌、枯草杆菌、肠球菌的抑制能力。取 100 倍稀释菌液接种平皿内,分 8 区,每区接种一种菌,37℃ 培养 24 小时后观察结果。

4. 比较在胰液基础培养基上和非胰液基础培养基上培养的菌种,转种到胰液双糖培养基的生长速度。取大小一样的菌落,接种到胰液双糖液内,37℃ 培养,观察各菌液浊度达 6 个马氏单位所需的时间。

5. 观察菌种从胰液双糖液转种到胰液单糖液内,发酵完全所需的时间,并与半固体糖发酵液作对比。

6. 用 200 例粪便标本接种于胰液胆盐琼脂和胰液中国蓝,培养 12—15 小时,分离菌株,再接种于胰液双糖培养基上,6 小时鉴别细菌,接种胰液单糖发酵液内,4 小时观察结果(以下简称新法)。与原法(在 SS 琼脂和中国蓝培养基上培养,分离菌株,接种克氏双糖鉴别细菌,在半固体糖发酵液观察发酵时间)作比较。

7. 用胰液消化基础培养基制成的胆盐琼脂和中国蓝,双糖、单糖发酵液,快速鉴别临床 2684 例粪便标本。

试验结果

一、两种培养基的化学成分(见表 1)

表 1 两种培养基化学成分的比较

培养基		化学成分含量(克/100 毫升)				
		蛋白质	多肽	总氮	非蛋白氮	色氨酸
胰液消化基础培养基		1.25		0.35	0.28	0.12
未消化培养基		1.88		0.26	0.09	0.03
去除蛋白质	胰液消化培养基		1.10	0.27		0.12
	未消化培养基		0.25	0.08		0.025

从表 1 结果看,由于胰蛋白酶作用,胰液消化培养基内的蛋白质含量低于未消化培养基,而总氮含量相近,非蛋白氮及色氨酸的含量前者比后者高得多。加酒精去除蛋白质后,胰液消化培养基中的多肽含量不受影响,而未消化培养基则显著减少。

二、用纸层析法测定五种培养基中的氨基酸种类(图 1)

从图 1 中 a、b 看,胰液消化培养基比未消化培养基多含 10 种氨基酸。

从图 c, d, e 看,图 c 没有底物,虽进行消化,但氨基酸的种类不多。图 d 虽有底物,但加入的是无消化力的灭活胰液,氨基酸种类仍不多。图 e 将胰液稀释 10 倍,使之与胰液消化培养基中所含氨基酸数量相当,层析结果胰液的氨基酸种类亦不多。图 f 为对照。

上述结果说明,胰液消化培养基的氨基酸种类增多,是由于胰液中酶类对蛋白质消化的结果。至于图 c, d 中比图 b 多三种氨基酸,可

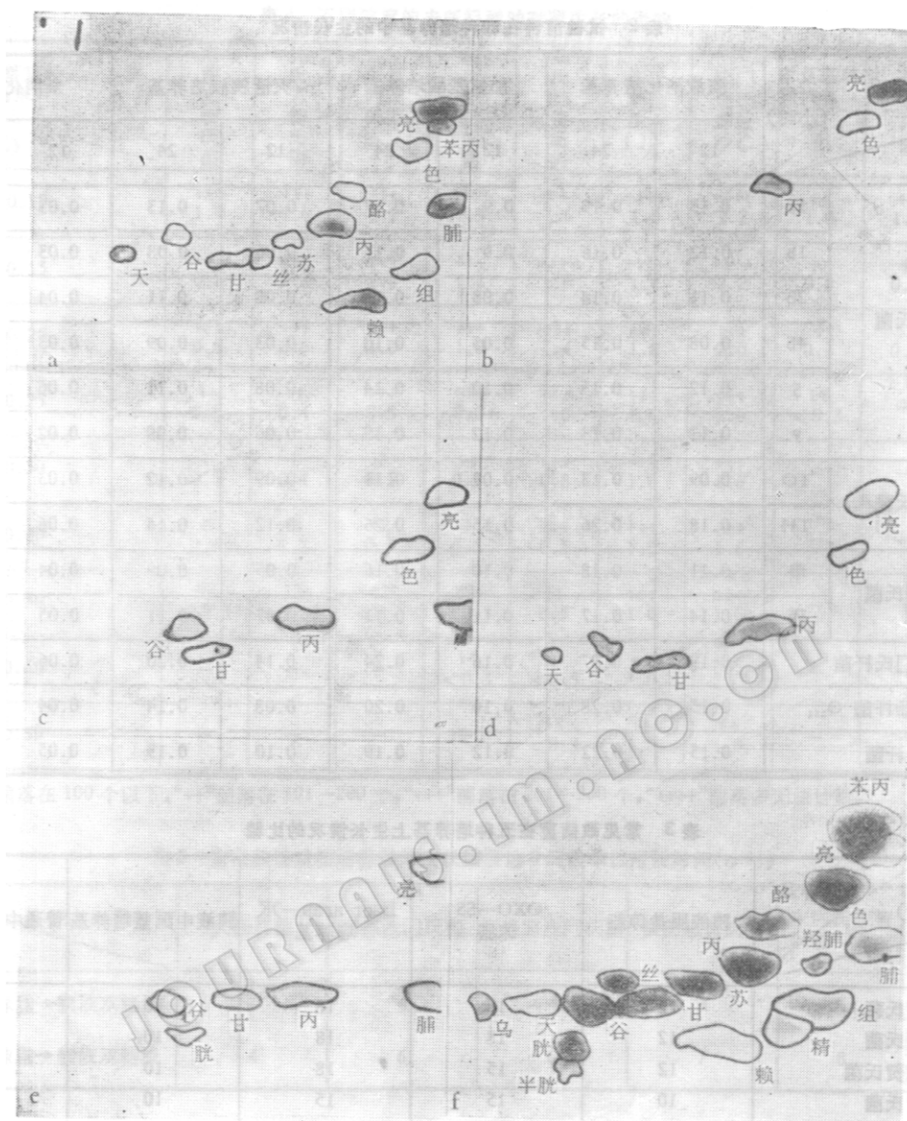


图1 在不同培养基中的氨基酸种类(层析图谱)

[纵向: 正丁醇:醋酸:水=4:1:5 (V/V) 横向: 酚:水=8:2 (V/V)]

- a. 胰液消化培养基; b. 未经消化培养基; c. 蒸馏水代替培养基加1%胰液消化后;
d. 未消化培养基加1%灭活胰液后; e. 胰液稀释10倍; f. 标准氨基酸。

能是胰液本身含有的少量氨基酸。

三、试验菌种在不同培养基中的生长情况(见表2—5)

从表2结果看出,各菌种在胰液消化培养基内的生长程度(光密度)比未消化培养基高,培养12小时比24小时高。在加氨基酸培养基和灭活胰液培养基的光密度差别不大,但比未消化培养基高,比胰液消化培养基低。

从表3看出,各常见致病菌的菌落出现时间,在胰液胆盐琼脂上需8—12小时,在胰液中

国蓝上需10小时,比普通中国蓝早2—5小时。在对照培养基上多数菌种需15—18小时。

从表4结果判断,胰液胆盐琼脂培养基中含去氧胆酸钠0.25%,最为适宜。

由表5结果看出,菌种从胰液胆盐和中国蓝琼脂转种到胰液双糖液内,比从普通SS、中国蓝琼脂转种,细菌的增长速度快,3—6小时即可完全发酵。

菌种从胰液双糖液转种到胰液单糖液,仅用3—4小时发酵完全。由此可见,菌种转种到

表 2 试验菌种在四种培养基中的生长情况

菌生长情况(光密度) 菌种		培养基及培养时间(小时)		胰液消化培养基		加氨基酸培养基		灭活胰液培养基		未消化培养基	
				12	24	12	24	12	24	12	24
福氏志贺氏菌	1a			0.13	0.19	0.9	0.17	0.07	0.13	0.03	0.06
	1b			0.12	0.16	0.9	0.11	0.06	0.08	0.03	0.06
	2b			0.11	0.14	0.08	0.13	0.08	0.11	0.04	0.06
	4b			0.08	0.15	0.05	0.10	0.03	0.09	0.03	0.06
	5			0.12	0.15	0.10	0.14	0.08	0.11	0.06	0.11
	γ			0.13	0.13	0.12	0.19	0.06	0.09	0.02	0.05
伤寒沙门氏菌	TO			0.09	0.13	0.09	0.11	0.09	0.12	0.03	0.07
	TH			0.18	0.26	0.15	0.26	0.12	0.16	0.06	0.09
副伤寒沙门氏菌	甲			0.11	0.18	0.10	0.16	0.05	0.09	0.04	0.07
	丙			0.14	0.17	0.11	0.11	0.07	0.11	0.05	0.08
肠炎沙门氏杆菌				0.19	0.27	0.16	0.24	0.14	0.20	0.06	0.10
致病性大肠杆菌 O ₁₁₁				0.15	0.28	0.10	0.20	0.08	0.14	0.04	0.09
大肠杆菌				0.15	0.22	0.12	0.19	0.10	0.15	0.05	0.10

表 3 常见致病菌在五种培养基上生长情况的比较

菌落生成时间(小时) 菌种		培养基		胰液胆盐琼脂	OXO—SS 琼脂	Бак-арам—ЖК 培养基	胰液中国蓝培养基	普通中国蓝培养基
痢疾志贺氏菌				12	18	18	10	15
施氏志贺氏菌				12	18	18	10	15
宋内氏志贺氏菌				12	15	18	10	12
鲍氏志贺氏菌				10	15	15	10	12
福氏志贺氏菌		1a		10	12	15	10	12
伤寒杆菌	TO			8	15	15	10	12
	TH			8	15	15	10	12
副伤寒杆菌	甲			8	15	15	10	12
	丙			10	15	15	10	12
肠炎沙门氏杆菌				8	12	15	10	12

同一环境比不同环境增长速度要快。

病菌 254 株。

四、临床应用效果

1. 200 例粪便标本用新法和原法检验, 结果完全一致, 未出现交叉现象。分离出各致病菌共 20 株, 阴性 180 株。

2. 用胰液胆盐琼脂, 胰液双糖、单糖发酵液, 快速检验粪便标本 2684 株, 共检出各种致

讨 论

1. 本试验结果说明, 以胰液消化培养基为基础培养基分离鉴定肠道菌有显著的增菌作用。增菌作用的产生, 主要由于胰液中蛋白酶作用, 将大分子结构的蛋白质转化为氨基酸, 易

表 4 不同浓度的去氧胆酸钠对生长的影响

菌落数及 菌落直径 (毫米)* 去氧胆 酸钠含量(%)	菌种	痢疾志贺氏菌	施氏志贺氏菌	宋内氏志贺氏菌	鲍氏志贺氏菌	福氏志贺氏菌	伤寒沙门氏菌	副伤寒沙门氏菌	大肠杆菌	枯草杆菌	肠球菌
0.10		+++ 1.0	+++ 1.0	+++ 1.8	+++ 1.3	+++ 1.6	+++ 1.8	+++ 2.2	++ 1.0	++ 1.0	++ 1.0
0.15		+++ 0.8	+++ 0.8	+++ 1.6	+++ 1.3	+++ 1.6	+++ 1.8	+++ 2.2	++ 0.8	+	+
0.20		+++ 0.8	+++ 0.6	+++ 1.0	+++ 1.0	+++ 1.4	+++ 1.8	+++ 2.0	+	32 0.3	41 <0.3
0.25		++ 0.5	++ 0.4	+++ 0.5	+++ 0.6	+++ 1.0	+++ 1.6	+++ 2.0	14 <0.3	—	—
0.30		+	+	+	++ 0.5	+++ 0.8	+++ 1.0	+++ 1.6	—	—	—
0.40		+	43 0.3	72 0.3	+	+++ 0.5	+++ 1.0	+++ 1.6	—	—	—
0.50		54 <0.3	12 <0.3	43 <0.3	63 <0.3	++ 0.5	+++ 1.0	+++ 1.6	—	—	—
0.60		—	—	—	14 <0.3	+	++ 1.0	+++ 1.0	—	—	—
0.80		—	—	—	—	18 <0.3	++ 1.0	++ 1.0	—	—	—

* “+”菌落在 100 个以下，“++”菌落在 101—200 个，“+++”菌落在 201—300 个，“++++”菌落多无法计数。

表 5 菌在胰液双糖培养基的生长浓度达 6 马氏单位所需时间(小时)

培养基	菌种	大肠杆菌	伤寒沙门氏菌	副伤寒沙门氏菌	福氏志贺氏菌	宋内氏志贺氏菌	痢疾志贺氏菌
胰液胆盐琼脂→胰液双糖液	中国蓝	3	4	4	4	5	6
普通SS琼脂→胰液双糖液	中国蓝	4	6	6	7	8	9

被菌利用。另外，培养基中的胨和牛肉膏用量加大了，胆盐用量减少了也是原因之一。胰液内还含有其它因素对菌生长有刺激作用，此点有待深入研究。

2. 用纸层析法鉴定游离氨基酸，发现胰液消化培养基比未消化培养基多 10 种氨基酸。此结果与梁氏^[5]、Пехলেখкая^[6] 等看法一致。培养基内含氨基酸种类的多少，是影响各类菌分离百分率高低的一个因素。胰液消化培养基中氨基酸种类较全，能满足各类菌的营养要求。

3. 菌种在相近的培养基中转种时，菌增殖的速度比在异种培养基中快，这可能与菌体的某些酶系统已在相近培养基中形成有关。勿需

适应或诱导过程。因此大大缩短了细菌生长的缓慢期^[7]，由此说明，以胰液消化培养基为基础培养基制造出的选择、分离和鉴别培养基，对肠道菌可以达到早期确诊目的。

参 考 文 献

- [1] A. C. Sanders, J. E. Faber, Jr. and T. M. Cook, Appl. Microbiol. 5(1): 36, 1957.
- [2] 郭履刚等：临床检验杂志，3：23—26, 1959.
- [3] Colowick, S. P. and N. O. Kaplan, Methods in Enzymology, Vol. 3, p. 450—451, 1957. Academic press, New York.
- [4] 潘家秀等：蛋白质化学研究技术，34—61 页。科学出版社，1962。
- [5] 梁业楷等：微生物学报，6(3)：373, 1958.
- [6] 张宽厚等：细菌生理学，65—67 页，人民出版社，1962 年。