

抗酸菌 L 型 TSA-L 培养基的改进

庄玉辉 李国利 韩元华

(中国人民解放军 309 医院结核病研究室, 北京)

前文已介绍^[1], 培养抗酸菌 L 型的胰酪大豆蛋白胨琼脂培养基(TSA-L)是培养抗酸菌 L 型的一种较适宜的培养基。但其中一些成份来源不方便, 制作手续较麻烦, 我们试以改进, 结果如下。

材 料 和 方 法

1. 菌种: 强毒人型结核菌 ($H_{37}R_v$) 和无毒人型结核菌 ($H_{37}Ra$) 由北京市结核病研究所提供。堪萨斯分枝杆菌与胞内分枝杆菌由卫生部药品生物制品检定所提供。

2. 培养基: TSA-L 参照高桥^[2]的配方制备。改良的 TSA-L 培养基的配方详见结果(三)。胰酪(英国 Oxoid); 大豆蛋白胨(上海东海制药厂); DL-蛋氨酸(德国 E. Merck);

氯化血红素结晶 (Haemin cryst, Karlsruhe wes pure, 660461); 日本琼脂粉 (I: 批号 821018, II: 批号 740103, 上海化学试剂分装厂); 海燕牌琼脂粉(青岛水产品加工厂, 纯化级), 琼脂糖(北京市红星生物化学制品厂, 批号: 820317)。

3. 诱导剂: D-环丝氨酸(日本明治制药), 以灭菌蒸馏水配制所需的浓度, 加入培养基内。

4. 种子培养物与接种: 在改良罗氏培养基上生长一周龄的上述菌种做为种子培养物。挑取菌苔研磨, 用生理盐水制成 1×10^{-1} mg/ml (湿重)菌悬液, 取 0.1ml 接种于平板上, 涂匀。

5. 培养条件: 平板培养置于 24cm 内径的玻璃干燥器内, 37°C, 烛罐培养法(罐内点燃蜡烛自灭, 经何氏气体分析仪测定, CO_2 浓度为 3.7%)。

6. 观察方法: 参照 Diene 琼脂块染色法, 在每个平板中心取一块 2.3×2.5 cm 的琼脂块, 用 0.1—0.3% 美蓝马血清(或水)液染色, 在 40×5 倍相差显微镜下观察 L 型菌落形态并计数。

结果与讨论

(一) 各厂家琼脂及琼脂糖对 L 型菌落生长的影响

L 型菌很脆弱, 在固体培养基上, 琼脂的质量和浓度对于 L 型菌落的生长关系很密切。有研究者报道需用 Noble 琼脂和高纯化琼脂甚或 PPLO 琼脂, 适宜浓度为 1%, 若超过 1.2% 则抑制菌生长^[4]。在预备试验中发现, 日本琼脂粉的个别批号及国产海燕牌琼脂条浓度在 1.25% 仍较软, 难于涂布。故本试验选用了日本琼脂粉 I、II 做为对照, 加入 $50 \mu\text{g/ml}$ D-环丝氨酸, 接种 $H_{17}\text{Ra}$ 株, 比较海燕牌琼脂粉、琼脂糖对 L 型菌落生长的影响, 上述 4 种支持物的浓度均为 0.8—0.9%, 培养 2 周, 结果见表 1。本试验重复 3 次, 3 种琼脂和琼脂糖的 L 型菌落数经 F 值测定, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。成熟的 L 型菌落占 50% 左右, 由球状体组成。实验组与对照组的 L 型菌落形态相似。培养 4 周, 重复 2 次, 菌落数及菌落形态均相似。结果表明, 4 种支持物没有差别, 海燕牌琼脂粉可代替日本琼脂粉用于 L 型菌的培养。因此, 在培养 L 型菌落时, 对于琼脂的质量和浓度均需要很好选择。

表 1 不同厂家琼脂及琼脂糖 L 型菌落数的比较

| 实验次数 | 日本琼脂粉 | | 海燕牌琼脂粉 | 琼脂糖 | F 值 |
|------|-------|------|--------|------|------|
| | I | II | | | |
| 1 | 22.8 | 26.6 | 36.8 | 30.8 | 3.21 |
| 2 | 24.2 | 17.4 | 20.5 | 22.6 | 2.04 |
| 3 | 28.4 | 24.4 | 27.8 | 25.0 | 0.43 |

注: 表内数据为 5 个平板活菌数的平均数

(二) 不同浓度的氯化血红素结晶对 L 型菌落生长的影响

在高桥^[2]的培养基原配方内加入的压缩马

红血球不易采得, 经煮沸后红血球易被破坏, 使培养基呈褐色且混浊。分析加红血球的目的可能是利用其中的某一成份。由此, 我们设计改良的 TSA-L 配方, 以加入不同浓度的氯化血红素结晶, 并进而去掉原配方中的活性炭, 不用煮沸、过滤。观察对 L 型菌落生长的影响, 试图以氯化血红素结晶代替马红血球。改进后的培养基清澈、透明。试验结果见表 2。从表 2 看出, 不同浓度的氯化血红素对 L 型菌落生长有影响。经 F 测定, 未加氯化血红素成份的培养基, L 型菌落数比原配方少, 两者有差异; 加入氯化血红素结晶 $25-50 \mu\text{g/ml}$ 与原配方比较无显著性差异 ($P > 0.05$); 加入 $100 \mu\text{g/ml}$ 时, 第二批试验有显著性差异 ($P < 0.05$), 而其它二批则无显著性差异 ($P > 0.05$); 加入 $150-200 \mu\text{g/ml}$ 时均有显著性差异 ($P < 0.05$)。培养 4 周的 L 型菌落数, 其规律与 2 周相似。L 型菌落的形态原配方组与 $25-150 \mu\text{g/ml}$ 氯化血红素组基本相似, 呈球状体, 菌落稍大; 而 $200 \mu\text{g/ml}$ 组, 呈颗粒状, 菌落较小。结果表明, $25-50 \mu\text{g/ml}$ 氯化血红素结晶可代替压缩马红血球, $100 \mu\text{g/ml}$ 组结果不稳定, 而 $150-200 \mu\text{g/ml}$ 对 L 型菌落的生长反而不利。

表 2 氯化血红素结晶不同浓度 L 型菌落数的比较

| 实验次数 | 原配方(对照) | 氯化血红素结晶浓度 ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | |
|------|---------|--------------------------------|------|------|------|------|------|
| | | 0 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 |
| 1 | 20.8 | 5.6 | 21.4 | 20.8 | 18.2 | 12.6 | 10.4 |
| 2 | 24.0 | 5.0 | 24.0 | 23.6 | 15.4 | 14.8 | 13.2 |
| 3 | 21.0 | 6.4 | 22.2 | 23.8 | 21.0 | 15.0 | 11.3 |

注: 表 2 数据为 5 个平板活菌数的平均数。

(三) 菌株的验证

改良的 TSA-L 培养基配方, A 组: 大豆蛋白胨 1g; 胰酶 3g; K_2HPO_4 0.5g; NaCl 1g; 胱氨酸 0.02g; 氯化血红素结晶 $25-50 \mu\text{g/ml}$; 蒸馏水加至 100ml。加 DL-蛋氨酸 0.2g; 调 pH 至 7.8。B 组: 蔗糖 50g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g; 琼脂粉(海燕牌、纯化级) 2.4g; 蒸馏水加至 200ml。C 组: 马血清 35ml。A、B 两组高压灭菌后, 与 C 组于 45°C 混合, 倾注平板。

(下转第 91 页)

(上接第95页)

表3 毒株在两种培养基上L型菌落数的比较

| | H ₃₇ Rv | 堪萨斯杆菌 | 胞内杆菌 |
|------|--------------------|-------|------|
| 原配方 | 30.3 | 22.0 | 27.0 |
| 改良配方 | 32.3 | 25.9 | 27.0 |
| F 值 | 0.64 | 2.42 | 0.00 |

注:表内数据为10个平板的活菌数的平均数。

强毒人型结核菌 H₃₇Rv 株接种于含有 50 $\mu\text{g/ml}$ D-环丝氨酸的培养基中,堪萨斯分枝杆菌和胞内分枝杆菌接种于含 200 $\mu\text{g/ml}$ D-环丝氨酸的培养基中,培养 11—14 天,观察 3 种毒株在原配方和改良的 TSA-L 培养基上 L 型菌落生长的情况。结果列于表 3。结果表明,3 种毒株在两种培养基上的 L 型菌落数分别经 F

值测定,均无显著性差异 ($P > 0.05$)。菌落形态亦基本相似,而堪萨斯分枝杆菌在改良 TSA-L 培养基上的 L 型菌落更为典型。

综上所述,改良的 TSA-L 培养基可代替高桥报道的 TSA-L 培养基用于抗酸菌 L 型菌的培养。

参 考 文 献

- [1] 庄玉辉等:中华结核和呼吸系疾病杂志,7(4): 210, 1984.
- [2] Takahashi S: *Kekkaku*, 54: 63, 1979.
- [3] Dienes L: *J. Infect. Dis.*, 69: 24, 1939.
- [4] Domingue J: Cell wall-deficient bacterial basic principle and clinical significance, p. 25 published simultaneously in Canada, manufactured in USA, 1982.