

• 论 著 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2022. 12. 005

临床分离外耳道致病性黑曲霉生长特性研究*

郭艳玲¹, 王艳丽², 马文鹏^{1,3}, 陈 鸽¹, 曾梦妮¹, 刘成程^{3△}

1. 渭南市第二医院检验科, 陕西渭南 714000; 2. 渭南市第一医院检验科, 陕西渭南 714000;
3. 西安交通大学基础医学院病原微生物与免疫学教研室, 陕西西安 710061

摘 要:目的 探讨黑曲霉的生长特性, 为黑曲霉的培养鉴定提供依据。方法 采用微生物常用的培养基, 选择 25 ℃ 和 35 ℃ 环境培养黑曲霉, 观察培养基上黑曲霉菌落形态, 建立生长曲线, 对菌落生长特征进行分析。结果 黑曲霉在血琼脂培养基(BAP)、沙保罗琼脂培养基(SDA)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和普通巧克力琼脂培养基(CA)上均可生长; 菌落形态呈黑色厚绒毛放射轮状生长; 在 SDA 上菌落直径、孢子黑色显色区范围最大, 平均生长速度最快; 在 35 ℃ 培养菌落生长迅速, 25 ℃ 生长缓慢。结论 实验室分离黑曲霉选择碳源和氮源丰富的 SDA 以及 35 ℃ 培养温度, 可为耳道真菌病患者的临床诊疗节省时间。

关键词:黑曲霉; 病原微生物; 培养基; 耳道真菌病

中图分类号: R446. 5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)12-1599-05

Growth characteristics of pathogenic *Aspergillus niger* isolated from clinical external auditory canal*

GUO Yanling¹, WANG Yanli², MA Wenpeng^{1,3}, CHEN Ge¹, ZENG Mengni¹, LIU Chengcheng^{3△}

1. Department of Clinical Laboratory, the Second Hospital of Weinan, Weinan, Shaanxi 714000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Hospital of Weinan, Weinan, Shaanxi 714000, China; 3. Department of Pathogenic Microbiology

& Immunology, School of Basic Medical Sciences, Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Xi'an, Shaanxi 710061, China

Abstract: **Objective** To investigate the growth characteristics and provide clues for the identification and culture of *Aspergillus niger*. **Methods** *Aspergillus niger* was cultured in the medium commonly used by microorganisms at 25 ℃ and 35 ℃, and the morphology of *Aspergillus niger* was observed on the medium, the growth curve was established, and the growth characteristics of the colony were analyzed. **Results** *Aspergillus niger* could grow on blood agar plate (BAP), sabouraud agar plate (SDA), potato dextrose agar (PDA) and chocolate agar medium (CA). The colony morphology was black thick villi radiate wheel growth. The colony diameter, spore black color range were the largest and average growth rate was the fastest on SDA. The colony grew rapidly at 35 ℃ and slowly at 25 ℃. **Conclusion** When isolating *Aspergillus niger* in laboratory, SDA rich in carbon and nitrogen sources and culture temperature of 35 ℃ can save time for clinical diagnosis and treatment of patients with otomycosis.

Key words: *Aspergillus niger*; pathogenic microorganism; culture medium; otomycosis

外耳道真菌感染是一种表现为耳痒、耳溢液、耳痛等症状的耳部疾病^[1]。常见致病真菌有曲霉菌、念珠菌、毛霉菌、青霉菌, 主要以曲霉菌感染为主, 其中黑曲霉感染较为常见^[2-3]。近年来, 随着糖皮质激素以及抗菌药物的不规范应用, 真菌感染日趋增多, 实验室诊断变得尤为重要。目前实验室快速检测黑曲霉已经应用到质谱和 DNA 序列分析等技术, 然而, 形态学鉴别还是真菌检测的主要检验方法^[4-5]。本文将

从实验室黑曲霉生长特性等方面进行阐述, 以期实验室检查提供帮助。

1 材料与方法

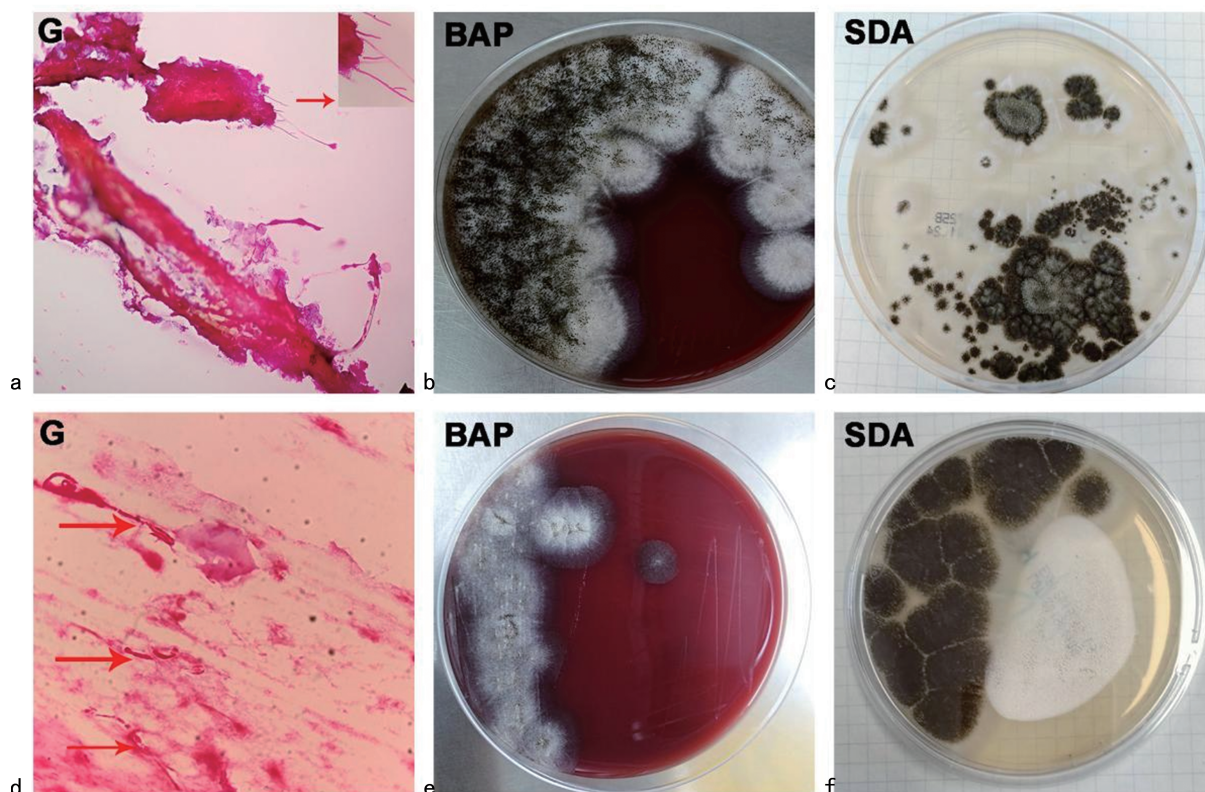
1.1 材料来源 黑曲霉标准菌株 ATCC16404(简称“S”)来源于北京生物保藏中心。黑曲霉临床菌株(简称“C”), 分离自渭南市第二医院两例耳道真菌病患者的外耳道分泌物, 均通过质谱仪鉴定为黑曲霉, 分别标示为 C1、C2, 见图 1。马铃薯葡萄糖琼脂培养基

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(NO. 81401710)。

作者简介: 郭艳玲, 女, 主管技师, 主要从事微生物免疫检验相关研究。△ 通信作者, E-mail: liuchengcheng@xjtu.edu.cn。

(PDA)来源于青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;血琼脂培养基(BAP)、沙保罗琼脂培养基

(SDA)和普通巧克力琼脂培养基(CA)来源于郑州安图生物工程股份有限公司。



注:箭头代表镜下菌株菌丝;a~c 分别为 C1 菌株在镜下、BAP、SDA 的形态;d~f 分别为 C2 菌株在镜下、BAP、SDA 的形态。

图 1 两株分离自外耳道炎患者的临床菌株

1.2 仪器与试剂 微生物质谱检测系统购自郑州安图生物工程股份有限公司;微生物培养箱购自天津市泰斯特仪器有限公司;显微镜购自奥林巴斯(中国)有限公司;革兰染色液、乳酸酚棉兰染色液购自珠海贝索生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 显微镜下形态观察 本研究采用插片培养观察法,将孢子接种到培养基的中间,然后用小镊子夹起一块无菌盖玻片,以 45°的角度斜插入培养基中,待培养 72 h 后,用小镊子将盖玻片取出后转移到滴有无菌生理盐水的载玻片上,在显微镜下观察孢子及菌丝的形态。另外,对培养 72 h 的菌落用透明胶带从菌落顶部粘取一定量的菌丝,粘在预先滴加乳酸酚棉兰染色液的载玻片上,然后在显微镜下观察顶囊孢子和菌丝的形态特征。

1.3.2 菌落形态观察 参照文献[6]中孢子悬液的制备方法,从复苏、分离好的 3 株黑曲霉中取适量孢子加入无菌生理盐水中充分振荡混匀,分别通过 4 层无菌纱布过滤后,用牛鲍计数板计数,制备成 1×10^3 个/毫升的 3 种孢子悬液。将已制备好的孢子悬液用振荡器充分混匀,分别取 1 μ L 孢子悬液接种在 SDA、

PDA、BAP 和 CA 上,将接种好的培养基分别置入 25 $^{\circ}$ C 和 35 $^{\circ}$ C 的培养箱,培养 72 h,观察 3 株菌在不同培养基上的菌落形态。

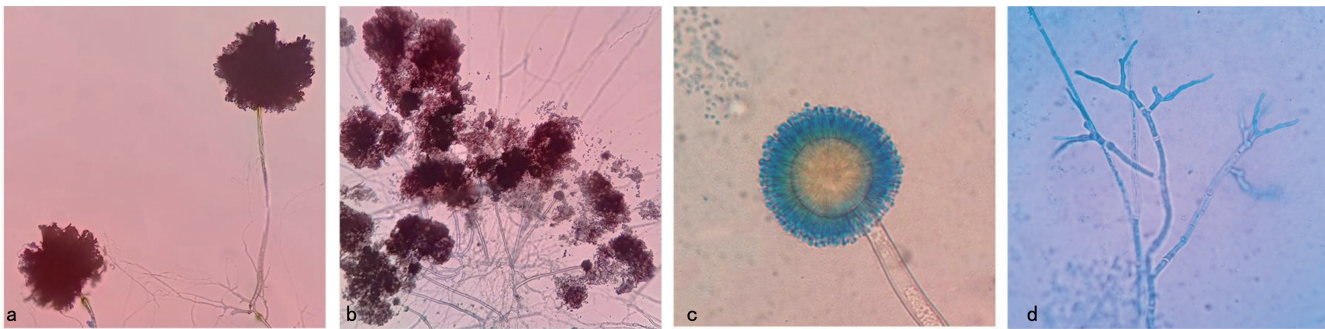
1.3.3 生长曲线检测及菌落生长特征 在培养后的 12、24、36、48、60、72、84 和 96 h 观察记录两组温度下不同培养基上的菌落直径、菌丝密度、菌落颜色出现变化时间、菌落黑色显色区范围和显色区密度。

2 结果

2.1 显微镜下形态特征 在 35 $^{\circ}$ C 条件下采用插片法培养 72 h 后,湿片显微镜($\times 40$)下可见菌丝体、分生孢子头和分生孢子,分生孢子头为黑褐色,菌丝透明有隔膜,见图 2a、2b;乳酸酚棉兰染色显微镜下可见顶囊球形或近球形,双层小梗布满顶囊,梗基呈放射状,形似菊花,分生孢子呈球形表面粗糙有小刺,菌丝透明有隔膜,见图 2c、2d。

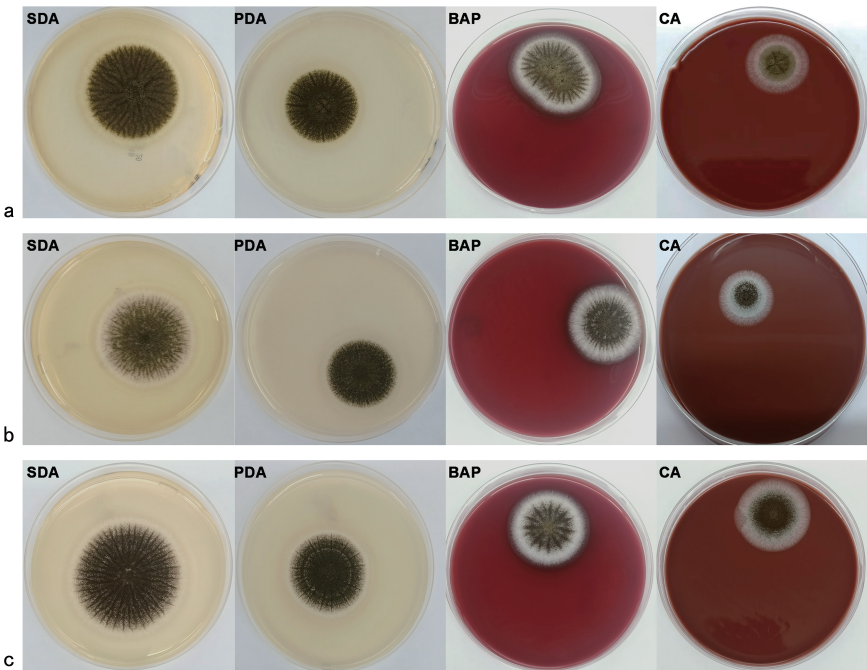
2.2 菌落形态特征 黑曲霉在 35 $^{\circ}$ C 培养 72 h 后,可见黑色厚绒毛放射轮状菌落生长。而且 PDA 比 SDA 上菌丝致密,孢子密度大,但是在 SDA 上生长速度最快,菌落直径和产孢子直径最大,见图 3。3 株菌在 PDA 和 SDA 的背面形态有明显不同,在 SDA 的背面产生大量褶皱,无色或呈黄褐色,72 h 后褶皱更加明

显,但 PDA 的背面产生少量褶皱,见图 4。



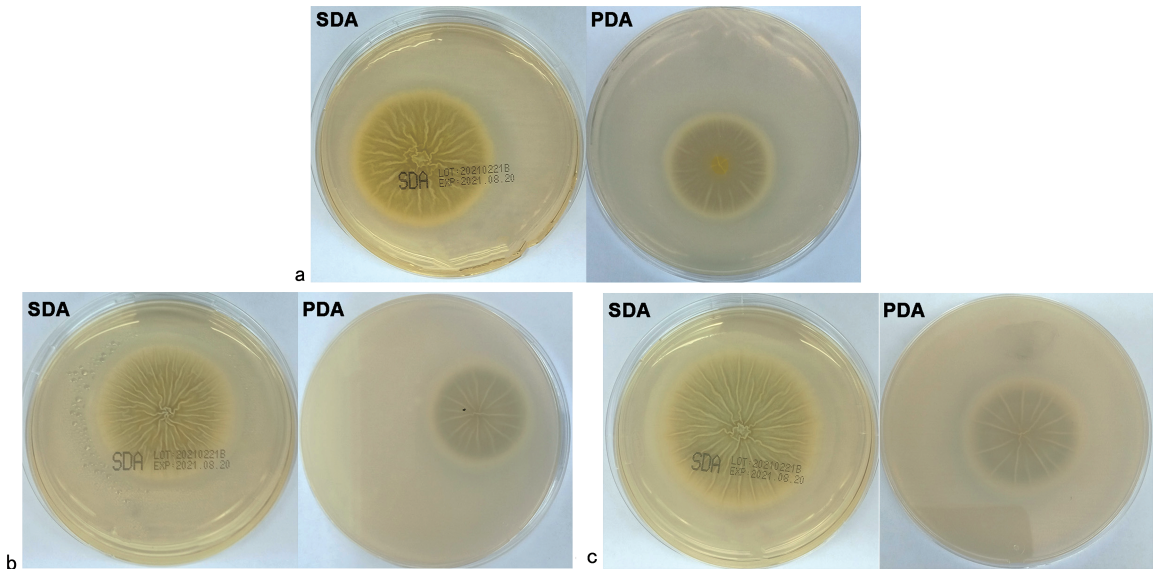
注:a、b 为湿片显微镜(×40)下黑曲霉分生孢子头、产孢子结构形态;c、d 为乳酸酚棉兰染色后显微镜(×40)下黑曲霉分生孢子头、菌丝体形态。

图 2 黑曲霉显微镜下形态特征



注:a、b、c 分别为 S、C1、C2 在 35 ℃ 培养 72 h 后不同培养基上的菌落形态。

图 3 黑曲霉在 35 ℃ 培养 72 h 后不同培养基上的菌落形态



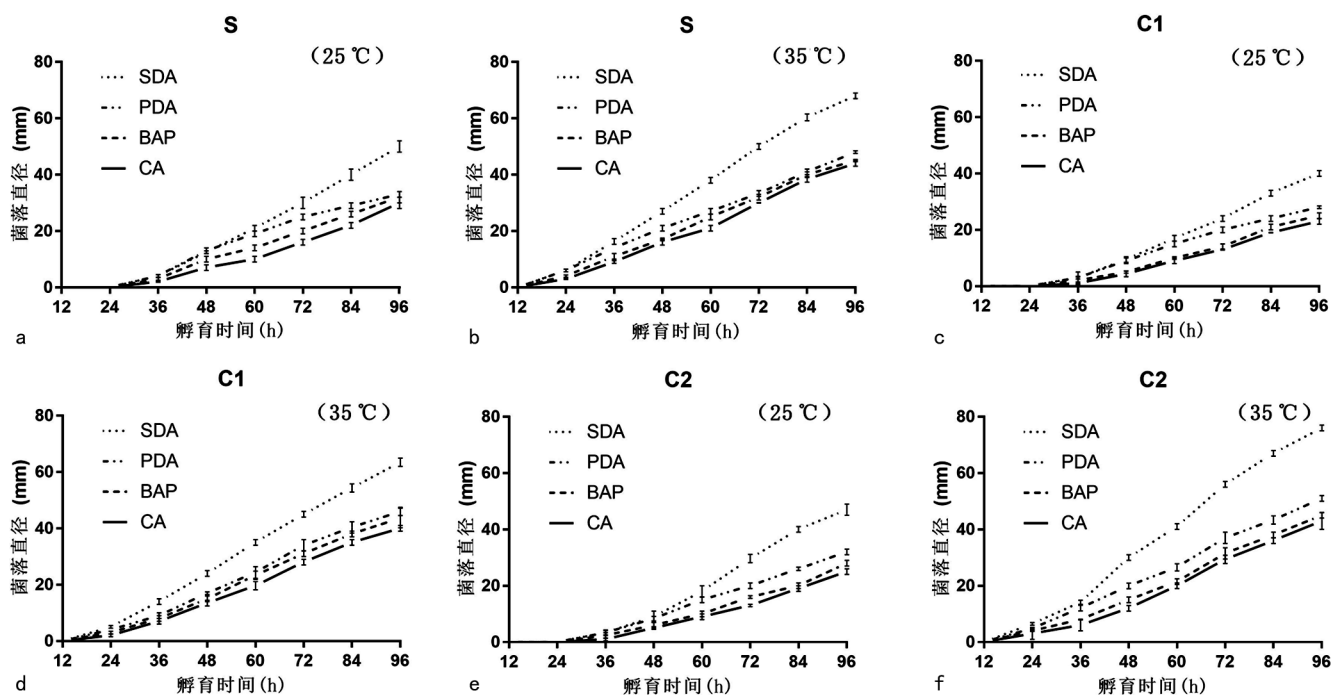
注:a、b、c 分别为 S、C1、C2 在 35 ℃ 培养 72 h 后 SDA 和 PDA 背面的菌落特点。

图 4 黑曲霉在 35 ℃ 培养 72 h 后 SDA 和 PDA 背面的菌落特点

2.3 生长曲线检测 3 株黑曲霉在 25 ℃ 和 35 ℃ 培养 12 h, 4 种培养基上均无肉眼可见的菌落生长。25 ℃ 培养到 36 h 才出现菌落生长; 35 ℃ 培养 24 h, 在 4 种培养基上均出现肉眼可见的菌落生长。随着培养时间的延长, 不同培养基上的菌落生长差异逐渐明显。对两种温度的菌落生长曲线对比发现, 在 35 ℃ 培养条件下, 菌落直径更大, 生长速度更快, 见图 5。

2.4 菌落生长特征 35 ℃ 培养 96 h 后观察发现, 3

株黑曲霉在 4 种培养基上生长有明显不同的结果。该 3 株菌在 SDA 上的菌落直径最大, 平均生长速度最快, 其次为 PDA、BAP 和 CA; 在菌丝密度和孢子显色密度方面, PDA 最为浓密, 其次为 SDA、BAP 和 CA; 在 PDA 和 SDA 上生长 36 h 出现颜色变化, 时间早于 BAP 和 CA; 在 SDA 上黑色显色区范围最大, 其次为 PDA、BAP 和 CA, 见表 1。



注: 注: a、c、e 为菌株 S、C1 和 C2 在 25 ℃ 培养条件下不同培养基上的生长曲线; b、d、f 为菌株 S、C1 和 C2 在 35 ℃ 培养条件下不同培养基上的生长曲线。

图 5 黑曲霉菌株 S、C1 和 C2 在不同温度不同培养基上的生长曲线对比。

表 1 黑曲霉在 35 ℃ 培养 96 h 后的菌落生长特征

培养基	菌株	菌落直径 (mm)	平均生长速度 (mm/d)	菌丝密度	出现颜色变化 时间(h)	黑色显色区 范围(mm)	显色区密度
CA	S	41.0	10.00	2+	48	29	2+
	C1	40.0	10.00	2+	48	28	2+
	C2	43.0	10.75	2+	48	30	2+
BAP	S	45.0	11.25	3+	48	32	3+
	C1	42.0	11.75	3+	48	31	3+
	C2	45.0	11.20	3+	48	33	3+
PDA	S	48.0	12.00	5+	36	38	5+
	C1	46.0	12.00	5+	36	35	5+
	C2	52.0	13.00	5+	36	41	5+
SDA	S	68.0	17.00	4+	36	57	4+
	C1	63.5	16.33	4+	36	53	4+
	C2	76.0	19.00	4+	36	66	4+

3 讨 论

本次研究选用的培养基为临床实验室常用的 4 种培养基。PDA 常用于真菌及曲霉菌的鉴定,SDA 多用于常规真菌的培养,BAP 和 CA 为一般细菌生长基础培养基。不同的培养基成分不同,PDA 是由 20.0 g 葡萄糖、6.0 g 马铃薯浸粉和 20.0 g 琼脂组成,其为黑曲霉的生长提供碳源;SDA 是由 20.0 g 葡萄糖、20.0 g 琼脂、蛋白胨(主要以多肽、氨基酸为主,并辅以生物素、微量元素等)和氯霉素组成,含有真菌生长的碳源和氮源。在本研究中,黑曲霉在 PDA 上的菌落生长范围、平均生长速度以及孢子黑色显色区范围均不及 SDA,但菌丝密度和孢子密度大于 SDA;BAP 和 CA 因不含真菌生长的糖类,其成分单一,所以黑曲霉在这两种培养基上生长缓慢。

黑曲霉在 4 种培养基上均可生长,对培养条件要求不高。SDA 中的葡萄糖为黑曲霉生长提供所需的碳源,蛋白胨为黑曲霉生长提供氮源,其中,葡萄糖是黑曲霉生长的最好碳源,徐和平等^[7]研究显示,增加葡萄糖的含量可以加快黑曲霉的生长速度,但在葡萄糖含量相同的情况下,SDA 与 PDA 相比,PDA 中的马铃薯浸粉仅仅为黑曲霉提供了可溶性淀粉,然而,SDA 还含有蛋白胨,其为黑曲霉提供丰富的氮源^[8]。氮源是菌体合成氨基酸、蛋白质和细胞质的主要成分,也是合成各种含氮代谢产物的重要原料。唐诗潮等^[9]研究发现,在培养基其他成分不变的情况下,加入固定量的氮源如蛋白胨、牛肉膏、酵母膏等,可显著加快黑曲霉的生长速度,酵母膏为黑曲霉生长最适氮源,其次为蛋白胨,这与本研究结果相符,在富含蛋白胨的 SDA 上黑曲霉生长速度比 PDA 快。正如刘梦涵等^[10]研究结果显示,菌体生长阶段氮源需求大,产孢子阶段氮源的需求量远大于碳源的需求量,由此可见黑曲霉在 SDA 上菌体生长迅速,产孢子范围最大。

温度是影响微生物生长的重要因素之一,在临床微生物标本的培养过程中提供一个稳定且合适的温度环境是必不可少的。黑曲霉生长的最适温度范围为 24~37℃。有研究显示,黑曲霉在 30、35、40 和 45℃等温度环境下培养,在 35℃培养温度下黑曲霉的生物量和催化活力最大^[11]。本研究发现,3 株菌在相同的培养基上,在 35℃的培养环境中生长迅速,其菌落颜色变化的时间早于 25℃培养环境。菌落颜色的变化代表着黑曲霉的成熟度,菌落颜色变化早说明

成熟早,相反,则成熟晚。黑曲霉在 35℃培养环境下成熟早于 25℃培养环境^[12]。由此可见,35℃培养环境可促使黑曲霉的快速生长,缩短培养时间,为临床诊断黑曲霉感染提供最迅速的诊疗依据。

综上所述,对于临床微生物实验室分离致病性黑曲霉,选择碳源和氮源丰富的 SDA 以及 35℃培养环境,缩短培养时间,可为临床诊疗节省时间。

参考文献

- [1] 杨浩,杨桂强,王国有.探究外耳道炎分泌物真菌培养结果和治疗效果[J].首都食品与医药,2019,26(15):99.
- [2] 管骅,慈军,王昌阳,等.外耳道炎患者感染真菌分布与临床治疗分析[J].中华医院感染学杂志,2016,26(8):1837-1839.
- [3] 时乐洋,陶安周.外耳道真菌病的研究进展[J].转化医学杂志,2021,10(2):121-125.
- [4] 曹敬荣,王岩,谢威,等.质谱技术快速鉴定临床分离丝状真菌的应用[J/CD].中华实验和临床感染病杂志(电子版),2020,14(5):374-379.
- [5] ATALAY A, KOC A N, SUEL A, et al. Conventional morphology versus PCR sequencing, rep-PCR, and MALDI-TOF-MS for identification of clinical aspergillus isolates collected over a 2-year period in a university hospital at Kayseri, Turkey[J]. J Clin Lab Anal, 2016, 30(5):745-750.
- [6] 郭晴岚.用血球计数板观察酵母菌种群密度实验要点解析[J].中学生物学,2016,32(7):42-43.
- [7] 徐和平,黄江山.临床常见曲霉形态学鉴定[J].临床检验杂志,2017,35(10):75.
- [8] 袁爱华,梁永康,吴珊珊,等.食品常用霉菌增菌培养基的改良效果对比[J].食品科技,2020,45(10):317-322.
- [9] 唐诗潮,李晓凤,袁琨.不同培养条件对黑曲霉细胞生长及水解特性的影响研究[J].现代食品科技,2017,33(8):195-200.
- [10] 刘梦涵,熊结青,杨儒文.淀粉含量对黑曲霉孢子产量、质量的影响[J].当代化工,2020,49(2):357-360.
- [11] PASSAMANI F R, HERNANDES T, LOPES N A, et al. Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes[J]. J Food Prot, 2014, 77(11):1947-1952.
- [12] 李映昱,张培,黄琛,等.临床分离角膜致病曲霉菌的生长特性研究[J].中华实验眼科杂志,2018,36(9):683-687.

(收稿日期:2021-09-16 修回日期:2022-01-08)