

D-C 培养基的改良

仓 泽 芮 彩 霞

(江苏省盐城市第一人民医院检验科)

D-C 培养基系 Leifson 氏首创,于 1935 年应用于肠道病原菌的分离培养^[1],具有一定的选择性和鉴别作用。但由于 Leifson 氏的配方剂量存在一定缺陷,制备手续繁杂,在数十年的使用实践中学者们先后进行了多次改良,如 Hynes 氏 (1942)、Vera 氏 (1948)、Schmid 氏 (1950)、Moser 氏 (1953),但其主要成份变动颇小,尚未解决抑制某些病原菌株(志贺氏 I 型、宋内氏)之实质问题,因而影响了阳性检出率。作者对原配方之剂量进行了修改,增减了某些主要成份,改善了生长条件,促进菌体蛋白合成和对碳源的利用,从而提高了肠道病原菌的阳性检出率。

材 料 和 方 法

1. D-C 培养基改良后的成份: 蒸馏水 1000ml,硫代硫酸钠(含 $5H_2O$) 5g,纯化琼脂粉 12.5g,枸橼酸铁 1g,牛肉膏 5g,乳糖 10g,酵母浸膏 3g,去氧胆酸钠 2g,胰蛋白胍 10g,味精 10g,缓冲溶液 10ml (磷酸氢二钠 20g,枸橼酸 3g 加水至 100ml),枸橼酸钠(含 $11H_2O$) 20g,中性红 (1% 水溶液) 2.5ml,煌绿 (0.1% 水溶液) 0.33ml。

2. 制作方法: 将牛肉膏、酵母浸膏、胰蛋白胍、缓冲液一并加入 1000ml 蒸馏水中,沸后加入纯化琼脂粉,煮沸 10 分钟,关闭火源再加入

枸橼酸钠、硫代硫酸钠、枸橼酸铁,待溶解后再加入乳糖、去氧胆酸钠、味精,矫正 pH 至 7.4,最后加入中性红和煌绿溶液,定容至 1000ml,再将培养基加热至沸点,使各成份充分溶解,立即离开火源,冷却至 50°C — 60°C 左右倾注于直径为 90mm 灭菌平皿,待凝固后立即储存于冰箱备用。

结 果

1. 在改良的 D-C 培养基中添加了 1% 的

表 1 Leifson 氏琼脂及改良 D-C 培养基成份比较

成份 (g)	Leifson 氏琼脂	D-C 改良琼脂
肉膏(肉浸汁)	(1000ml)	5g
蛋白胍	10	10
酵母浸膏		3
琼 脂	20	12.5
乳 糖	10	10
去氧胆酸钠	5*	2
枸橼酸钠	25	20
枸橼酸铁		1
枸橼酸铁铵	2	
氯化铅 (mg)	3.5	
硫代硫酸钠		5
谷氨酸钠		10
中性红 (mg)	20	25
煌 绿 (ml)		0.33
蒸馏水 (ml)		1000
pH	7.4	7.4

* 另一文献中为 1g

谷氨酸钠(表 1)。谷氨酸为民用味精谷氨酸钠的主要成份,此氨基酸不仅是痢疾杆菌的氮源,而且也是能量的来源^[2],在志贺氏菌属的成员中,多数菌株在有谷氨酸存在时才能生长;该属菌中不少菌株依赖此氨基酸作为唯一的氮源,尤以 F 氏痢疾菌各血清型更为明显,且对所需氮源较为复杂的志贺氏、史密氏及 F4a 等血清型在本改良培养基上生长均占一定比例。

在实际应用中,对其菌落大小作了测量,宋内氏痢疾菌在有谷氨酸培养基中,经 37℃ 培养 18—24 小时,菌落边缘整齐,光滑扁平,略大于其它菌落,平均直径为 2.1—2.4mm,而其它痢疾菌落,平均直径为 2.0—2.1mm 左右,志、史二氏菌落均为 2mm 以下。从菌落形态所示,所需氮源复杂的志、史二氏菌,对氨基酸的含量、种类和素质上,均较其它痢疾菌不一样。

用改良后的 D-C 培养基和原 D-C 培养基分别对急性痢疾病人的脓血便和菌痢经治愈后转为慢性痢患者,以及炊事人员的带菌检查等各类标本,分别接种,各接种一个平皿,其结果,改良后的 D-C 培养基上分别比原 D-C 培养基上阳性率提高 21.5%、10.8% 和 2.29%(表 2)。

表 2 D-C 培养基改良前后阳性率比较

检查对象	检查人数	原 D-C 培养基		改良后 D-C 培养基	
		阳性	%	阳性	%
急性菌痢病人(脓血便)	200	122	61	165	82.5
急性菌痢治愈后转为慢性者	5000	225	4.5	765	15.3
炊事人员带菌检查	350	13	3.71	21	6

在进行此项工作中,剔除了各种影响检出率的因素,对急性痢疾的脓血便做到随时接种,慢性痢患者令留其直肠远端之乙状直肠处病理混合物,并于半小时内接种于平皿,其中有 3—7 年之久的慢性痢患者多名(七年 1 人,五年 4 人,四年 5 人,三年 7 人),经培养均分离到 F 氏痢菌,经药敏,选用高效药物治疗,均痊愈。

愈。

在含有味精和不含味精的改良 D-C 培养基,分别接种急性痢疾病人脓血便和肠炎病人的粘液稀便,腹泻病人的水样便,作为对照性分离培养,其结果比未加味精阳性率分别提高 3.4% 和 3.32%(表 3)。

表 3 改良后培养基含有味精之比较

检查对象	检查人数	改良后不含味精		改良后含 1% 味精	
		阳性	%	阳性	%
急性菌痢病人(脓血便)	200	159	78.6	165	82.5
肠炎和腹泻病人	240	30	12.5	38	15.82

2. 在培养基中加入缓冲液,可减少因大肠菌生长而产生的胆盐沉淀物,此种沉淀物过多时常使病原菌落透明度和形态改变,影响菌落的挑选,加适量缓冲液还可以增强对大肠菌的抑制作用。

3. 胆盐类培养基之保存延期未见文献报道,以往记载均为短暂数日用完,SS D-C 培养基限于一周用完,干燥 SS 培养基,混合胆盐均为三日内用完。根据分离肠道致病菌实践进行了对 D-C 培养基延期储存期的观察,该培养基保存使用 30 天均无变化,偶有一次储存长达 91 天之久, F、S2a 型痢疾菌仍生长旺盛,仅菌落直径比原菌落小(0.1—0.2mm),在储存中湿度是影响阳性检出率关键。

讨 论

为了提高肠道病原菌的检出率,作者对 D-C 培养基作了改良,经过三十年实践应用和原 D-C 培养基对照,阳性检出率有明显提高,在急性细菌性痢疾脓血便高达 82.5% 的阳性,而原 D-C 培养基为 61% 阳性;在对五千名患过菌痢治愈和疗后转为慢性痢疾病例带菌检查,其阳性率为 15.3%,而原 D-C 培养基为 4.5%。

改良后的 D-C 培养基,志贺氏菌属各血清型菌株几乎均能生长,无被抑制空白血清型现象,这可能与去氧胆酸钠减量有直接关系。原

配方中,去氧胆酸钠为 5g,改良后为 2g。实践证明,前者剂量大,使部分致病菌株被抑制,因在大剂量的去氧胆酸钠与枸橼酸钠的协同作用下,大肠菌类的细菌和革兰氏阳性细菌均受到强力的抑制作用^[1],在此同时亦可抑制部分痢疾菌株,如志、宋二氏痢疾菌则生长较差或甚至不能生长,当去氧胆酸钠减量而枸橼酸钠改为 20 克时,抑制性则有缓解作用。对此,不少学者建议将强弱选择性培养基同时并用,以补其不足之处,而本改良培养基则优于所有强选择性培养基,无需和弱选择性培养基并用之必要。

关于细菌的营养素源,在改良设计中作为首要因素考虑,它对痢疾菌的阳性检出率关系重大。因痢疾菌合成含氮化合物的能力较差,故在培养基中增添志贺氏菌属大部分成员所需的二羧基氨基酸作为氮源,以促进痢疾菌的蛋白合成代谢,从而提高志贺氏菌属各血清型阳性检出率。因谷氨酸与天门冬氨酸在合成代谢中均能进行氨基转移作用,所以大多数痢疾菌株在有谷氨酸存在时才能生长。此移转作用是可逆反应,它是一个重要的氨基酸合成转机,通

过这个作用氨基酸互相转变,如谷氨酸的一部分变为丙氨酸或天门冬氨酸。氨基酸的种类增加,因而有利于蛋白质的合成。为此,这些转换在细菌的培养与代谢中占有重要的地位。

在细菌生长过程中还需要一定的生长因素,主要是维生素 B 族化合物。这些维生素多半是辅酶或辅基的成分。此生长因素在酵母浸出物或酵母浸膏中极为丰富,故在培养基中增添酵母浸膏,以供痢疾菌的生长。

作者吸取各家培养基之优点,并在此基础上增加了煌绿成分。煌绿对革兰氏阳性、阴性菌具有双重抑制作用,这样可加大接种量,提高了阳性检出率。

参 考 文 献

- [1] Leifson, E.: *J. Path. Bact.*, 40: 581, 1935.
- [2] 张宽厚: 细菌生理学, 人民卫生出版社, 北京, 第 51 页, 1962 年。
- [3] Leifson, E.: *Amer. J. Hyg.*, 24: 423, 1936.
- [4] Difco Manual of Dehydrated culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures, 1948.
- [5] 程知义: 细菌性痢疾的实验室诊断, 人民卫生出版社, 北京, 第 139 页, 1957 年。