

分枝杆菌属的分离和快速鉴定方法

梁丽糯 阮继生 阎逊初

(中国科学院微生物研究所,北京)

分枝杆菌属的分离和快速鉴定,不仅是放线菌分类学中的重要问题,而且也为临床非典型分枝杆菌疾病的诊断提供依据。

国际上研究过的分枝杆菌多从病灶中分离得到。到目前为止,很少有人较系统地报道从非病灶材料中分离这类微生物。为了更全面地研究分枝杆菌分类学,我们从采自国内和美国的370份土样中分离得到了48株抗酸菌,确定了从土样中分离快生长型分枝杆菌的培养基。

由于诺卡氏菌(*Nocardia*)有部分抗酸菌,只用形态学和生理生化特性难以把它们与快生长型分枝杆菌区分开。诺卡氏菌属和分枝杆菌属的DNA中GC克分子百分比含量相同,细胞壁都属IV型,它们又有免疫交叉反应,这些也都难以作为区分它们的依据。

Lancele-Carrieu 1969年证实了棒状杆菌属、分枝杆菌属和诺卡氏菌属各自含有特异的枝菌酸。Lechevalier等1971年用化学和气相层析法分离提纯并分析了枝菌酸,将分枝杆菌属和诺卡氏菌属明确分开。但这方法操作复杂,既费时又需要昂贵的仪器。Kanetsuna等^[1]用化学方法分离提纯并分析了枝菌酸和诺卡氏枝菌酸,简单快速地把分枝杆菌属和诺卡氏菌属区分开,但是他们只限于对已知种的研究。我们采用Kanetsuna的方法,对30株未知的抗酸菌、2株已知分枝杆菌和2株诺卡氏菌的枝菌酸进行了分离提纯和分析。现将其结果报道于

下。

材 料 和 方 法

(一) 菌种来源

耻垢分枝杆菌, (*Mycobacterium smegmatis*) AS 1.1, 偶发分枝杆菌 (*M. fortuitum*) AS 1.513 由中国科学院微生物研究所提供,星状诺卡氏菌 (*N. asteroides*), *Nocardia* A 30 由中国科学院微生物研究所细菌分类室提供。菌株82-7, 82-8 从美国佛罗里达州土壤中分离得到; 80-1, 80-4, 80-5, 80-7, 80-8, 80-9, 80-10, 80-20, 80-21, 80-31, 80-33, 80-34, 80-36, 80-37 和 80-38 分离自广西土壤; 80-12, 80-13, 80-25 和 80-40 分离自北京土壤; 80-15, 80-16, 80-19 和 80-13 分离自贵州土壤; 80-24 分离自福州土壤; 80-2 分离自上海土壤; 80-6 分离自广东土壤; 80-28、80-29 分离自云南土壤。

(二) 菌种分离

采用常规的土样稀释液在固体培养基上分离培养方法。

分离培养基; 葡萄糖天门冬素琼脂; 罗氏 (Lowenstein-Jensen) 培养基; 石蜡培养基; 肉脔

本实验除国内土样分离外, 都是在美国康奈尔大学完成的。刘志恒同志协助进行菌种筛选, 谨致谢意。

培养基添加 0.02% 孔雀石绿液。置 28℃ 培养 3—7 天。挑选与细菌菌落形状相似的菌落,连同培养皿翻转置显微镜(16 × 10)下观察,见边缘不整齐或有短分枝的菌落,挑入分离培养基斜面上。

(三) 分枝杆菌属的鉴定

1. 抗酸染色^[2]

菌株接种在罗氏斜面,28℃ 培养 5 天,涂片染色。

2. 枝菌酸和诺卡氏枝菌酸的提取^[4]

菌株接种在 500ml 三角瓶内装有 100ml 的改良瓦氏液体培养基中(酵母膏 5g,葡萄糖 5g,营养液 1g^[3],甘油 10ml,蒸馏水 1000ml,pH7.4 121℃ 灭菌 30 分钟),然后置 28℃ 摇床(120 转/分)培养 7 天。培养液先用抗酸染色镜检确定无杂菌后,置 121℃ 灭菌 30 分钟,杀死菌体,然后以 8000rpm 离心 10 分钟,收集菌体,再用无菌水洗三次,最后一次用 0.22μ 滤器,滤去多余的水份,得到的菌体用于提取枝菌酸或诺卡氏枝菌酸。枝菌酸的提取和分析重量重复 2—3 次。

结果和讨论

(一) 分离培养基的选择

将同一土样分别在 4 种培养基中分离快生长型抗酸菌,出菌率以肉脔孔雀石绿培养基为最高 12.1% (表 1)。

表 1 土样中的出菌数

| 培养基 | 石蜡 | 罗氏 | 肉脔 | 葡萄糖天门冬素 |
|--------|-----|----|------|---------|
| 出菌率(%) | 0.7 | 10 | 12.1 | 7.0 |

据文献报道^[2],罗氏培养基容易制备,同时能用于对绝大多数分枝杆菌的初分离、敏感试验、鉴定和扩大培养。在我们的试验中也得到了出菌率高达 10% 的结果,这与文献报道^[2]是一致的。

石蜡培养基的出菌率为 0.7%,它具有污染少,分离到的菌能利用石蜡的优点,但它出菌率

低,菌长得慢而微弱,我们认为此培养基可作为以石蜡为唯一碳源的分枝杆菌的特殊分离需要。

肉脔孔雀石绿培养基出菌率比其它三种高。从这种培养基中分离到的五株已鉴定的分枝杆菌中,有一株不能归于任何已知种。

葡萄糖天门冬素培养基虽然出菌率低于罗氏培养基和肉脔孔雀石绿培养基,但从葡萄糖天门冬素培养基中分离到的 16 株经鉴定的分枝杆菌中,有三株都不能归为已知种,而且这三株菌是不同源的。

综上所述,葡萄糖天门冬素培养基和肉脔孔雀石绿培养基作为从土样中分离快生长型分枝杆菌是可以采用的,而罗氏培养基虽然出菌率较高,但它的制备和使用后器皿的洗涤都比较麻烦,可用于分离致病分枝杆菌。

(二) 枝菌酸鉴定

Kanetsuna 等人分别从鸟分枝杆菌 (*M. avium*), 牛分枝杆菌 (*M. bovis*), 偶发分枝杆菌, 草分枝杆菌 (*M. phlei*), 耻垢分枝杆菌, 结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*), *M. sp. M. sp. Rabinowitch*, *M. sp. 521*, *M. SPPI* 等 14 株分枝杆菌, 星状诺卡氏菌 (*N. asteroides*), 巴西诺卡氏菌 (*N. brasiliensis*), 豚鼠分枝杆菌 (*N. caviae*), *N. sp. 244* 的 28 株诺卡氏菌以及 6 株红色分枝杆菌 (*M. rhodochrous*) 中提取了枝菌酸, 分枝杆菌每克湿菌体含枝菌酸 10 mg 左右, 熔点低于 70℃; 诺卡氏菌每克湿菌体含诺卡氏枝菌酸少于 2 mg 或甚至测不出来, 熔点 80℃ 左右或高于 150℃; 红色分枝杆菌不含枝菌酸。我们从 30 株未知抗酸菌以及 *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *N. asteroides* 和 *Nocardia A30* 中提取了枝菌酸, 所得结果(表 2) 表明, 与 Kanetsuna 等人的结果一致。在 30 株未知抗酸菌中枝菌酸含量最低, 为 9.8mg/g 菌体, 含量最高为 108.8mg/g 菌体, 最高熔点 65℃, 最低熔点 38℃。从抗酸染色和枝菌酸的结果表明, 这 30 株未知抗酸菌可定为分枝杆菌属。我们的实验结果所示, 在仪器设备短缺的情况下, 用 Kan-

表 2 枝菌酸的含量及熔点

| 菌 株 | 枝 菌 酸 | | 菌 株 | 枝 菌 酸 | |
|-------|---------|--------|---------|---------|--------|
| | mg/g 菌体 | 熔点(°C) | | mg/g 菌体 | 熔点(°C) |
| 82-7 | 20.8 | 56 | 80-21 | 26.7 | 59 |
| 82-8 | 9.8 | 56 | 80-24 | 64.2 | 65 |
| 80-1 | 18.3 | 49 | 80-25 | 34 | 44 |
| 80-2 | 25.2 | 48 | 80-28 | 108.8 | 47 |
| 80-4 | 39.7 | 48 | 80-29 | 27.8 | 52 |
| 80-5 | 37.1 | 46 | 80-30 | 16.7 | 50 |
| 80-6 | 10.3 | 45 | 80-31 | 29.1 | 42 |
| 80-7 | 39.1 | 45 | 80-33 | 46.4 | 40 |
| 80-8 | 20.1 | 50 | 80-34 | 17.8 | 49 |
| 80-9 | 46.9 | 55 | 80-36 | 32.0 | 45 |
| 80-10 | 38.4 | 52 | 80-37 | 59.0 | 49.5 |
| 80-12 | 41.5 | 62 | 80-38 | 12.2 | 51 |
| 80-13 | 78.5 | 52 | 80-40 | 50 | 38 |
| 80-15 | >14 | 50 | As1.1 | 15.8 | 53 |
| 80-16 | 31.1 | 50 | As1.513 | 42.0 | 65 |
| 80-19 | 18.5 | 59 | 星状诺卡氏菌* | 0 | — |
| 80-20 | 20.0 | 45 | N.A 30* | 0 | — |

* 为诺卡氏枝菌酸。

tsuma 方法提取的枝菌酸作为对未知抗酸菌“属”的鉴定是快速而可靠的。

参 考 文 献

[1] Kanetsuna, F. and A. Bartoli: J. Gen. Microbiol,

70: 209—212, 1972.

[2] Maureen, V. Chadwick: Wright P. SG. Bristol, London, Boston, 1982.

[3] Difco Laboratories Incorporated Detroit 1, Michigan, 1953.