

微量元素对结核分枝杆菌生长的影响

匡铁吉 冯 利 王秀莲 张爱萍

(中国人民解放军三〇九医院, 北京)

本文报道了 25 种微量元素在改良罗氏培养基上对分枝杆菌菌株 $H_{37}Ra$ 和 BCG 生长的促进作用。试验结果表明: Ni、B、Mo、Cr、Zn、Se、Be 等元素能显著地促进菌株的生长。Sr、Cu、Al、Si 等元素也在一定程度上促进菌株的生长。培养基的 pH 值对微量元素的这种生长促进作用有一定影响。Zn、Mo 与草酸铵组合, 对分枝杆菌菌株 $H_{37}Ra$ 和 BCG 在酸性培养基上的初生长和后生长, 均有明显的促进作用。而 Co、Cu 和 Mn 组合能部分地消除高 pH 值对分枝杆菌生长的抑制作用。Ni 和 Se 有使分枝杆菌斜面培养物保持细胞和菌落完整的作用。

关键词 结核分枝杆菌; 卡介苗; 微量元素

常见的致病分枝杆菌在体外的生长十分缓慢。分枝杆菌对各种有机化合物的利用能力, 已有许多报道^[1-4]。但对微量元素在分枝杆菌生长中的作用, 至今人们还不甚了解。我们使用罗氏固体培养基, 试验了 25 种微量元素在不同浓度, 不同组合, 不同 pH 条件下, 对分枝杆菌菌株 $H_{37}Ra$ 和 BCG 生长的作用。

材料和方法

(一) 菌株

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 人型无毒株 $H_{37}Ra$ 和牛型弱毒株 BCG, 由北京市结核病研究所提供。菌株保存在罗氏斜面上, 4℃ 冰箱贮存(贮存期不超过一个月)。

(二) 培养基

用改良罗氏培养基作为基础培养基和对照培养基。制作方法依照结核病细菌学检验方法暂行规程。含微量元素的化合物与培养基中的无机盐一起溶解, 然后配制灭菌。

(三) 培养基的 pH 值

用 1N HCl 和 10% NaOH, 调培养基基础液(甘油、淀粉、全卵液和孔雀绿溶液除外)的 pH,

最后用酸度计准确测定。酸性培养基, 基础液 pH 为 3.8; 碱性培养基基础液 pH 为 7.6; 改良罗氏培养基基础液 pH 为 5.6, 不用调。

(四) 接种和培养

取 37℃ 培养 21—28 天的罗氏斜面菌种, 用 0.2% 的吐温 80 水溶液制成 1.0mg 湿菌/ml 种子原液。然后依次用生理盐水稀释至 10^{-1} mg/ml。取 10^{-1} mg/ml (大接种量) 和 10^{-3} mg/ml (小接种量) 二管接种, 每支斜面接种 0.1ml, 置 37℃ 温箱培养。

(五) 结果观察

对大接种量斜面从第四天开始观察结果。10 天内每天观察一次。11—21 天, 每二天观察一次, 至生长恒定为止。斜面上菌落少于 50 个时记下菌落数, 大于 50 个菌落数时用“+”号表示。小接种量培养物 12 天开始观察结果, 2 天一次, 记下菌落数。观察时还要注意菌落的形状, 大小, 颜色, 干湿等特征。

(六) 试验元素及其化合物

表 1 列出了试验过的微量元素及其化合物。微量元素的浓度是指培养基中该元素的实际含量, 而不是指含有该元素的化合物的量。

本文于 1984 年 3 月 27 日收到。

表1 元素、化合物及试验浓度范围

Table 1 Elements, compounds and the range of concentration tested

元素 Element	化合物 Compound	规格 Grade	浓度范围 (mg/L) Conc range tested	元素 Element	化合物 Compound	规格 Grade	浓度范围 (mg/L) Conc range tested
Zn	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	II, C.P	2—15	V	V_2O_5	A.R	1—5
Mn	$MnSO_4 \cdot H_2O$	A. R	2—15	Sr	$Sr(NO_3)_2$	A.R	5—15
Co	$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	C. P	2—15	Cr	$CrCl_3$	A.R	0.2—2
Cs	$CsSO_4$	II, C.P	1—5	Cd	$CdSO_4$	A.R	0.2—2
Se	$Na_2SeO_4 \cdot 10H_2O$	II, C.P	5—15	Be	$BeSO_4 \cdot 4H_2O$	C.P	1—5
B	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	I, C.P	3—30	Ag	$AgNO_3$	C.P	1—5
Li	Li_2CO_3	A. R	2—5	U	$U(NO_3)_2$	C.P	2—5
Ba	$Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$	C.P	1—10	Al	$AlNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	C.P	10—30
Te	K_2TeO_3	C. P	0.3—2	Cu	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	A.R	1—6
Ni	$NiSO_4 \cdot 7H_2O$	A. R	0.5—15	Br	NH_4Br	C.P	5—20
Mo	$(NH_4)_2MoO_7 \cdot 4H_2O$	C. P	5—30	F	NaF	A.R	0.5—2
Fe	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	A. R	1—5	Si	$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	C.P	25—50
Sn	$SnCl_4 \cdot 5H_2O$	A. R	5—15				

注:表内浓度是指元素的实际含量,而不是指含有该元素的化合物的量。

Notes: The concentration here represents the actual weight of the testing element, not of the compounds.

(七) 元素组合试验

将对菌株 $H_{37}Ra$ 和 BCG 有生长刺激作用的元素,以酸性、碱性和改良罗氏三种 pH 值不同的培养基为基础,进行了多种组合试验。

结 果

(一) 生长刺激作用

表2、表3分别列出了对分枝杆菌菌株 $H_{37}Ra$ 和 BCG 生长有刺激作用的各种微量元素及其有效浓度。

1. 菌株 $H_{37}Ra$: Zn 在 2—15mg/L 浓度范围内,对大接种量后生长有稳定的促进作用。Ni 对小接种量培养物的促进生长作用,在 0.2—5.0mg/L 范围内均有效。Ni 对小接种量的作用主要表现在菌落数恒定的时间短,比改良罗氏培养基提早一周以上。其菌落数目不多,但生长旺盛,形状、颜色典型。Mo 刺激大接种量培养物中期生长,效果稳定。表现为菌落密度比对照培养物大,并很快形成菌苔,但后生长并不十分旺盛。B 对小接种量培养物的初生长有着稳定的促进作用,在 3—10mg/L 浓

度范围内,效果显著。Cr 在 0.2—2.0mg/L 浓度范围内,对小接种量培养物的初生长和后生长有促进作用。Cu 在 2—5mg/L 浓度时,抑制菌株 $H_{37}Ra$ 的生长。但在浓度为 1mg/L 时,对此菌株小接种量培养物的生长似乎有利。Ag 在酸性条件下,对大接种量培养物有生长促进作用。

2. 菌株 BCG: Zn 在 2—15 mg/L 浓度范围内,对大接种量培养物后生长有促进作用,且比较稳定。Ni (0.5mg/L) 对小接种量培养物的初生长和后生长均有促进作用。这种作用在酸性条件下尤为显著。Mo 在 5—30mg/L 浓度范围内,对大接种量培养物的中期生长有促进作用,主要是使菌落数增加。高浓度的 Mo (20—30mg/L) 对小接种量培养物也有生长刺激作用。B (3—6mg/L) 对小接种量培养物的初生长和后生长有明显的促进作用。2mg/L Cu 对二个接种量的培养物均有一定的生长刺激作用。在 6mg/L 时, Cu 抑制菌株生长。在酸性培养基中, Cu 量为 4—6mg/L 时,生长在小接种量斜面上的菌落呈紫褐色。Be

表2 微量元素对分枝杆菌菌株 $H_{37}Ra$ 生长的促进作用Table 2 The promoting-Growth action of trace element on *M. tuberculosis* $H_{37}Ra$

元素 Element	有效浓度 (mg/L) Effective conc	大接种量培养物 Large inoculum		小接种量培养物 Small inoculum	
		初生长 Initial growth	后生长 Late growth	初生长 Initial growth	后生长 Late growth
Se	5	+	++	±	+
Sr	5	+	±	—	—
Zn	2	±	++	+	+
Mo	15	—	++	—	—
Ni	0.5	—	++	+	+
B	6	±	±	++	—
Cr	2	—	—	+	+
Be	1	—	++	—	—
V	2	—	+	—	—
Si	50	—	+	—	—
Cs	1	—	+	+	+
Cu	1	—	—	+	±
Te	0.3	—	—	+	+
F	1	±	+	+	—
Br	20	—	+	+	—
Ag	1	—	+	—	—

注: 1. 表中+有促进生长作用, ++ 显著地促进生长, —没有效果, ±促进生长的作用重复性差。

2. 初生长: 包括最早出现可见菌落的时间和早期生长物的多少。

3. 后生长: 包括达到最多生长物(或最多菌落数)的时间和最终生长物的多少。

Notes: 1. In the table + = stimulating growth, ++ = stimulating growth significantly, — = No stimulating effect on growth, ± = stimulating growth and showing instability.

2. Initial growth: including the first time arising visible colony and the quantity of the growth in the early stage.

3. Late growth: including the time for achieving the highest yield and the final quantity of the growth.

和 V 在试验浓度范围内对菌株生长没有明显的促进作用。

菌株 $H_{37}Ra$ 和 BCG 在含有 Ni 或 Se 的斜面上生长时, 37℃ 培养 2 个月或更长时间, 斜面上生长物不发生溶解, 菌落保持坚实干燥状态。Se 对菌株 BCG 的效果更好。

(二) 培养基 pH 与微量元素促进生长的效果

一般在酸性(基础液 pH 为 3.6)和碱性(基础液 pH 为 7.6)条件下, 微量元素促进二菌株生长的作用更为明显。而当培养基基础液 pH 为 5.6 左右时, 其促进生长的

效果较差。元素 Cr、Zn、Cu、Al 和 Ni 促进分枝杆菌生长的作用与培养基的酸碱度关系较密切。

(三) 微量元素组合对生长的影响

将那些对分枝杆菌生长有刺激作用的微量元素, 进行组合试验, 每组 2—9 种元素不等。3 次实验结果表明, 下列组合对菌株 $H_{37}Ra$ 和 BCG 的生长有促进作用。
a. Zn(2mg/L) + Mo(15mg/L); b. Zn(2mg/L) + Mo(15mg/L) + 草酸铵(0.3g/L);
c. Zn(2mg/L) + Mn(2mg/L) + 草酸铵(0.3g/L); d. Co(2mg/L) + Cu(1mg/L) + Mn(2mg/L); e. Co(2mg/L) + Cu(1

表3 微量元素对分枝杆菌菌株 BCG 生长的促进作用

Table 3 The promoting-growth action of trace element on *M. tuberculosis* BCG

元素 Element	有效浓度 (mg/L) Effective conc	大接种量培养物 Large inoculum		小接种量培养物 Small inoculum	
		初生长 Initial growth	后生长 Late growth	初生长 Initial growth	后生长 Late growth
Se	5	±	+	±	++
Sr	5	—	+	—	—
Zn	2	—	++	—	—
Cu	2	±	+	+	++
Mo	15	±	++	+	±
Ni	0.5	—	±	++	++
B	6	—	±	++	++
Al	15	—	++	—	—
Cr	2	—	—	++	++
Br	20	—	+	—	—
Ba	10	±	±	—	+

注：各项内容注释见表 2。

Notes: The notes about the symbols and contents is the same as those in table 2.

mg/L) + Mn(2mg/L) + Br(15mg/L)。其中效果较好的是 b 组和 d 组。b 组对菌株 H₃₇Ra 和 BCG 的两个接种量培养物的初生长和后生长,均有明显的促进作用,在酸性培养基中这种作用更突出。d 组对两个菌株的生长均有促进作用。当基础液的 pH 为 7.6 时,菌株 BCG 在罗氏培养基上没有任何生长物,而补加微量元素组合 d 的斜面上却有中等程度的生长物。菌株 H₃₇Ra 对碱性环境的耐受力比菌株 BCG 强,但 d 组亦能部分地消除高 pH 对菌株 H₃₇Ra 生长的有害作用。微量元素组合往往显示不出各组合元素促进生长的效果。多数情况下甚至产生相反的作用。

讨 论

1956 年 Drea 报道结核分枝杆菌生长不良与甘油中锌含量过低有关^[5]。此后 Patterson 等也先后报道锌对分枝杆菌属中某些种的生长有刺激作用^[6~8]。本试验证实 Zn 有促进菌株 BCG 生长的作用,同时对菌株 H₃₇Ra 也有生长促进作用。

Se、Be 对 H₃₇Ra 大种量培养物的生长有刺激作用,这与 Jaguess、Maccordick 的发现是一致的^[9,10]。Ni、B、Mo、Cr 在试验浓度下对菌株 H₃₇Ra 和 BCG 的生长有促进作用,这是有意义的。Ni 和 Cr 在人们的传统看法上认为是有毒的,而含 B 元素的硼砂则有消毒作用。这些元素都是在近十年才被营养学家们确定为人类所需要的微量元素^[11,12]。

菌株 H₃₇Ra 对 Cu 的耐受性不如菌株 BCG。Cu (2mg/L) 能刺激菌株 BCG 生长,而抑制菌株 H₃₇Ra 的生长。在酸性 pH 条件下,在含 Cu 量为 4—6 mg/L 的斜面上,小接种量时 BCG 菌株形成的菌落为紫褐色。菌株 H₃₇Ra 不产生这种带颜色的菌落。这可能说明,生长在固体培养基表面上的 BCG 菌株细胞具有转运和富集培养基中 Cu 的功能,然后将其还原成亚铜或金属铜,从而使菌落呈紫褐色。1964 年, Tison 等研究了柠檬酸铁在分枝杆菌中的转运情况,发现高浓度的柠檬酸铁导致铁的氧化物的形成,产生褐色菌落^[13]。菌株

$H_{37}Ra$ 和 BCG 对高浓度 Cu 的不同反应及其形成带色菌落上的差异,也许对鉴别这两个菌株有益。

我们还观察到,在加有 0.5mg/L Ni 或 5mg/L Se 的培养基上,BCG 或 $H_{37}Ra$ 生长物,可在 37℃ 培养两个月或更长时间而不发生自溶。这说明元素 Ni 和 Se 具有维持细胞和菌落结构完整的作用。这种作用与这两种元素促进分枝杆菌后生长的作用有关。

参 考 文 献

- [1] Long, E. R. (黄绍彪译):《结核病的化学与化学疗法》,上海科学技术出版社,1962。
- [2] 范秉哲等:《结核病学》,人民卫生出版社,北京,1964。
- [3] Dubos, R. J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 13: 56, 1946.
- [4] Norman, J. O. and R. P. Williams: *Nature*, 183: 702, 1962.
- [5] Drea, W. F.: *American Review of Tuberculosis*, 74: 145—146, 1956.
- [6] Patterson, D. S. P.: *Tubercle*, 41: 191—202, 1960.
- [7] John, S. C. et al.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 103: 372—376, 1971.
- [8] Jacqueline, D. B. et al.: *J. of General Microbiology*, 124: 353—357, 1981.
- [9] Jaguess, P. A. et al.: *Am. J. Clin. Pathol.*, 75(2): 209—210, 1981.
- [10] Maccordick, J.: *IRCC. MED. SCI.*, 9(2): 118—119, 1981.
- [11] 施罗德, H. A.:《痕量元素与人》,科学出版社,北京,1979。
- [12] 孔祥瑞:《必需微量元素的营养、生理及临床意义》,安徽科学技术出版社,合肥,1982。
- [13] Tison, F. et al.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 92: 541, 1965.

EFFECT OF TRACE ELEMENT ON GROWTH OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* $H_{37}Ra$ AND BCG

Kuang Tieji Feng Li Wang Xiulian Zhang Aiping
(No. 309 Hospital of the People's Liberation Army, Beijing)

The growth-promoting action of 25 kinds of metals on *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Ra$ and BCG growth on modified Löwenstein-Jensen medium was investigated. It is found that the growth of $H_{37}Ra$ and BCG were promoted obviously by Ni, B, Mo, Cr, Zn, Se and Be. Elements Sr, Cu, Al and Si stimulated the growth of $H_{37}Ra$ and BCG to certain extent. The acidity of the medium bore a relation to the growth promoting effect. The combination of Zn, Mo and ammonium

oxalate had a good growth stimulation on both strains growth on acid medium. And the harmful effect of higher pH value on $H_{37}Ra$ and BCG could be eliminated partly by the combination of Co, Cu and Mn. Addition of Ni or Se to the medium made the cells and colonies of $H_{37}Ra$ and BCG keeping integrity when cultivated at 37℃.

Key words

Mycobacterium tuberculosis; BCG;
Trace element