

# 分枝杆菌对亚甲蓝还原作用的研究

## I. 分枝杆菌在半固体中的顆粒形成和其活菌数及病原性間的关系

賴民生 賴郁 鄭翼宗 段連山

(北京結核病研究所細菌免疫室)

我們在含有亚甲蓝的半固体培养基中接种結核菌, 孵育一定時間后, 发现亚甲蓝被还原成无色, 且产生綠黄色顆粒状或錐形結晶物。而过去的許多学者, 只在液体培养基中观察到有亚甲蓝的脫色反应; 并且他們在方法上需要利用 Thunberg 管在絕對厌氧条件下进行試驗, 所需的菌量也較多。

在我們进一步的研究中, 証明这种結晶和結核菌活菌数間存有密切关系, 并且在病原性及非病原性分枝杆菌的鉴别上也有意义。茲将研究概要报告如下。

### 材料及方法

**菌种** 采用实验室保存的下列菌株, 有毒人型結核菌 H<sub>37</sub>R<sub>V</sub>, 卡介苗丹麦株。非病原性分枝杆菌菌株有草分枝杆菌(B<sub>1</sub>), 木村 II 株(B<sub>4</sub>), 小山株(B<sub>6</sub>), Duval 株(B<sub>7</sub>), Kedrowsky Lister 509 株(B<sub>8</sub>), No. 513 株(B<sub>9</sub>), 菊池株(B<sub>10</sub>), Maccay 株(B<sub>11</sub>), 内田 A 株(B<sub>12</sub>), 549 株(B<sub>13</sub>), No. 56 株(B<sub>14</sub>), No. 176 株(B<sub>16</sub>), No. 178 株(B<sub>17</sub>), No. 273 株(B<sub>19</sub>), Soil animal horse 株(B<sub>21</sub>), Bean II 株(B<sub>22</sub>), 慈惠 8 株(B<sub>24</sub>), Smegmal 株(B<sub>25</sub>), C-13 株(B<sub>26</sub>), C-15 株(B<sub>28</sub>)。

**0.5% 亚甲蓝溶液** 先以 20 倍的无水乙醇溶解亚甲蓝后, 再用灭菌盐水稀释 10 倍。

**亚甲蓝还原作用的方法** 在加热熔化的半固体底物中加入不同量的 0.5% 亚甲蓝溶液后分装小試管, 待冷至 40—45℃ 时, 接种經瑪瑙乳鉢磨勻的分枝杆菌, 搖勻后, 保温 37℃。

**观察結果** 亚甲蓝受分枝杆菌脫氢酶的作用被还原, 由原来的蓝色变为无色, 在半固体中产生綠黄色顆粒。如这些顆粒較少, 记录其顆数; 較多时, 以加号数表示之。

### 实 驗 結 果

#### 1. 顆粒的情况

(1) 顆粒的形状 肉眼观察为綠黄色顆粒, 显微镜下呈现为針状結晶, 聚集成两把簪簪联結形(簪柄端对接), 如图 1。将不加細菌的亚甲蓝液濃縮时也产生排列不整齐的針状結晶, 証明該結晶是从亚甲蓝原有的板状結晶变形而成的。

#### (2) 影响顆粒产生的因素

甲、用不同浓度的亚甲蓝液观察顆粒的产生, 証明亚甲蓝浓度在 12.5 微克/毫升以上时, 才能产生顆粒; 25—50 微克/毫升时, 顆粒出現較多; 浓度更高时, 則反而有抑制現象。

部分技术工作有新維声同志参加, 特此致謝。

本文 1963 年 8 月 29 日收到。

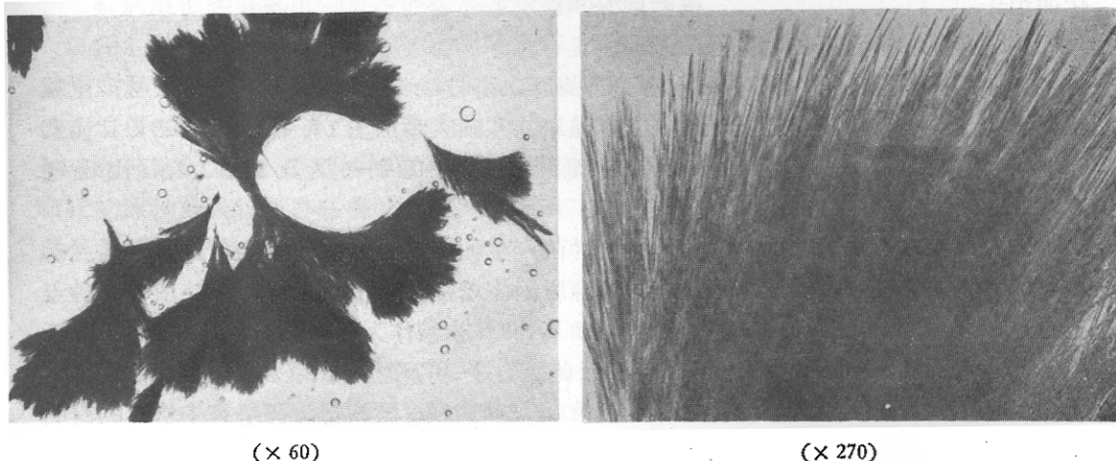


图 1 还原型亚甲蓝颗粒在显微镜下的形态。

乙、以液体石蜡复盖和不复盖半固体表面以作比較,結果两者顆粒数差別不大。

丙、pH 在 6.0、7.2 及 8.0 时观察顆粒的出現,結果以 pH 在 7.2 左右时,顆粒出現最多。

丁、用不同浓度的琼脂 (2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 及 0.05% 等) 进行試驗,証明琼脂浓度在 0.2% 时,顆粒出現最多。

戊、底物对顆粒产生的影响,用不同浓度的不同底物来比較顆粒产生的結果,发现苏通培养基除去天门冬素及甘油的基础液(以后简称苏通基础液)以及 2.5% 乳酸钠,对分枝杆菌脫氢酶的作用表現最强。3—6% 味精(約含 90% 谷氨酸鈉),4% 葡萄糖及 2% 甘油次之。緩冲液的作用較弱。在苏通基础液加上其他各种底物并加用葡萄糖、甘油和味精比单用一种底物时脫氢酶的作用更为显著。

(3) 顆粒的消失 将这些顆粒从試管中取出,放在玻片上使其暴露在空气中后就立即消失。又如将含有这些顆粒的半固体在 37°C 保温,经过較長時間,当水分蒸发产生龟裂时,顆粒也逐漸地消失;但在半固体表面加盖液体石蜡时則不变化。說明这些顆粒只有在厌氧状况下才能存在。同时更进一步說明顆粒是由于亚甲蓝还原而产生,又因亚甲蓝氧

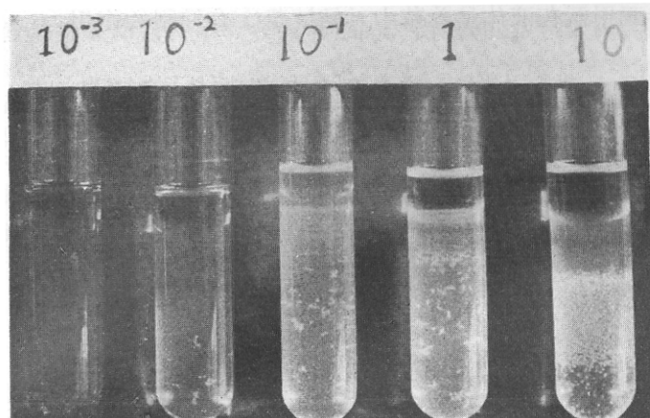


图 2 不同菌量有毒人型結核菌  $H_{39}R_v$  所产生的亚甲蓝顆粒(上面数字是接种量,毫克/毫升)。

化而消失。

## 2. 結核菌和顆粒产生的关系

(1) 用同一种底物, 接种 1 毫克/毫升有毒人型結核菌时 ( $H_{37}R_v$ ), 2—3 天就产生顆粒; 但菌量更少时, 不易出現顆粒。在苏通培养基基础液中加入 1% 葡萄糖, 0.5% 甘油及 0.8% 味精, 接种菌量为  $10^{-1}$  及  $10^{-2}$  毫克/毫升时, 分别在 4—6 天及 8—12 天后出現顆粒, 如图 2。

(2) 比較未經洗滌和洗滌二次后的接种菌产生顆粒数情况, 結果两者几乎相同。

(3) 将培养在改良罗氏培养基及胆固醇琼脂固体培养基上的不同菌龄的結核菌, 接种至苏通基础液中, 再加上 1% 葡萄糖、0.5% 甘油及 0.8% 味精作为底物, 孵育观察之。亚甲蓝顆粒产生情况和活菌数的关系如表 1。即活菌数愈多, 所产生的顆粒数也愈多; 活菌数少于  $10^3$  时不产生顆粒, 大于  $10^4$  时才产生顆粒。同时說明, 虽然細菌在培养基上培养的时间較长, 但只要仍保持一定的活菌数, 这些較老的細菌依然具有脫氫酶的作用, 而产生亚甲蓝的还原性顆粒。

表 1 不同菌齡人型結核菌所產生的亚甲藍顆粒数及活菌数

菌 齡 (周)	胆 固 醇 固 体 培 养 基		改 良 罗 氏 培 养 基	
	顆 粒 数	活 菌 数	顆 粒 数	活 菌 数
2.5	$0.5 \times 10^8$	$0.6 \times 10^7$	$1.5 \times 10^2$	$8 \times 10^6$
5	$0.8 \times 10^8$	$0.67 \times 10^7$	$2 \times 10^2$	$2.3 \times 10^6$
8.5			$3 \times 10^2$	$10^6$
13	$2.5 \times 10$	$2.3 \times 10^5$	$1 \times 10^2$	$10^6$

(4) 当用加热杀死 10 毫克/毫升結核菌进行对亚甲蓝的还原試驗时, 証明无作用, 說明脫氫酶已被加热破坏而不再起作用。

## 3. 亚甲蓝对結核菌的影响

对保溫 12—20 天已經出現顆粒并褪色的半固体中的人型結核菌, 进行定量培养, 結果如表 2。由表 2 可看出, 結核菌在亚甲蓝浓度 50—200 微克/毫升中, 其活菌数并无增減, 說明分枝杆菌对亚甲蓝的还原作用是在細菌不繁殖的情况下进行的。此外, 試驗亦証明 100 微克/毫升亚甲蓝在液体培养基中对結核菌沒有抑制的作用。

表 2 人型結核菌在含有亚甲藍和無氧条件下的活菌数

亚 甲 蓝 浓 度 (微克/毫升)	菌 量 (1 毫 克/毫 升)		菌 量 ( $10^{-1}$ 毫 克/毫 升)	
	活 菌 数	保 溫 日 数	活 菌 数	保 溫 日 数
200	$1.1 \times 10^7$	12	$1.1 \times 10^6$	12
150	$0.95 \times 10^7$	20		
100	$4 \times 10^7$	17	$4.8 \times 10^5$	17
50	$10^8$	20		
0	$10^7$	12	$1.6 \times 10^6$	12
0	$1.1 \times 10^7$	20		

注: 接种后馬上放入冰箱。

#### 4. 病原性和非病原性分枝杆菌对亚甲蓝的还原作用

用各种分枝杆菌, 在苏通基础液中加入 1% 葡萄糖、0.5% 甘油及 0.8% 味精作底物, 观察亚甲蓝的还原作用。发现本室保存的上述 20 种非病原性分枝杆菌对亚甲蓝的还原作用均很强, 接种 1 毫克/毫升菌量时, 在 12 小时内均产生颗粒并使亚甲蓝褪色。而病原性分枝杆菌如人型、牛型结核菌及卡介苗则在 2—3 天内才能脱色, 说明非病原性分枝杆菌比病原性分枝杆菌存在有較大量的脱氢酶, 同时亚甲蓝褪色的时间还能够初步鉴别病原性与非病原性分枝杆菌。

### 討 論

脱氢酶在细菌呼吸中起很重要的作用, 一般研究者均用 Thunberg 氏氧化管, 及大量菌在缓冲液中观察亚甲蓝的褪色时间等方法来研究分枝杆菌的脱氢酶<sup>[1-2]</sup>。我們使用半固体琼脂培养基, 在反应开始时, 厌氧情况不如用氧化管那样绝对厌氧, 反应时间較緩慢。若接种细菌后复盖液体石蜡于半固体表面时, 亦表现了同样的情况。但由于应用了半固体琼脂培养基, 发现产生了結晶状颗粒, 且初步实验証明颗粒的多少与结核菌的活菌数, 以及不同菌株間还存有密切的关系, 因此我們认为可将此法应用于结核菌及卡介苗等活菌計算及病原性与非病原性分枝杆菌的鉴别。本法操作簡便, 便于推广。

另外, 实验还証明結晶状颗粒是半固体培养基中的亚甲蓝被还原后而析出的产物, 它具有一定的結晶状, 且悬浮其中不下沉; 当沒有亚甲蓝 (只有细菌和底物存在) 或沒有细菌 (只有亚甲蓝和底物存在) 时, 不产生颗粒; 说明这些颗粒是细菌、亚甲蓝和底物三者相互作用的結果。此种颗粒暴露在空气中就消失, 由此看出还原型亚甲蓝的颗粒經空气氧化又变成氧化型。也就是說, 颗粒的出現和消失是亚甲蓝的还原和氧化的結果。形成这些颗粒的机制有待今后研究。

Bloch 应用 Thunberg 管观察不同菌株分枝杆菌对亚甲蓝的脱色时间, 注意到非病原性分枝杆菌的脱色时间較病原性分枝杆菌为短<sup>[1]</sup>。这和我們所得的結果是一致的。关于分枝杆菌活菌数和其脱氢酶的关系, 大林等亦用 Thunberg 管观察在苏通培养基中培养的卡介苗的培养日数, 活菌数和乳酸脱氢酶的关系, 发现卡介苗的脱氢酶反应和活菌数之間有平行关系, 因此认为脱氢酶的測定有可能应用于卡介苗的活菌計数<sup>[2]</sup>。虽然这个实验条件和我們不同, 但其結果和我們所得者基本相同。当接种  $10^{-1}$  或  $10^{-2}$  毫克/毫升的分枝杆菌后, 产生亚甲蓝颗粒的时间和不加亚甲蓝的半固体培养基上接种同量的分枝杆菌后培养出的细菌菌落的时间相差不多, 但后者的菌落过于稠密不能計数, 而亚甲蓝的颗粒数却是較少, 就便于計数。如在不加亚甲蓝的半固体培养基上接种能計出菌落数的少量菌量, 則菌落出現的时间較长。因此本文所介紹的方法的优点在于在短時間內能够初步推測較大量的分枝杆菌的活菌数。另外关于抗结核药物对分枝杆菌脱氢酶的影响, 我們正在进一步探討中。

### 結 論

1. 我們发现在含有亚甲蓝及底物的半固体培养基中, 接种分枝杆菌后, 保持 37°C 时, 由于分枝杆菌脱氢酶的作用, 亚甲蓝被还原, 产生綠黄色結晶状颗粒, 结核菌的活菌数大于

10<sup>4</sup> 时才能起上述作用。

2. 以乳酸鈉作为底物时,分枝杆菌脱氢酶的作用表现最强,味精、葡萄糖及甘油次之。上述底物并用时脱氢酶的作用比在单用一种底物时更明显,接种 1 毫克/毫升结核菌时,2—3 天后可见到颗粒,用加热杀死的结核菌则不起反应。

3. 使用不同菌龄的人型结核菌,活菌数愈多,则产生的颗粒数也愈多,证明颗粒和活菌数间有平行关系。因此,利用本法可在短时间内初步推测结核菌的活菌数。

4. 非病原性分枝杆菌使亚甲蓝褪色的时间很短,而病原性分枝杆菌则长。所以,用来初步鉴别病原性与非病原性分枝杆菌。

### 参 考 文 献

[1] H. Bloch: *Amer. Rev. Tuberc.*, **61**: 270, 1950.

[2] 大林啓二等: *医学と生物学*, **10**: 317, 1947.

## STUDIES ON REDUCING ACTIVITY OF MYCOBACTERIA FOR METHYLENE BLUE

### I. RELATION BETWEEN THE PRODUCTION OF GRANULES AND THE VIABLE UNIT AND PATHOGENICITY OF MYCOBACTERIA

LAI MIN-SHENG, LAI YU, CHENG I-TSUNG AND TUAN LIEN-SAN

(Peking Tuberculosis Research Institute)

It was found that when mycobacteria were inoculated on semi-solid agar media containing methylene blue (MB) and substrates, and were incubated at 37°C, MB was reduced, producing green-yellowish crystalline granules by the action of dehydrogenase of the mycobacteria, and this phenomenon appeared only when the viable unit of tubercle bacilli was more than 10<sup>4</sup>.

Using sodium lactate as the substrate, the action of dehydrogenase in mycobacteria was found to be the highest. Glutamate, dextrose and glycerol were weaker as a substrate, than sodium lactate. When two substrates, especially 2% dextrose and 1% glycerol were used in combination, the action of dehydrogenase was found to be much stronger than when the substrates were used alone. The granules appeared in 2 to 3 days when one milligram of tubercle bacilli per millilitre of media was inoculated. No change was found by the inoculation of heat-killed tubercle bacilli.

When tubercle bacilli of human origin incubated for different periods were tested, the more the viable units of the tubercle bacilli involved, the more numerous were the granules produced. The authors suggest that the number of viable units might be calculated from the number of granules.

The time for the reduction of MB was found to be very short for non-pathogenic mycobacteria and much longer for pathogenic ones, thus primary differentiation of pathogenic mycobacteria and non-pathogenic ones might be achieved.