

军团菌常用培养方法

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 (102206)

孙银燕 任红宇 万超群

军团菌可引起人的肺部疾患,在流行病学上,可散发或暴发,病死率高。临床确诊主要是分离到军团菌,然而因其生长所需营养条件苛刻,如需要多种必需氨基酸和某些金属离子,在含2.5~5.0%的二氧化碳环境中方能生长。几年来,国内曾试用过多种培养基,包括蓝藻培养基、硝酸铁培养基、BCYE培养基等,但常用的是BCYE培养基和15%的甘油培养基(保存菌株用),今介绍如下。

一、BCYE培养基

1.成分: N-2乙酰胺基-2-氨基乙烷磺酸(ACES),酵母浸出粉,琼脂粉,活性炭,可溶性焦磷酸铁, L-半胱氨酸盐酸盐,蒸馏水。

2.方法: (以1000ml为例)称10g ACES倒入锥形瓶,加蒸馏水至950ml,用45ml蒸馏水稀释5ml 10N KOH后加入锥形瓶,调pH至 6.9 ± 0.2 ,过碱时可用0.1mol/L的硫酸中和。称10g酵母浸出粉,20g琼脂粉,2g活性炭,依次加入锥形瓶,封口。用一消毒瓶盛10ml蒸馏水,准备好两个干净注射器和两个滤器(小孔直径0.22 μ m);同配制好的试剂共同高压,15磅15~20分钟。待锥形瓶内液体冷至60 $^{\circ}$ C~70 $^{\circ}$ C时将已称好的0.6g L-半胱氨酸盐酸盐、0.45g焦磷酸铁分别用消毒蒸馏水溶解后依次经滤器滤菌加到锥形瓶内;然后倾注平板。置密封的塑料袋内,4 $^{\circ}$ C时该平板可保存约四周。

3.在BCYE配制中注意事项:培养基中加入试剂一定要按照上面叙述的顺序,特别注意应先加L-半胱氨酸盐酸盐再加入焦磷

酸铁;这两者混在一起变性而产生有毒物质,影响军团菌生长。另外,在高压消毒过程中,加热时间过长或温度过高都能影响培养基的营养物质。每批试剂、生产试剂厂家不同对培养基也有影响,因此使用一批新试剂前可先配制少量观察孵育三天已知军团菌的生长情况后,来确定各种试剂配量,以便进行培养基的质量控制。

4.军团菌的形态和染色性:在BCYE培养基上,军团菌菌落在培养后3~5天内出现,单个菌落直径1~2mm,湿润有光泽,灰白色;用接种针触之柔软如软膏状;嗜肺性军团菌发育时产生一种特有酸臭味。军团菌为革兰氏阴性杆菌,用1%沙黄染色后,光学显微镜下观察,细菌染成橙黄色,细杆状,有的微弯曲呈纺锤丝状,大小约0.3~0.4 \times 2~3 μ m,有时细菌相联呈枝节状。

二、15%的甘油培养基

这是一种液体培养基,主要用于保存菌株,于-20 $^{\circ}$ C菌株至少存活半年。配制方法与前面提到的BCYE培养基的差别是此液体培养基无需加活性炭和琼脂,而在PH 6.9 ± 0.2 ACES缓冲液中,加入甘油(最终浓度为15%)即可,高压消毒后依次加入滤过除菌的L-半胱氨酸盐酸盐和焦磷酸铁溶液。分装于试管约1.5ml~2.0ml,即可使用。用无菌环刮取BCYE培养基上生长两天的军团菌菌落或菌苔到这种液体培养基内,将口密封后放-20 $^{\circ}$ C保存。液体培养基需要量少,在实际应用中常同BCYE培养基一同配制,该种培养基内细菌虽不如冻干菌种存活时间

长，但有方法简单，细菌易于存活等优点，与冻干菌种法联合使用可有效地防止军团菌种的丢失。

三、标本的分离培养

由于临床标本（痰、支气管灌洗液、胸水）中杂菌较多，在培养过程中能抑制军团菌的生长，因此标本需预先处理，常用的方法是酸处理法。

1. 试剂的配制：A液：0.2M KCl（14.9g/L）；B液：0.2M HCl（17.2ml/L）；C液：0.1N KOH（6.43g/L）。将

18份A液和1份B液混合，即得酸中和剂，PH为2.0；10.7ml C液加89.3ml蒸馏水为碱中和剂，高压15磅15~20分钟。

2. 培养：取少量病人痰液（或其它标本）至试管中，加1ml酸中和剂，混匀，静止10分钟；加入1ml碱中和剂，混匀，静止10分钟；吸取少量（一滴）加到BCYE培养基上，划线分离，在35℃下，在CO₂条件下培养。标本中军团菌生长缓慢，需要5~7天。因此不要轻易放弃培养，发现可疑菌落应继续传代培养。