

嗜肺性军团杆菌培养基(BALM)的研究

江苏省卫生防疫站 舒泉·毕诚薛平秦生巨

提要 蓝藻培养液能促进嗜肺性军团杆菌的生长, 将此培养滤液适量加入参照硝酸铁培养基配方用国产试剂自制的基础培养基(LM)中, 制成蓝藻培养基(BALM)。嗜肺性军团杆菌第6血清型标准株在BALM上形成菌落的能力优于BCYE; 第1血清型标准株在两种培养基上的菌落形成能力较接近。从临床标本中分离NANJ-1株的结果表明, 该菌株在BALM上的生长时间、菌落大小优于BCYE和其他几种培养基。

关键词 嗜肺性军团杆菌 蓝藻培养基

嗜肺性军团杆菌的培养较困难, 有其特殊的营养要求, 如需可溶性焦磷酸铁等。国外自70年代末报道该菌以来, 研制出效果较好的BCYE及其改良型培养基, 国内万超群等^[1]以硝酸铁代替来源较困难的可溶性焦磷酸铁制作的培养基(简称硝酸铁培养基)为我国嗜肺性军团杆菌的分离工作提供了良好的条件。我们利用蓝藻能为军团杆菌提供生长因子的原理^[2~5]。研制出能促进嗜肺性军团杆菌生长的蓝藻培养液, 适量加入参照硝酸铁培养基配方以国产试剂制备的基础培养基(LM)中, 建立了一种适合嗜肺性军团杆菌生长的培养基——蓝藻培养基(BALM), 现将结果报告如下。

材料与方 法

一、实验菌株: 嗜肺性军团杆菌标准株由美国疾病控制中心(CDC)提供, 本室保存, 临床菌NANJ-1株由本室分离, 经鉴定^[6]。

二、蓝藻培养液的制备: 参见文献^[7]。

三、BALM培养基的制备:

1. 基础培养基(LM)琼脂: 1%蛋白胨, 0.5%水解酪蛋白, 0.3%甘氨酸, 0.025%硝酸铁, 0.2%活性炭, 1%酵母浸膏, 1.2%琼脂粉, 0.04%L-半胱氨酸, pH7.0。

2. BALM琼脂: 经除菌的蓝藻培养液按

10% (v/v) 量加入基础培养基中。加入抗生素成分即为选择性培养基。

四、蓝藻培养液促进嗜肺性军团杆菌生长试验:

1. 促进人工污染空调水中嗜肺性军团杆菌增殖^[5]: 用无菌水悬浮经37℃, 烛缸培养3~5天的嗜肺性军团杆菌纯培养物制成OD₅₄₀值为0.1的菌悬液, 用除菌的空调水适当稀释后一式二份(每份1000ml), 分别加入10% (v/v)的蓝藻滤液和不含蓝藻的培养基滤液(对照), 混匀后同时置37℃培养12天, 在0、3、6、9和12天时分别取样, 进行菌落计数^[5], 计算cfu/L, 观察在有无蓝藻滤液存在的条件下嗜肺性军团杆菌的增殖存活情况。

2. 促进嗜肺性军团杆菌在基础培养基上生长: 用无菌水悬浮经37℃, 烛缸培养3~5天的嗜肺性军团杆菌纯培养物制成OD₅₄₀值为0.1的菌悬液, 然后稀释成10⁻¹~10⁻⁶ 6个梯度, 每个稀释度各取0.05ml接种于BALM和LM培养基(各0.025ml)上, 用L棒涂匀, 37℃烛缸培养3~5天后, 比较菌落形成数。

五、在模拟条件下嗜肺性军团杆菌在BALM与BCYE上形成菌落能力比较:

1. 模拟空调水中嗜肺性军团杆菌在BALM

*现在江苏省职业病防治研究所工作, 南京, 邮政编码210038

和BCYE上形成菌落的能力：用无菌空调水悬浮经37℃烛缸培养3~5天的嗜肺性军团杆菌纯培养物，使其OD₅₄₀值为0.1，然后稀释成10⁻¹~10⁻⁶ 6个梯度（每个稀释度1000ml），置室温24小时后，各稀释度取0.05ml分别接种于上述两种培养基（各0.025ml）中，37℃烛缸培养3~5天后观察结果。

2.致病豚鼠中嗜肺性军团杆菌在BALM和BCYE两种培养基上形成菌落能力比较：参照文献〔8〕进行实验。

六、BALM与BCYE等培养基从军团菌病人中分离嗜肺性军团杆菌效果比较：取病人〔6〕气管灌洗物等标本分别涂种于BALM和BCYE

等培养基上，37℃烛缸培养，观察结果。

结 果

一、蓝藻培养液对嗜肺性军团杆菌生长的影响：实验表明，蓝藻培养液对受试的嗜肺性军团杆菌菌株的生长具有明显的促进作用。在不含蓝藻培养液的对照组中，活菌计数无明显增加，在加蓝藻滤液的空调水中活菌数呈逐日增长趋势，例如，在第12天时，活菌数为培养前的10⁴倍左右。

在LM培养基中加入蓝藻滤液，制成BALM培养基后，其形成的菌落大小和菌落数均明显增加（表1）。

表1 嗜肺性军团杆菌1型标准株在LM和BALM上形成菌落数

培养基	形成菌落数 (cfu/L)					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
BALM	卅	卅	卅	132	40	6
LM	卅	卅	172	37	11	1

卅~卅为菌落融汇成片无法计数，下表同。

二、在模拟条件下BALM与BCYE分离嗜肺性军团杆菌效果：

1.人工污染空调水中的嗜肺性军团杆菌在BALM和BCYE上菌落形成能力比较：嗜肺性军团杆菌6型标准株在BALM上形成的菌落数较在BCYE上形成的菌落数多（表2），1型标

准株在两种培养基上形成的菌落数较接近。两种标准株在BALM与BCYE培养基上生长的菌落颜色、形态等特征相当，但菌落直径略有差异，在BALM上菌落直径在0.6~2.3mm之间，而在BCYE上为0.7~1.7mm之间。

2.致病豚鼠中嗜肺性军团杆菌在BALM与

表2 嗜肺性军团杆菌1、6型标准株在BALM和BCYE上形成的菌落数

菌 株	形成菌落数 (cfu/L)											
	10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1型标准株	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
6型标准株	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

A: BALM, B: BCYE

BCYE上的生长能力：实验豚鼠腹腔注射嗜肺性军团杆菌标准株悬液之后第5天，体温分别升高1.9和1.5℃，其体征为典型的军团杆菌感染症状。脾组织悬液在BALM和BCYE上形成的

菌落形态特征接近；6型标准株在BALM上生长的菌落数多于在BCYE上形成的菌落数，1型标准株在两种培养基上形成的菌落数相对接近。

三、BALM与BCYE从军团菌病人标本中分离嗜肺性军团杆菌的效果：南京市胸科医院发现一例嗜肺性军团杆菌病人^[6]，在病原体的分离过程中使用BALM及BCYE等培养基同时进行，BALM及BCYE琼脂均直接从病人气管灌洗物标本中检出其病原菌(NANJ1株，嗜肺性军团杆菌第6血清型)，但NANJ-1株在前者上形成的菌落数较后者多，培养至第4天时，在

BALM上生长的单菌落直径为0.8~1.9mm，直到第7~9天时，在BCYE等其余几种培养基上才形成类似大小的单个菌落。BALM与BCYE等培养基在经病人气管灌洗物沉淀悬液致病的豚鼠中检出NANJ-1株。不同培养基的检出部位也存在一定差异，BALM是唯一从肺组织中检出NANJ-1株的培养基(表3)。

表3 BALM、BCYE等培养基从不同标本中检出NANJ-1株结果

标 本	培 养 基				
	BALM	BCYE	BCYE-CYS	硝酸铁琼脂	血平板
病人气管灌洗物	+	+	-	-	-
病人气管灌洗物 离心沉淀物	+	+	+	+	-
豚鼠肺	+	-	-	-	-
豚鼠肝	-	+	-	+	-
豚鼠脾	-	+	-	+	-
豚鼠心	-	-	-	-	-
豚鼠胸腔积液	-	-	-	-	-

+ 检出，- 未检出

讨 论

1976年美国费城爆发军团杆菌病以来，本病已引起世界各国的关注。我国自1981年南京首例报道后，已有多起散发病例及爆发流行报道^[9]。病原体的分离工作进展相对较慢。从目前文献资料来看，我国嗜肺性军团杆菌感染以血清1型和6型为主。为了探讨分离效果好、试剂国产化的培养基，我们在硝酸铁培养基的基础上，研制出BALM培养基。嗜肺性军团杆菌1型标准株在BALM上的生长情况与在BCYE上的生长情况较接近；6型标准株及临床株(NANJ-1株)在BALM上生长较在BCYE上好，提示BALM具有实际意义。

制作BALM的关键在于蓝藻的选择及其培养，使蓝藻培养液中含有较丰富的促进嗜肺性军团杆菌生长的因子。值得一提的是，致病豚

鼠脾组织悬液 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 3个稀释度在BCYE培养基上形成的菌落数相差并不十分明显，从理论上讲， 10^{-1} 稀释度里所含的活菌数应是 10^{-3} 稀释度的100倍。Morrill等^[8,10]也曾报道类似现象，他们认为，脾组织中存在抗菌物质，或者组织具有自身防护功能而抑制细菌生长。这样高稀释度的组织悬液中虽然活菌数较低稀释的多，但同时组织中的“抗菌”物质浓度亦较高，因此长出的菌落数并不一定多，并且通过改进培养基，加入适当的物质成分对抗组织的抑制作用，得到了较好的效果。本次实验结果表明，嗜肺性军团杆菌6型标准株致病的豚鼠脾组织悬液 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 3个稀释度在BALM上生长的“组织抑制”作用相对BCYE较小。

(本研究承蒙胡修元主任医师大力支持，谨此致谢)

Study on the Medium (BALM) for Isolation of *Legionella Pneumophila* Shu Quan*, et al., Jiangsu Provincial Sanitary and Anti-Epidemic Station, Nanjing

L. pneumophila was apparently using blue algae (cyanobacteria) extracellular products as carbon and energy sources for its proliferation. Based on this observation, a medium (BALM) in which all chemicals and reagents were made in China for isolation of *L. pneumophila* was developed. The recoveries of *L. pneumophila* serogroups 1 and 6 standard strains from contaminated air-conditional water and infected guinea pig spleens were evaluated by using two culture media; BALM and BCYE (buffered charcoal yeast extract agar). Recoveries of standard strains of *L. pneumophila* serogroup 1 were similar on both media, while those of *L. pneumophila* serogroup 6 were more efficient on BALM than on BCYE. In the process of isolation of *L. pneumophila* NANJ-1 strain, which was obtained from the material of tracheal lavage of a pneumonic patient in one of hospitals in Nanjing City, the recovery of this strain was also more efficient on BALM than on BCYE and other common used media. The results suggested that the use of BALM medium in place of BCYE may improve the recover of *L. pneumophila* from clinical and environmental specimens.

Key words *Legionella pneumophila*
BALM

* Current Address: Jiangsu Provincial Institute of Occupational Medicine, Nanjing

参 考 文 献

1. 万超群, 等. 两种简易嗜肺军团菌琼脂培养基. 中华流行病学杂志 1985; 6(3): 190.
2. 万超群. 军团菌的微生物学. 中国微生物学杂志 1990; 2(2): 67.
3. Tison DL, et al. Growth of *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (cyanobacteria). *Appl Environ Microbiol* 1980; 39: 456.
4. Bohach CA, et al. Characterization of surfaces involved in adherence of *Legionella pneumophila* to *Fischerella* species. *Infect Immun* 1983; 42: 318.
5. Nideveld CJ, Pet FM, and Meenhorst PL. Effect of rubbers and their constituents on proliferation of *Legionella pneumophila* in naturally contaminated hot water. *Lancet* 1986; 2: 180.
6. 舒泉, 等. 自病人气管灌洗物中分离出一株嗜肺性军团杆菌. 中国微生物学杂志 1990; 2(2): 39.
7. McFeters GA, et al. Growth of heterotrophic bacteria and algal extracellular products in oligotrophic waters. *Appl Environ Microbiol* 1978; 35: 383.
8. Lattimer GL, et al. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens: salutary effects of lung tissue dilution. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122: 101.
9. 胡修元, 万超群. 我国军团菌病研究三年进展. 中华流行病学杂志 1986; 7(3): 175.
10. Morrill WE, et al. Increased recovery of *Legionella micdadei* and *Legionella bozemanii* on buffered charcoal yeast extract agar supplemented with albumin. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 616.

(1991年10月30日收稿, 1992年3月20日修回)

关于补办“现代流行病学培训班”的紧急通知

我刊于1989、1991、1992年举办了三期“现代流行病学培训班”，收到较满意效果。原决定只办三期，但为了满足广大读者的要求，决定加办一期（第四期）。关于时间、方法、内容、报名办法等，详见本刊上期插页。

中华流行病学杂志编辑部