

## 分枝杆菌全合成琼脂培养基的研究

匡铁吉 王利平

(解放军三〇九医院, 北京)

本文报道了一种适合常见致病分枝杆菌生长的全合成固体琼脂培养基体系。它为实验室研究分枝杆菌的营养生理、生化特性、遗传变异、药理和耐药机制提供了一种新工具, 也为研制更加满意的分枝杆菌培养基创造了条件。试验过的大多数非典型分枝杆菌, 在全合成琼脂培养基上比在罗氏培养基上生长快, 生长量少于或等于罗氏培养基。标准牛型株的细胞群体中, 仅有少量细胞能在全合成琼脂培养基上生长。鸟型、胞内和偶发等分枝杆菌标准株在全合成琼脂培养基上产生两种不同的菌落。

**关键词** 分枝杆菌; 全合成琼脂培养基

近年来, 微生物学、分子生物学和免疫学等领域的工作者对分枝杆菌的兴趣增加<sup>[1-4]</sup>。出现这种现象的原因是多方面的。首先, 多数发展中国家结核病发病率仍很高<sup>[5]</sup>。结核病至今还对数十亿人民的健康构成威胁。现今采用的结核病预防措施, 其效果不够理想, 而且不适合发展中国家大多数人口居住地区的医疗水平。传统的结核病诊断方法, 不能满足结核病高发区和低发区的需要。非典型分枝杆菌所致疾病治疗难度大<sup>[6]</sup>, 其发病率在一些国家有上升的趋势<sup>[7]</sup>。七十年代后期, 发现爱滋病患者中分枝杆菌感染率很高, 其中仅鸟-胞内分枝杆菌复合体感染率就超过35%<sup>[8]</sup>。1986年 Growford 发现, 从爱滋病患者体内分离到的鸟-胞内分枝杆菌, 均含有 PLR, 质粒<sup>[9]</sup>。但是, 人们对分枝杆菌的了解还远不如其它细菌。传统研究领域, 如分枝杆菌的生理、生化、遗传变异的研究, 需要深化; 新兴的分枝杆菌大分子生物学特征和遗传工程技术的研究, 有待加强。但上述研究所必须的适合分枝杆菌生长的全合成固体琼脂培养基, 迄今尚未见于报道。作者在这方面进行了初步探索,

现报告如下。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 菌株

分枝杆菌人型强毒株 H<sub>37</sub>R<sub>1</sub>、牛型菌株、堪萨斯菌株和不产色菌株, 由北京市结核病医院基础研究室提供, 这些标准株来源于美国。分枝杆菌鸟型菌株、胞内菌株、淋巴菌株、猿菌株、偶发菌株和耻垢菌株, 由北京市结核病研究所提供。菌株保存在罗氏斜面上, 4℃ 冰箱保存。

#### (二) 培养基

改良罗氏培养基作为对照培养基, 其制作方法依照结核病细菌学检验方法暂行规程。

全合成琼脂培养基的组成, 配制方法和操作步骤如下:

1. 基础液 (1L 培养基内含):

(1) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 3.8g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5g。

(2) MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.089g; 柠檬酸铁铵 0.04g; 柠檬酸三钠 0.4g; 柠檬酸铵 0.5g; L-谷氨酸 0.5g; 甘油 5ml。

(3) 葡萄糖酸钠 0.5g; 丙酮酸钠 0.5g; 尿嘧啶 0.04g; AMP 0.02g; 鸟粪苷钠盐 0.02g; Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> · 10H<sub>2</sub>O 0.005g。

以上三组基础液均定容到 100ml, 为 10 倍液

本文于 1987 年 12 月 15 日收到。

表 1 各合成琼脂培养基特殊补加组分(100ml 培养基含)

Table 1 The particular additional complements of complete defined agar media (per decilitre)

补加物 Additions	琼脂培养基 Agar media					
	03	04	05	06	07	08
甘油	0.5ml	—	0.5ml	—	—	—
苯丙氨酸	—	0.02g	0.02g	0.02g	—	0.02g
盐酸多巴胺(注射液)	—	5mg	2mg	2mg	2mg	5mg
盐酸肾上腺素(注射液)	—	—	—	—	0.2mg	—
去甲肾上腺素(注射液)	—	—	—	—	1mg	1mg
雌三醇(注射液)	—	—	—	1mg	0.5mg	—
琥珀酸钙	—	—	15mg	—	20mg	20mg
透明质酸	—	—	10mg	—	—	—

缩液,使用时,每 100ml 培养基各取 10ml。

2. 各合成琼脂培养基特殊补加组分,列于表 1。

3. 琼脂基础培养基灭菌后补加溶液:

(1) 称取葡萄糖 4g, 加蒸馏水 10ml, 0.7kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 20 min, 加量为 0.5ml/dl 培养基。

(2) 称取偏重亚硫酸钠 0.2g, 加蒸馏水 10ml, 0.7kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 20min, 加量为 0.5ml/dl 培养基。

(3) 称取泛酸钙 10mg, 硫胺素 5mg, B<sub>12</sub> 5mg, 加蒸馏水 5ml, 0.7kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 20min, 加量为 0.1ml/dl 培养基。

(4) 100μg/ml B<sub>12</sub> 注射液, 加量为 0.15ml, dl 培养基。

(5) 100μg/ml 孔雀绿溶液, 0.7kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 20min, 加量为 1ml/dl 培养基。

4. 03 号培养基琼脂预处理方法:

称取 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺 30mg, 加蒸馏水 100ml 溶解。称取优质琼脂粉装于试管内, 按 0.5ml/g 琼脂量加入上述溶液, 并补加适量蒸馏水, 使全部琼脂粉湿透。加上橡皮塞, 置 37°C 过夜即可。

另外, 03 号培养基基础液(1)的加量减半, 为 5ml/dl。

5. 全合成琼脂培养基制作步骤:

以配制 200ml 琼脂培养基为例: 先称取琼脂粉 3g, 置 250ml 三角烧瓶内, 然后依次加入基础液(1)、(2)和(3)各 20ml, 补水至 190ml 总体积。接着加入特殊补加组分, 并包装好。1kg/cm<sup>2</sup>

灭菌 30min, 取出, 按规定量趁热加入灭菌后补加溶液(1)(2)(3)(4)和(5)。充分摇匀, 每支试管分装 7ml 培养基, 放置斜面。琼脂凝固后盖紧橡皮塞, 置 4°C 冰箱保存。

### (三) 接种和培养

取冰箱保存的罗氏斜面菌种, 用 0.2% 吐温水溶液制成 1.0mg/ml 湿菌种子原液。然后依次稀释至 10<sup>-4</sup>mg/ml。取 10<sup>-2</sup>mg/ml (大接种量) 和 10<sup>-4</sup>mg/ml (小接种量) 二管接种, 每支斜面接种 0.1ml, 置 37°C 温箱培养。

### (四) 结果观察

快生长菌株从第二天开始观察, 每二天观察一次, 至 10 天止。慢生长菌从第三天开始观察, 2 周内, 每二天观察一次, 至 6 周止。观察结果时应记下菌落数, 菌落形态、大小、颜色和干湿等特征。培养结束后, 随即涂片, 抗酸染色后镜检, 详细记录各合成培养基上生长物的抗酸性及菌体大小等特征。

## 结 果

### (一) 菌株在全合成琼脂培养基上的生长试验

9 株分枝杆菌大种量时在全合成培养基上的生长情况列于表 2。人型分枝杆菌在 03、05 号培养基上不生长, 在 08 号培养基上培养 4 周后, 才有 10 余个菌落出现。人型分枝杆菌在 06 号培养基上 16 天见到菌落, 比罗氏培养基稍晚, 其最高生长量也

表2 全合成琼脂培养基和罗氏培养基的比较(大接种量)\*

Table 2 Comparison of completely defined agar media and Lowenstein-Jensen medium (large inoculum)\*

受试菌株 Strains tested	初生长时间(d) The time of initial growth							生长量** The quantity of the growth**						
	罗氏	03	04	05	06	07	08	罗氏	03	04	05	06	07	08
人型分枝杆菌 ( $H_{37}R_v$ ) <i>M. tuberculosis</i>	13	—	23	—	16	18	28	++++	—	++	—	++	++	+
牛型分枝杆菌 <i>M. bovis</i>	8	—	—	—	—	—	—	+++	—	—	—	—	—	—
堪萨斯分枝杆菌 <i>M. kansasii</i>	10	12	14	0	10	10	10	++++	++++	++++	0	+++	+++	+++
猿分枝杆菌 <i>M. simiae</i>	7	7	4	4	0	0	0	++++	++++	++++	++++	0	0	0
鸟分枝杆菌 <i>M. avium</i>	10	7	7	7	7	7	7	+++	+++	+++	++++	+++	+++	+++
胞内分枝杆菌 <i>M. intracellulare</i>	9	7	12	7	7	9	7	++++	++++	++	+++	++++	+++	++++
淋巴分枝杆菌 <i>M. scrofulaceum</i>	10	7	10	7	7	7	6	+++	++++	++++	++++	++++	+++	++++
偶发分枝杆菌 <i>M. parafortuitum</i>	4	2	0	0	0	0	0	++++	++++	0	0	0	0	0
耻垢分枝杆菌 <i>M. smegmatis</i>	2	2	—	2	0	0	0	++++	++++	—	++++	0	0	0

\* 每支斜面接种量为  $10^{-3}$ mg 湿菌。

\*\* 计算生长量的时限:慢生长 6 周;快生长 1 周。

\*\*\* "0" 表示没有作试验;"—"不生长;"+" 1—50 个菌落;"++"大于 50 个菌落,少于 300 个菌落;"+++"&gt;

\* The quantity of inoculum is  $10^{-3}$ mg humid cells per slant.

\*\* The time limit of the final quantity of the growth:6 weeks for slowly growing mycobacteria and one week for rapidly growing mycobacteria.

\*\*\* "0" Not being tested; "—" No growth; "+" 1—50 colonies; "++" More than 50 and less than 300 colonies; "+++"&gt;

少于罗氏培养基。

一株在罗氏培养基上反复传代的牛型分枝杆菌,在 06、07 和 08 号全合成培养基上出现少量快生长菌,大接种量时 4 天就能看到菌落(图版 I-1)。标准牛型菌株在接种量大于 0.1mg 时,仅在 06 号培养基上出现少数菌落,在其它全合成琼脂培养基上均无生长。

重要的致病非典型分枝杆菌,如鸟型(图版 I-2)、胞内、淋巴(图版 I-3)、猿型

和偶发(图版 I-4)标准菌株,加大接种量时在全合成琼脂培养基上的生长速度快于罗氏培养基或相同,其生长量也与罗氏培养基相似。实验结果表明:接种量越大,分枝杆菌在全合成琼脂培养基上的生长速度比在罗氏培养基上,就显得更快。这一结果显示全合成琼脂培养基用于药敏试验的价值。

尽管试验过的非典型分枝杆菌,大接种量时在全合成琼脂培养基上几乎都能生

表3 全合成琼脂培养基和罗氏培养基的比较(小接种量)\*

Table 3 Comparison of completely defined agar medium and Lowenstein-jensen medium (small inoculum)\*

受试菌株 Strains tested	初 生 长 时 间 (d) The time of initial growth				生长菌落 The quantity of the growth (colony counts)**			
	罗氏	06	07	08	罗氏	06	07	08
人型分枝杆菌 ( $H_{37}R_v$ ) <i>M. tuberculosis</i>	16	21	27	—	72	16	5	—
牛型分枝杆菌 <i>M. bovis</i>	10	—	—	—	—	—	—	—
堪萨斯分枝杆菌 <i>M. kansasii</i>	12	10	12	9	173	84	35	49
猿分枝杆菌 <i>M. simiae</i>	10	7	7	7	52	36	33	59
鸟分枝杆菌 <i>M. avium</i>	13	13	10	9	103	47	77	85
胞内分枝杆菌 <i>M. intracellular</i>	12	9	12	9	43	37	31	49
淋巴分枝杆菌 <i>M. scrofulaceum</i>	14	10	10	9	25	37	19	31
偶发分枝杆菌 <i>M. parafortuitum</i>	4	2	4	2	17	13	13	21

\* 每支斜面接种量为  $10^{-7}$ mg 湿菌。

\*\* 计算生长量的时限:慢生长菌6周,快生长菌1周。

\* The quantity of inoculum is  $10^{-7}$ mg humid cells per slant.

\*\* The time limit of the final quantity of the growth: 6 week for slowly growing mycobacteria and one week for rapidly growing mycobacteria.

长,但培养基中不同补加物对其生长速度和生长量均有重要影响。磷酸盐减半和对琼脂作前处理,似乎能促进淋巴分枝杆菌和胞内分枝杆菌加快生长。而加有琥珀酸钙和透明质酸的05号培养基能明显地促进鸟分枝杆菌加快生长和生长旺盛。

受试分枝杆菌小接种量时,在全合成培养基上的生长情况列于表3。很明显,人型分枝杆菌小接种量时,只在06、07号培养基上出现菌落,菌落数也远低于罗氏培养基。在小接种量时(每支斜面接种约  $10^{-7}$ mg 湿菌),牛型分枝杆菌在全合成培养基上均无生长。当接种量增至0.1mg湿菌时,06号培养基上出现少数菌落,初生长时间为5周。

小接种量时,非典型分枝杆菌同样能很好地生长于全合成培养基上。其初生长天数一般也少于罗氏培养基,在斜面上菌落数除偶发、淋巴分枝杆菌外,一般均少于或略少于罗氏培养基。原因之一,可能与琼脂培养基斜面上保留接种液的量较少有关。

试验时发现,有些分枝杆菌菌株在全合成琼脂培养基上生长出二种不同的菌落,如鸟型、偶发和胞内等分枝杆菌,均出现了二种不同形状、颜色、干湿度或不同生长速度的菌落。

## (二) 基础液筛选试验和气体环境试验

本研究对基础液进行过筛选。现有基

础液分为三部分。第一部分是磷酸盐,兼有营养和缓冲剂二种功能。磷酸盐减半能促进一些分枝杆菌的初生长。基础液(3)含有生长促进剂,在全合成琼脂培养基中补加这些生长促进剂,能使大多数分枝杆菌菌株更好地生长。但较快生长的分枝杆菌对生长促进剂没有明显的需要。对多数菌株而言,省去生长促进剂中的一种或二种,对生长无影响。实验结果表明,多数试验菌株单用尿嘧啶或乳清酸可以代替AMP和鸟粪苷钠盐。用 $2\mu\text{g/ml}$  Zn 可以代替硒酸钠( $5\mu\text{g/ml}$ )。培养基中甘油的浓度, $0.5\text{ml/dl}$ — $1.0\text{ml/dl}$  均可。 $1.0\text{ml/dl}$  甘油对促进生长有利。加大甘油浓度至 $2\text{ml/dl}$  时,对多数分枝杆菌的生长均产生抑制作用。

此外,我们用重碳酸钠( $\text{NaHCO}_3$ )加硫酸的方法,让 $37^\circ\text{C}$  温箱含有大约 $5\%$   $\text{CO}_2$ 。初步试验结果表明: $5\%$   $\text{CO}_2$  环境对分枝杆菌在全合成培养基上的初生长有促进作用,且能促进旺盛生长。

### (三) 抗酸染色及镜检结果

涂布镜检结果表明,在全合成琼脂培养基上生长的分枝杆菌,仍保持其抗酸性。但形态上与罗氏培养基上的生长物不尽相同。淋巴分枝杆菌在罗氏培养基上的生长物呈长形杆菌,有分枝,而在08号培养基上生长时,呈典型的短杆菌(图版II)。鸟分枝杆菌在06、07、08号培养基上的生长物呈典型的分枝形态(图版II)。

## 讨 论

早在五十年代, Middlebrook 就研制出含牛血清白蛋白组分V和过氧化氢酶的7H系列琼脂培养基<sup>[10]</sup>。1980年,郑翼宗和高东哲等报道了1%溶血半流体培养基,该培养基含0.5%的琼脂,可用于痰菌分离和药敏试验<sup>[11]</sup>。迄今,可供分枝杆菌生

长的全合成琼脂培养基尚未见有报道<sup>[12]</sup>。而分枝杆菌的营养、生理、生物化学与遗传变异,以及分枝杆菌的药敏和耐药机制等研究工作,都需要一种适合分枝杆菌生长的全合成固体琼脂培养基。制备不含异种蛋白的表面培养菌抗原,也需要全合成固体琼脂培养基。传统的看法,认为琼脂中含有对分枝杆菌有害的物质,例如脂肪酸等<sup>[13]</sup>。近百年来,人们在研究分枝杆菌的营养需要和筛选生长促进因子方面,进行了艰难繁重的大量调查<sup>[14,15]</sup>,但所得结果与所期望的进展,相差很大<sup>[16]</sup>。这一切使人们对研究新的培养基特别是全合成固体琼脂培养基的时间推迟了。

本文报道了一种适合分枝杆菌属多种菌生长的全合成琼脂培养基系。麻风分枝杆菌以外的各类试验过的分枝杆菌均能在我们提出的琼脂培养基上生长,尽管生长速度和生长量不尽相同。这一结果为进一步研究适合各种分枝杆菌或特定分枝杆菌生长,适合不同用途的固体琼脂培养基提供可能。而且,由于全合成琼脂培养基中使用了国产试剂和制作方法简便,为进一步的研究工作带来方便。

牛型分枝杆菌在罗氏培养基上生长缓慢而贫乏<sup>[17]</sup>。本研究发现,一株经反复传代的牛型菌株群体中,大约有1%细胞可在06、07和08号琼脂培养基上快速生长。这一结果的意义在于:它指出缓慢生长并非“慢生长分枝杆菌”的固有特征,在一定条件下,慢生长分枝杆菌可以较快地生长。另一方面,它也表明,侵染人体的慢生长分枝杆菌,如在体内某种特定环境下,其中少数细胞也有可能快速生长。

在分枝杆菌的菌种分型工作中,牛型和人型分枝杆菌的鉴别较困难<sup>[18]</sup>。本研究表明:当每支斜面的接种量少于 $10^{-7}$  mg 湿菌时,人型分枝杆菌在06、07号全合

成琼脂培养基上出现生长,而牛型分枝杆菌在上述培养基上无生长。因此,06号全合成琼脂培养基可用于鉴别牛型和人型分枝杆菌。

镜检结果表明,生长在06、07和08号全合成琼脂培养基上的鸟型分枝杆菌呈典型的分枝形态,而生长在这些培养基上的胞内分枝杆菌呈正常抗酸杆菌形态。这一情况说明上述培养基可能为区分这二种难以区分的分枝杆菌提供一种方法。

牛型、胞内、鸟型等分枝杆菌标准株在某些全合成琼脂培养基上,出现形态、颜色、干湿或生长速度不同的二种菌落。这一现象表明,全合成琼脂培养基也有可能用于标准菌株的纯化和鉴定。对这些不同生长速度的菌落,其营养、毒力、免疫原性和耐药性等特征,是否也存在差异,这方面待作进一步的探索。

### 参 考 文 献

[1] Steven, A. S. et al.: *Amer. Rev. Respir. Dis.*, **134**: 642—643, 1986.

- [2] Douglas, B. Y. et al.: *Infection and Immunity*, **55**(6): 1421—1425, 1987.
- [3] Jelle, E. R. J. et al.: *ibid.*, **55**(6): 1466—1475, 1987.
- [4] Dearborn, E. et al.: *Amer. Rev. Respir. Dis.*, **134**: 1062—1071, 1986.
- [5] 王宠林: *中华结核和呼吸系疾病杂志*, **10**: 174—176, 1987。
- [6] Eugene, T. E. et al.: *Amer. Rev. Respir. Dis.*, **134**: 442—445, 1986.
- [7] Centreras, M. et al.: *ibid.*, **133**: A371, 1986.
- [8] Veej, G. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **22**(4): 543—546, 1985.
- [9] Growford, J. T. et al.: *Amer. Rev. Respir. Dis.*, **134**: 659—661, 1986.
- [10] Middlebrook, C.: *A. J. P. H.*, **48**(7): 844—853, 1958.
- [11] 郑翼宗等: *中华结核和呼吸系疾病杂志*, **3**(3): 21, 1980。
- [12] Rettiledge, C. et al.: *The biology of mycobacteria*, London: Academic Press, 1982.
- [13] 桥本逸一郎等: *中华结核病科杂志*, **1**: 83, 1985。
- [14] 匡铁吉等: *微生物学报*, **25**(3): 276—280, 1985。
- [15] 匡铁吉等: *微生物学报*, **26**(4): 350—355, 1986。
- [16] Long, E. R.: *The chemistry and chemotherapy of tuberculosis*, The Williams & Wilkins, Company, 3rd ed., 1958.
- [17] 单菊生等: *中华结核和呼吸系疾病杂志*, **7**(1): 10—12, 1984。
- [18] Maureen, V. C. F.: *Mycobacteria*, Bristol, London, Boston, 1982.

# A STUDY ON COMPLETELY DEFINED AGAR MEDIA FOR MYCOBACTERIA

Kuang Tieji Wang Liping

(No. 309 Hospital of the People's Liberation Army, Beijing)

A serial of completely defined agar media suitable for growth of the common mycobacteria which are pathogenic was reported in this paper. A tool was supplied for the study of mycobacteria on nutrition and physiology, biochemical feature, genetics and variation and on the mechanism of resistance and susceptibility to antimicrobial drug, and with it would be in favour of developing more satisfactory media for mycobacteria. The majority of strains of the mycobacteria tested grew more rapidly on the completely defined agar media than on Lowenstein-Jensen medium and the final yield of the microbes on the

agar media was less than or equal to those on Lowenstein-Jensen medium. There were only small amounts of growing cells on the completely defined agar media among the strain of mycobacterium bovis. Colonies with the above mentioned two different patterns were found to grow on the completely defined media from mycobacterium avium, *M. intracellulare* and *M. fortuitum*.

## Key words

*Mycobacterium*, Completely defined agar medium

## 图 版 说 明

Explanation of plates

### 图 版 I

1. 一株反复传代的牛型分枝杆菌大接种量时,在 06、07 和 08 号全合成琼脂培养基上出现的快生长菌落。
2. 胞内分枝杆菌在 06、07、08 号全合成培养基和罗氏培养基上的生长物。
3. 淋巴分枝杆菌在 06、07、08 号全合成培养基和罗氏培养基上的生长物。
4. 偶发分枝杆菌在 07、08 号全合成培养基和罗氏培养基上的生长物。

### 图 版 II

- A—B. 生长在罗氏(A)和 08 号(B)全合成琼脂培养基上的淋巴分枝杆菌生长物涂片(×1000)。  
C—D. 生长在 06 号(C)和 07 号(D)全合成琼脂培养基上的鸟分枝杆菌生长物涂片(×1000)。

### Plate I

1. The rapidly growing colonies of a strain through serial passage of *Mycobacterium bovis* arose on the completely defined agar medium 06, 07 and 08 when large inoculum was given L-J, Lowenstein-Jensen medium.
2. The growth of *M. intracellulare* on the media 06, 07, 08 and L-J.
3. The growth of *M. scrofulaceum* on the media 06, 07, 08 and L-J.
4. The growth of *M. fortuitum* on media 07, 08 and L-J.

### Plate II

- A—B. The smear of culture, *M. scrofulaceum* grown on the slants of Lowenstein-jensen medium (A) and the completely defined agar medium 08 (B).  
C—D. The smear of culture, *M. avium* grown on the slants of the completely defined agar medium 06 (C) and 07 (D).