

土豆汤琼脂培养基培养分枝杆菌的研究

匡铁吉 王梨平

(解放军三〇九医院,北京)

摘要 本文报道了一种土豆汤琼脂培养基系统,试验过的 16 株各群分枝杆菌都能在该培养基上生长。大多数分枝杆菌在土豆汤琼脂培养基上的初生长时间快于罗氏培养基。分枝杆菌 H_3R_2 、鸟型、胃型、堪萨斯、脓肿、不产色和偶发等标准株,在一些土豆汤琼脂培养基上产生两种不同的菌落。初步的研究表明,土豆汤琼脂培养基还可用于胸水、痰内结核杆菌的培养。土豆汤琼脂培养基系用传统的琼脂培养基制作方法,价格低廉,适合在发展中国家的实验室和国内医院检验科推广使用。

关键词 分枝杆菌;土豆汤琼脂培养基

自 1882 年柯赫氏发现结核分枝杆菌以来,各国学者对分枝杆菌的营养和生理作了大量的研究^[1]。并证明甘油、脂肪酸、元素锌和含 2.5—10% CO_2 的气体环境有利于分枝杆菌的生长^[2,3]。1963 年, Hegny 证实丙酮酸能促进分枝杆菌生长^[4]。1982 年, Percy 报道了微量元素硒对分枝杆菌生长的促进作用^[5]。1986 年,作者报道了核酸前体物对结核杆菌 H_3R_2 和 BCG 生长的促进作用^[6]。基于上述研究成果,开发了众多以鸡蛋卵为主要成分的固体培养基^[7]。这些培养基用于分枝杆菌的分离培养,取得了较好的效果^[8,9]。Middle-brook 报道的 7H 系列琼脂培养基,已成功地广泛用于分枝杆菌分离培养和药敏试验^[10]。7H 琼脂培养基中含有牛血清白蛋白组分 V 和过氧化氢酶制剂。由于这两种组分价格昂贵,难于购到,故国内至今未见使用 7H 琼脂培养基报道。琼脂培养基在研究分枝杆菌菌落形态、耐药性测定和可早期观察结果等方面,具有一定优越性。我国是世界上结核病发病率较高的国家之一,结核病防治任务十分艰巨^[11]。研制适合我国和广大发展中国家使用的固体琼脂培养基,具有重要意义。本研究在这方面做了些工作,现报告如下:

材料和方法

(一) 菌株

分枝杆菌 H_3R_2 、牛型、堪萨斯、BCG 和不产色菌株,由北京市结核病医院基础研究所

提供。分枝杆菌 H_3R_2 、猿型、海型、淋巴、胞内、鸟型、脓肿、胃型、偶发和耻垢菌株,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^[12]。

土豆汤琼脂培养基的组成,配制方法和操作步骤如下:

1. 贮存基础液: (1) $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (3.8g), KH_2PO_4 (1.5g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (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), 加蒸馏水溶解上述组分后,再加蒸馏水至 100ml, 置 4℃ 冰箱存放。(2) 甘油 (5ml), 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), $Na_2SeO_4 \cdot 10H_2O$ (0.005g), 加蒸馏水溶解上述组分, 定容到 50ml, 4℃ 冰箱存放。(3) 甘油 (5ml), 葡萄糖酸钠 (0.5g), 丙酮酸钠 (0.5g), 尿嘧啶 (0.08g), AMP (0.05g), 加蒸馏水溶解上述组分后, 定容到 50ml, 4℃ 冰箱存放。

2. 琼脂基础液中补加物 (100ml 培养基内含): 91 号、92 号培养基: 甘油 (0.5ml), 琥珀酸钙 (15mg)。53 号培养基: 胸腺嘧啶 (0.0025g), 黄嘌呤 (0.0025g), 苯丙氨酸 (0.04g)。上述补加组分均在琼脂基础液灭菌前加入。

3. 琼脂基础液灭菌后补加液 [溶液 (1),

(2)、(3)、(5)和(6)四种琼脂培养基均加1:

(1) 40% 葡萄糖溶液,加量为 0.5ml/dL 培养基。

(2) 2% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液,加量为 0.5ml/dL 培养基。

(3) 泛酸钙10mg,硫胺素 5mg, B_6 5mg,加蒸馏水 5ml 溶解, 加量为 0.1ml/dL 培养基。

(4) 半胱氨酸 0.4g, 加蒸馏水 5ml 溶解,加量为 0.5ml/dL 培养基 (仅在 53 号培养基中补加)。

(5) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 孔雀石绿溶液,加量为 1ml/dL 培养基。上述各溶液均单独配制,并于 0.7kg/cm² 灭菌15分钟。

(6) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ B_{12} 注射液,加量为 0.15ml/dL 培养基。

(7) 小牛血清,加量为 5% (仅在 92 号培养基中补加)。

4. 土豆汤制备方法: 称取市售土豆1000g,洗净后,切成 10g 左右的土豆块,置玻璃烧杯内,加入蒸馏水 1100ml,烧开后将火调小,继续煮沸 30 分钟。然后趁热用单层白布袋过滤。收集滤液,补水至 1000ml。凉至室温后置 4℃ 冰箱约 24 小时。取出,小心倾出上清,即为土豆汤。制好的土豆汤应当天用完。

5. 土豆汤琼脂培养基制作步骤表 1: 上述

表 1 土豆汤琼脂培养基基础液配制方法

组 分	100ml 土豆汤琼脂培养基加量			
	41 号	53 号	91 号	92 号
琼脂粉(g)	1.5	1.5	1.5	1.5
贮存基础液(1)(ml)	5	10	10	10
贮存基础液(2)(ml)	5	/	5	5
贮存基础液(3)(ml)	/	5	/	/
土豆汤(ml)	70	80	80	80
蒸馏水 (ml)	15	/	/	/

基础液中加入补加组分,包装好,于 1.1kg/cm² 灭菌 30 分钟。取出,趁热按规定量分别加入灭菌补加液。小牛血清待培养基温度降至 60℃ 左右方可加入。充分摇匀,每支试管分装 7ml 培养基,放置斜面,斜面置 6℃ 冰箱保存。

6. 三种简易土豆汤琼脂培养基: 309 号培

养基: 琼脂粉 1.5g,蛋白胨 0.3g,甘油 0.5ml,孔雀石绿 0.1mg,土豆汤 100ml,包装好, 1.1kg/cm² 灭菌 30 分钟后分装斜面。

22号培养基: 琼脂粉 1.5g,加贮存液(1) 10ml, 甘油 1.2ml, 孔雀石绿 0.1mg,土豆汤 90ml,1.1kg/cm²灭菌 30 分钟后,加补加液(1)、(2)和(3),再加小牛血清 5ml,混匀后分装斜面。

23 号培养基: 琼脂粉 1.5g,加基础液(1) 10ml,基础液(3) 5ml, 甘油 0.7ml,孔雀石绿 0.1mg,土豆汤 80ml, 1.1kg/cm² 灭菌 30 分钟后,加补加液(1)和(2),加小牛血清 5ml,摇匀后分装斜面。

(三) 接种、培养和结果观察

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 10⁻⁴mg/ml。取 10⁻²mg/ml (大接种量)和 10⁻⁴mg/ml (小接种量)二管接种,每支斜面 0.1ml,置 36℃ 温箱培养。

快生长菌从第二天开始观察结果,每二天看一次,至第 10 天止。慢生长菌第三天开始观察结果,每二天一次,至二周。以后每周观察一次结果至 6 周止。培养结束后,随即涂片,经抗酸染色后镜检。

(四) 结核病患者痰标本的前处理和接种

1. 用 50ml 带盖广口瓶收集痰液 4—5ml,加激活的胰蛋白酶溶液 0.5ml,加 5% 碳酸氢钠溶液 0.5ml。

2. 充分搅拌,振摇 5 分钟后置 40℃ 水浴中保温 30 分钟。再加入激活的胰蛋白酶溶液 0.5 ml,摇匀后在 40℃ 水浴中继续反应 30 分钟。加入无菌蒸馏水 25ml,充分摇匀后,用带盖的塑料离心管,3,000r/min 离心半小时,弃上清。

3. 取沉淀物加入 15ml 0.1mol 柠檬酸三钠溶液和 15ml 0.5N NaOH 溶液。摇匀后作用 20 分钟,3,000r/min 离心半小时,弃上清。

4. 上述沉淀物中加入含 2% 牛血清白蛋白、0.002% 溴百里酚兰及 1% 鸡蛋清的无菌生理盐水溶液 0.5ml,用 1NHCl 调 pH 至中性。摇匀,分别取 0.1ml 接种罗氏和土豆汤琼脂斜面,

置 36℃ 温箱培养。

(五) 结核性胸水的收集和接种

配制 10% 柠檬酸三钠溶液, 分装于小试管中, 每管 1ml, 包装好, 1.1kg/cm² 灭菌 20 分钟。置冰室中保存待用。每管收集结核病人胸水 4—6ml, 立即摇匀, 3000r/min 离心 30 分钟, 沉淀中加入 0.5ml 生理盐水, 摇匀后接种罗氏和土豆汤斜面, 每支斜面接种 0.1ml。置 36℃ 温箱培养。

结 果

11 株分枝杆菌大接种量时在土豆汤琼脂培养基上的生长结果列于表 2 中。表 2 结果说明有些分枝杆菌如胞内、猿型和偶发等, 在土豆汤琼脂培养基上比在罗氏培养基上生长得更旺, 而胃型和牛型等分枝杆菌的生长物则不如在罗氏培养基上生长旺盛。大量接种时, 大多数菌株在土豆汤琼脂培养基上的初生长速度快于罗氏培养基。当斜面接种量达到 10⁻²mg 湿重时, 人型结核杆菌在 41 号和 53 号培养基上, 第三天就出现可见生长物。

7 株分枝杆菌小量接种时在土豆汤琼脂培养基上的生长结果列于表 3。表 3 结果说明, 所试分枝杆菌小接种量时在土豆汤琼脂培养基上的生长速度, 多数仍快于罗氏培养基。但不

加血清的琼脂培养基上的菌落数一般不如罗氏培养基上多, 尤其是培养结核分枝杆菌时, 这一差别更明显。

增加土豆汤琼脂培养基中的甘油浓度, 使之不超过 2.0ml/dL 培养基时, 对结核分枝杆菌的初生长和后生长都有利。53 号土豆汤琼脂培养基中补加明胶或蛋白胨, 对耻垢、鸟、猿、堪萨斯、不产色和淋巴等分枝杆菌的生长有显著的促进作用。

除土豆汤外, 我们也试验过西葫芦汤、黄瓜汤、油菜汤和豆角汤等。这些蔬菜的煮沸浸液均不能取代土豆汤, 但若以小量与土豆汤并用, 如在 41 号培养基中加入少量的油菜煮浸液, 或加少量西葫芦和豆角煮浸液, 对结核分枝杆菌的生长均有一定促进作用。

大多数非典型分枝杆菌在大量接种时, 都能在 309 号培养基上生长。而结核分枝杆菌在 309 号培养基上不生长。所试分枝杆菌菌株都能在含有小牛血清的 22 号和 23 号简易培养基上生长。22 号和 23 号培养基用于分离临床标本中的抗酸杆菌, 其效果近似于罗氏培养基。

分枝杆菌 H₃₇R₁、H₃₇R₄、鸟型、胃型、堪萨斯、脓肿、不产色和偶发等分枝杆菌, 在不含小牛血清的土豆汤琼脂培养基上出现形态、颜色、干湿或生长速度等很不相同的菌落。在含青霉

表 2 土豆汤琼脂培养基和罗氏培养基的比较(大接种量)*

受试菌株	初生长时间(天)					生长量**				
	罗氏	41	53	91	92	罗氏	41	53	91	92
人型分枝杆菌 (H ₃₇ R ₁)	12	12	0	10	8	++++	++++	○	++++	++++
牛型分枝杆菌	12	14	0	10	10	++++	++	○	+++	++++
堪萨斯分枝杆菌	9	10	9	9	9	++++	++++	++++	++++	++++
猿分枝杆菌	5	5	3	3	3	++++	++++	++++	++++	++++
海分枝杆菌	6	3	3	3	3	++++	++++	++++	++++	++++
淋巴分枝杆菌	9	7	9	7	7	++++	++++	++++	++++	++++
胞内分枝杆菌	9	7	7	7	7	++++	++++	++++	++++	++++
鸟分枝杆菌	10	10	9	7	7	+++	++	+++	+++	+++
脓肿分枝杆菌	12	10	0	7	7	++++	++++	○	++++	++++
偶发分枝杆菌	4	2	2	2	2	++++	++++	++++	++++	++++

注: * 每支斜面接种量为 10⁻³mg 湿菌

** “○”没有作过试验; “++”大于 50 个菌落, 少于 300 个菌落; “+++”大于 300 个菌落; “++++”成菌苔生长

表 3 土豆汤琼脂培养基和罗氏培养基的比较(小接种量)

受试菌株	初生长时间(天)					生长量(菌落数)				
	罗氏	41	53	91	92	罗氏	41	53	91	92
人型分枝杆菌 (H ₃₇ R ₁)	13	12	8	11	10	59	32	44	35	53
牛型分枝杆菌	12	12	14	12	12	150	50	36	165	160
堪萨斯分枝杆菌	10	12	0	12	10	>200	>200	0	>200	>200
淋巴分枝杆菌	14	7	0	7	7	158	149	0	200	191
胞内分枝杆菌	13	7	7	7	7	14	>200	>200	>200	>200
鸟分枝杆菌	12	12	12	11	10	152	6	98	217	193
偶发分枝杆菌	4	4	4	4	4	200	250	245	230	213

注:每支斜面接种量为 10^{-4} mg 湿菌

素的土豆汤琼脂培养基上,出现不同菌落的菌株最多。

土豆汤琼脂培养基上的分枝杆菌生长物,抗酸染色均为阳性。但其菌体粗细长短与对照罗氏培养基上的生长物不尽相同。

初步研究表明,土豆汤琼脂培养基可用于痰和胸水结核杆菌的分离培养(表4)。此外,试验结果还表明:土豆汤琼脂培养基用于分枝杆菌直接或间接药敏试验,结果迅速准确。用于空气采样抗酸菌分离培养,效果也令人鼓舞,上述研究还在进行中。

表 4 琼脂培养基用于胸水和痰结核杆菌分离的效果

样 品	例数	阳性标本数(%)	
		罗氏	琼脂培养基
结核性胸水	22	3(13.6)	3(13.6)
菌阳痰	10	9(90.0)	9(90.0)

注:胸水用 23 号琼脂培养基,痰用 92 号琼脂培养基

讨 论

琼脂培养基用于结核杆菌分离培养开始于 50 年代初^[13]。经多次改良,1958 年 Middlebrook 研制出 7H10 培养基。1968 年 Maurice 报道的 7H11 培养基,在 7H10 培养基中增加了 0.1% 酪蛋白水溶液^[14]。7H 系列琼脂培养基在美国已广泛应用于结核杆菌的分离培养和药敏试验,但在世界其它地区,至今仍然使用罗氏、小川等以鸡卵液为主要成分的培养基。7H 琼脂培养基用于痰结核菌的分离,阳性率与罗氏培

养基相似^[15]。琼脂培养基用于早期观察结果和药敏试验,有其独特的优越性^[16]。那么,为什么 7H 琼脂培养基至今不能在全世界推广使用呢? 下列因素可能起着重要作用: 1. 琼脂培养基中的重要组分——牛血清白蛋白组分 V 和过氧化氢酶制剂,价格昂贵,难于购买; 2. 制作过程复杂,需除菌过滤装置; 3. 需要二氧化碳温箱。显然,任何研究新的有临床应用价值的琼脂培养基,都需要考虑到上述制约因素。本文叙述的土豆汤琼脂培养基,用土豆汤代替昂贵的牛血清白蛋白组分 V 和过氧化氢酶制剂,具有价格低廉,取材容易的特点。土豆汤琼脂培养基采用传统的琼脂培养基制备方法,容易为基层检验人员掌握。此外,土豆汤琼脂培养基可用普通温箱培养,这就便于条件差的基层单位使用。

分枝杆菌 H₃₇R₁、鸟型、胃型、堪萨斯、脓肿、不产色和偶发等标准株在不加小牛血清的土豆汤琼脂培养基上出现两种不同的菌落。这表明土豆汤琼脂培养基可用于标准株的纯化,分枝杆菌菌落形态、营养生化和遗传变异的研究。将斜面上出现的两种菌落分别接种在同种培养基上,生长出的菌落均为同一形态。

三种简易土豆汤琼脂培养基,制作方法很简便。其中 309 号培养基可用作结核分枝杆菌和非典型分枝杆菌的鉴别。22 号和 23 号培养基适合条件较差的基层单位使用。在进一步简化和改良土豆汤琼脂培养基的实验工作中,22 号和 23 号培养基可以用作基础培养基。总之,土

(下转第 49 页)

(上接第 25 页)

豆汤琼脂培养基作为一个体系,是以土豆汤为主要成分的,其他任何组分都可以视需要和可能加以增减。

参 考 文 献

- [1] Long, E. R.: The chemistry and chemotherapy of tuberculosis. The williams & wilkins, company 3rd ed. 1958.
- [2] Dubos, R. J.: Procsoc. Exp. Biol. & Med., 63: 56—58, 1946.
- [3] Davies, R.: Br. J. Exper. path., 21:243—245, 1940.
- [4] Hegny, J.: Amer. Rev. Resp. Dis., 87: 806—809, 1963.
- [5] Percy, A. T. et al.: Am. J. Clin. Pathol., 75: 209—210, 1981.
- [6] 匡铁吉等:微生物学报,26(4): 350—355, 1986。
- [7] Maureen, V. C. F.: Mycobacteria. Bristol, London, Boston, 1982.
- [8] 匡铁吉等:中华结核和呼吸系疾病杂志, 9(1): 74—75, 1986。
- [9] 单菊生等:中华结核和呼吸系疾病杂志, 7(1): 10—12, 1984。
- [10] Middlebrook, G.: A. J. P. H., 48(7): 844—853, 1958.
- [11] 张本:中华结核和呼吸系疾病杂志, 10(1): 44—45, 1987。
- [12] 中国防痨协会:全国结核病细菌学标准化规程, 全国结核病细菌学检验学术讨论会, 1984 年。
- [13] Middlebrook, G.: Amer. Rev. Resp. Dis., 70: 852—855, 1954.
- [14] Maurice, L. C. et al.: Amer. Rev. Resp. Dis. 98: 295—297, 1968.
- [15] 熊礼宽:国外医学“临床生物化学与检验学分册” 2: 13—16, 1987。
- [16] Retledge, C. et al.: The biology of mycobacteria. London: Academic press, 1982.