

巴尔通体液体培养条件简化及生长曲线观察

栗冬梅^{1*} 苗志刚² 宋秀平¹ 王君¹ 刘起勇^{1*}

- (1. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室 北京 102206)
(2. 山东大学 生命科学院 山东 济南 250100)

摘要:【目的】应用一种昆虫细胞培养基作为基础成分培养巴尔通体(*Bartonella* species), 建立一种操作方便、高效稳定的巴尔通体液体培养方法。【方法】昆虫细胞培养基中添加10%胎牛血清, 以此为基础培养液分别添加蔗糖和谷氨酰胺, 比较这两种成分对汉赛巴尔通体(*B. henselae*)和五日热巴尔通体(*B. quintana*)生长的影响并观察其他10种巴尔通体在简化后的培养液中的生长特性。【结果】添加蔗糖和谷氨酰胺不会明显促进巴尔通体的生长, 10种巴尔通体在简化后的培养液中均生长良好。不同种巴尔通体生长曲线不同, 汉赛巴尔通体和五日热巴尔通体的世代时间分别为5.2 h和4.3 h, 生长速度快于固体培养。【结论】以昆虫细胞培养基作为基础成分的培养液适于巴尔通体液体培养, 特别是对一些更难培养的巴尔通体提供了一种较好的培养方法。

关键词: 巴尔通体, 液体培养, 生长曲线, 猫抓病

Optimization of liquid growth conditions and determination of growth curves for *Bartonella* species

LI Dong-Mei^{1*} MIAO Zhi-Gang² SONG Xiu-Ping¹ Wang Jun¹ LIU Qi-Yong^{1*}

- (1. Department of Vector Biology and Control, State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)
(2. School of Life Science, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: [Objective] We tested an insect cells-based liquid medium and its utility for the

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81101286)

*通讯作者: Tel: 86-10-58900741

✉: 栗冬梅: lidongmei@icdc.cn; 刘起勇: liuqiyoung@icdc.cn

收稿日期: 2012-02-19; 接受日期: 2012-04-05

easy-to-maintain, fast and reliable system for cultivation of different *Bartonella*. [Methods] Media composition and growth conditions were optimized using *B. henselae* and *B. quintana*. The growth curves of the other ten *Bartonella* species were determined using the optimized liquid medium. [Results] Glutamine and sucrose supplements did not affect significantly the growth rate of these bacteria. A generation time of 5.2 h for *B. henselae* and 4.3 h for *B. quintana* was estimated during the exponential phase of the growth curve occurred between days 1 and 2 after inoculation. The twelve medical and veterinary important *Bartonella* species grew well under conditions established and each exhibited unique growth characteristics. [Conclusion] This liquid growth medium may provide an advantage over conventional direct blood agar plating for analyzing *Bartonella* properties including antibiotic susceptibility and resistance and pathogenicity.

Keywords: *Bartonella*, Liquid culture, Growth curve, Cat scratch disease

巴尔通体(*Bartonella* species)是营养要求苛刻、兼性细胞内寄生的革兰氏阴性需氧杆菌,主要寄生在动物宿主和人的血管内皮细胞和红细胞内,能够引起人类猫抓病(汉赛巴尔通体 *B. henselae* 和克氏巴尔通体 *B. clarridgeiae*)、战壕热(五日热巴尔通体 *B. quintana*)、心内膜炎(汉赛巴尔通体、五日热巴尔通体、伊丽莎白巴尔通体 *B. elizabethae*、克勒巴尔通体 *B. koehlerae*、文森巴尔通体博格霍夫亚种 *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* 等)、卡瑞恩病(杆菌样巴尔通体 *B. bacilliformis*)和其他系统性病变等。巴尔通体体外培养生长缓慢,常规的固体培养必需添加动物全血才能生长,原代培养通常需要 5–30 d。与传统的固体培养方法相比,液体培养方法无需添加动物全血,使用方便、快捷。从生物学角度考虑,液体培养环境更接近于巴尔通体在宿主体内的生境,因此,建立稳定的液体培养方法,对于研究其代谢机制、致病机制、对药物的敏感性及耐药机制等方面非常重要。本研究选择一种昆虫细胞培养基(Schneider's insect medium, SIM),观察添加蔗糖和谷氨酰胺是否能够促进巴尔通体生长,以简化巴尔通体液体培养,并测定不同种巴尔通

体的生长曲线,进一步掌握巴尔通体的生长规律。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

昆虫细胞培养基 SIM, Sigma, 美国; 标准胎牛血清(FCS), 天津市灏洋生物制品科技有限责任公司; 蔗糖, 北京化工厂; 谷氨酰胺, AMRESCO, 美国; 胰酶大豆肉汤(TSB)和胰酶大豆琼脂培养基(TSA), BD, 美国。

1.2 主要仪器

371 型 CO₂ 培养箱, Thermo Scientific, 美国; 脱色摇床, TECHNE, 英国; 麦氏浊度测定仪, bioMérieux, 法国; 5804R 台式高速冷冻离心机, Sigma, 美国。

1.3 实验菌株

特利波契巴尔通体(*B. tribocorum*)由巴塞尔大学 Christoph Dehio 教授惠赠, 其他巴尔通体标准菌株均来源于美国标准生物物品收藏中心 ATCC (表1)。

1.4 常规培养

应用含 5%羊血的 TSA 复苏培养巴尔通体菌株, 培养条件为 5% CO₂、潮湿环境中 35 °C 培养 4–6 d。Bb 培养温度为 28 °C 和 35 °C。

1.5 液体培养

1.5.1 培养液制备: 参照文献[1], 基础成分为 SIM 和 10%胎牛血清, 谷氨酰胺和蔗糖为添加成分。应用灭菌超纯水配制谷氨酰胺和蔗糖溶液, 0.22 μm 滤器过滤除菌后加入培养液, 终浓度分别为 2 mmol/L 和 5% (W/V), 混匀后吸取 0.1 mL 培养液涂布于 TSA 平板上培养检测是否污染。

1.5.2 培养方法: 将培养第 4–6 天的菌体接种于上述液体培养基混匀, 取 OD 值为 0.4–0.5 的菌液 0.2 mL 加入到装有 19.8 mL 培养液的 75 cm² 细胞培养瓶中, 混匀后测 OD 值。将培养瓶置于 5% CO₂ 培养箱中, 35 °C 振荡培养(30 r/min) 9 d。Bb 培养温度为 28 °C 和 35 °C。

1.5.3 生长曲线测定: (1) OD 值测定: 接种培养后每天测定培养液 600 nm 波长下的 OD 值, 以同样培养条件下未加细菌的培养液作为空白对照,

绘制生长曲线。(2) 细菌生长量(CFU)测定: 接种培养后每天测定培养液中的菌量, 绘制生长曲线。方法: 吸取 10 μL 培养液加入 90 μL TSB 中做梯度稀释(10^{-1} – 10^{-10}), 每个稀释度取 10 μL 接种到 TSA 平板上 3 份, 置于 35 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 计数菌落生长的平均数。

1.5.4 菌体湿重测定: 2 655 \times g 离心 10 min 收集菌体, PBS 洗 3 次后离心称重。

1.5.5 世代时间计算: 依据公式 $G=(t_2-t_1)/[(\log W_1-\log W_2)/\lg 2]$ 计算巴尔通体的世代时间, 公式中 G 为世代时间(Generation time), t_1 和 t_2 为所取对数期两点的时间; W_1 和 W_2 分别为相应时间测得的细胞浓度(CFU/mL)。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 计量数据之间的差异比较采用 *t* 检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 实验菌株
Table 1 The origins of the *Bartonella* strains analyzed in the study

菌株名称 Species	缩写 Abbreviation	菌株名称 Strain name	菌种编号(来源) Collection No. (Source)	分离地 Geographic origin	宿主 Primary reservoir
汉赛巴尔通体 <i>B. henselae</i>	Bh	Houston-1	ATCC 49882 (人)	美国德克萨斯州	猫
五日热巴尔通体 <i>B. quintana</i>	Bq	Fuller	VR-358 (人)	前南斯拉夫	人
克氏巴尔通体 <i>B. clarridgeiae</i>	Bc	Houston-2 cat	51734 (猫)	美国德克萨斯州	猫
克勒巴尔通体 <i>B. koehlerae</i>	Bk	C-29	700693 (猫)	美国加利福尼亚	猫
杆菌样巴尔通体 <i>B. bacilliformis</i>	Bb	KC583	35685 (人)	秘鲁	人
文森巴尔通体博格霍夫亚种 <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>Berkhoffii</i>	Bvb	NCSU 93-CO1	51672TM (犬)	美国北卡罗来纳州	犬
文森巴尔通体阿鲁潘亚种 <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>Arupensis</i>	Bva	OK 94-513	700727 (人)	美国怀俄明州	鼠
文森巴尔通体文森亚种 <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	Bvv	Baker	VR-152 (鼠)	加拿大魁北克	鼠
伊丽莎白巴尔通体 <i>B. elizabethae</i>	Be	F9251	49927 (人)	美国马萨诸塞州	鼠
格拉汉姆巴尔通体 <i>B. grahamii</i>	Bg	NCTC 12860	700132 (鼠)	英国	鼠
道志巴尔通体 <i>B. doshiae</i>	Bd	NCTC 12862	700133 (鼠)	英国	鼠
特利波契巴尔通体 <i>B. tribocorum</i>	Bt	IBS 506	CIP 105476 (鼠)	法国	鼠

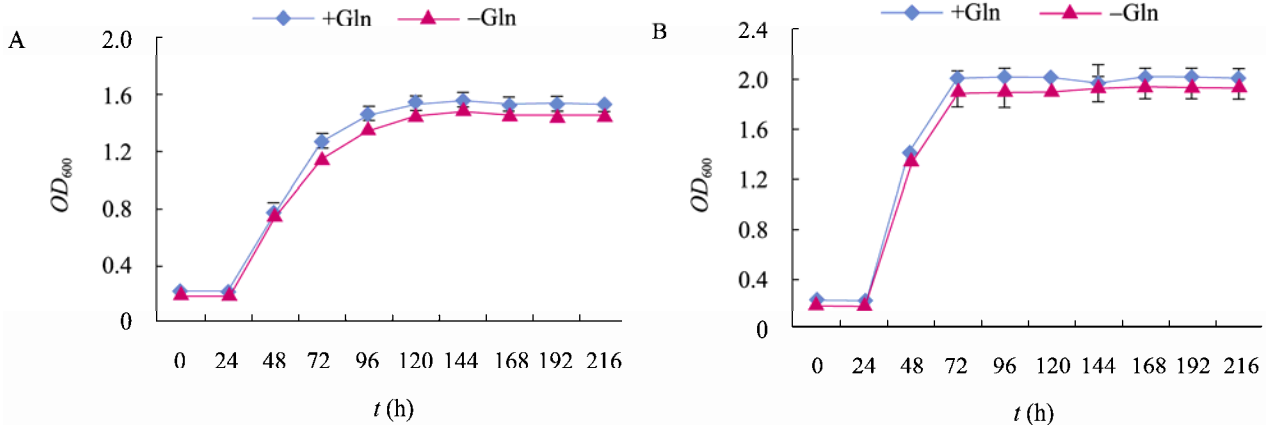


图1 谷氨酰胺对汉赛巴尔通体(A)和五日热巴尔通体(B)液体培养的影响

Fig. 1 Growth curves of *B. henselae* (A) and *B. quintana* (B)

注: 培养液为含 10% FCS 昆虫细胞培养基; +Gln 和 -Gln 分别表示添加和不添加谷氨酰胺; 每 24 h 测定细菌培养液在 600 nm 波长下的 OD 值。

Note: *Bartonella* cells were cultured in Schneider's insect medium containing 10% FCS with glutamine-supplemented (+Gln) or non-supplemented (-Gln). Bacterial growth was determined by measuring the OD_{600} in triplicates at 24 h intervals.

2 结果

2.1 谷氨酰胺添加对照实验

在基础液体培养基中添加 2 mmol/L 谷氨酰胺, 观察汉赛巴尔通体、五日热巴尔通体两种不同宿主巴尔通体的生长情况。从生长曲线看, 添加谷氨酰胺的汉赛巴尔通体在对数生长期和稳定期的 OD 值均高于未添加的(图 1), 但没有显著性差异($P>0.05$); 五日热巴尔通体在添加谷氨酰胺后细菌量在对数生长期和稳定期略微有所增加, 但影响不大($P>0.05$)。

2.2 蔗糖添加对照实验

选用汉赛巴尔通体和五日热巴尔通体观察液体培养基中添加蔗糖后细菌生长曲线的变化。结果发现, 添加蔗糖对这两种巴尔通体生长有一定影响, 但并不显著, $P>0.05$ (表 2、3)。

从生长曲线看, 汉赛巴尔通体和五日热巴尔通体生长速度不同, 对添加蔗糖的反应也不同(图 2A、2B、2C、2D)。汉赛巴尔通体对蔗糖不敏感, 培养液中添加蔗糖后生长基本趋势没有变

化(图 1A、1C)。添加蔗糖使五日热巴尔通体在对数生长期浓度略高, 稳定期后菌液浓度低于未添加蔗糖的培养液(图 1B、1D)。

相比汉赛巴尔通体在接种后第 1 天进入对数生长期, 五日热巴尔通体几乎没有停滞期直接进入对数生长期; 在添加蔗糖的培养基中, 五日热巴尔通体和汉赛巴尔通体分别在第 3 天和第 4 天间维持在稳定期; 在未加蔗糖的培养基中, 五日热巴尔通体接种后第 4 天菌液浓度达到最高, 随即进入衰亡期。

培养第 4 天时测定每瓶培养液内全部细菌的湿重, 添加与不添加蔗糖培养菌量分别为: 汉赛巴尔通体是 65.7 mg 和 68.5 mg, 五日热巴尔通体是 124.8 mg 和 120.3 mg。五日热巴尔通体的菌量明显高于汉赛巴尔通体($P<0.01$), 添加蔗糖对这两种菌的收获量均没有明显影响, $P>0.05$ 。

依据公式 $G=(t_2-t_1)/[(\log W_1-\log W_2)/\lg 2]$ 计算两种巴尔通体的世代时间, 选择对数期斜率最大的两点作为 t_1 和 t_2 。汉赛巴尔通体依据第 1 天和

第 2 天菌液浓度(CFU/mL)计算世代时间为 5.2 h; 五日热巴尔通体依据第 2 天和第 3 天菌液浓度(CFU/mL)计算世代时间为 4.3 h。

在培养过程中, 培养液的 pH 变化与生长曲

线基本是一致的, 对数期时 pH 处于上升期, 从最初的 5.5 逐渐上升至 8.0 不再变化, 培养液从酸性逐渐向碱性转变, 添加蔗糖与否不影响这一变化过程。

表 2 添加蔗糖对汉赛巴尔通体生长曲线的影响
Table 2 Growth curve of *B. henselae* in liquid culture depending on the addition of 5% sucrose

Culture days	$x \pm s^a$ (CFU/mL, OD_{600} values)	
	+Suc ^b	-Suc ^c
0	$2.10 \times 10^6 \pm 2.65 \times 10^5$ (0.20±0.00)	$2.10 \times 10^6 \pm 2.65 \times 10^5$ (0.20±0.00)
1	$4.03 \times 10^6 \pm 5.77 \times 10^5$ (0.20±0.00)	$3.27 \times 10^6 \pm 1.53 \times 10^5$ (0.20±0.00)
2	$1.07 \times 10^8 \pm 2.52 \times 10^7$ (0.30±0.06)	$8.00 \times 10^7 \pm 1.00 \times 10^6$ (0.26±0.00)
3	$4.00 \times 10^8 \pm 1.00 \times 10^8$ (0.60±0.00)	$6.00 \times 10^8 \pm 2.65 \times 10^7$ (0.80±0.00)
4	$6.00 \times 10^8 \pm 1.00 \times 10^8$ (1.00±0.06)	$7.33 \times 10^8 \pm 5.77 \times 10^7$ (1.16±0.00)
5	$3.30 \times 10^8 \pm 1.53 \times 10^8$ (1.30±0.06)	$2.13 \times 10^8 \pm 1.53 \times 10^7$ (1.44±0.00)
6	$2.10 \times 10^7 \pm 1.00 \times 10^6$ (1.37±0.06)	$2.60 \times 10^7 \pm 1.00 \times 10^7$ (1.51±0.06)
7	$9.00 \times 10^6 \pm 3.61 \times 10^6$ (1.38±0.06)	$4.30 \times 10^6 \pm 1.53 \times 10^6$ (1.51±0.06)
8	$3.00 \times 10^6 \pm 0.00$ (1.38±0.06)	$1.70 \times 10^6 \pm 5.77 \times 10^5$ (1.51±0.06)
9	$5.30 \times 10^5 \pm 1.15 \times 10^5$ (1.36±0.06)	$4.70 \times 10^5 \pm 2.52 \times 10^5$ (1.46±0.06)

注: ^a: 添加和不添加蔗糖对于汉赛巴尔通体生长没有显著影响, $P > 0.05$; ^b: SIM 培养液中添加 5% 蔗糖; ^c: SIM 培养液中未添加 5% 蔗糖。

Note: ^a: There was no significance between +Suc and -Suc in *B. henselae*, $P > 0.05$; ^b: The Schneider's insect medium was supplemented with 5% sucrose; ^c: The Schneider's insect medium was not supplemented with 5% sucrose.

表 3 添加蔗糖对五日热巴尔通体生长曲线的影响
Table 3 Growth curve of *B. quintana* in liquid culture depending on the addition of 5% sucrose

Culture days	$x \pm s^a$ (CFU/mL, OD_{600} values)	
	+Suc ^b	-Suc ^c
0	$5.30 \times 10^5 \pm 5.77 \times 10^4$ (0.20±0.00)	$5.30 \times 10^5 \pm 5.77 \times 10^4$ (0.20±0.00)
1	$1.10 \times 10^7 \pm 1.41 \times 10^6$ (0.20±0.00)	$3.00 \times 10^6 \pm 1.00 \times 10^6$ (0.20±0.00)
2	$6.00 \times 10^8 \pm 1.73 \times 10^8$ (0.30±0.00)	$4.30 \times 10^7 \pm 1.53 \times 10^7$ (0.20±0.00)
3	$8.70 \times 10^9 \pm 1.53 \times 10^9$ (1.43±0.06)	$2.00 \times 10^9 \pm 0.00$ (0.47±0.06)
4	$8.30 \times 10^9 \pm 2.31 \times 10^9$ (1.80±0.00)	$1.57 \times 10^{10} \pm 5.03 \times 10^9$ (2.13±0.12)
5	$1.47 \times 10^9 \pm 4.16 \times 10^8$ (1.70±0.00)	$7.00 \times 10^9 \pm 2.08 \times 10^8$ (2.07±0.06)
6	$8.70 \times 10^7 \pm 2.08 \times 10^7$ (1.70±0.00)	$5.30 \times 10^8 \pm 5.77 \times 10^7$ (2.07±0.15)
7	$8.00 \times 10^6 \pm 2.83 \times 10^6$ (1.70±0.00)	$1.57 \times 10^8 \pm 2.52 \times 10^7$ (2.03±0.12)
8	$1.10 \times 10^6 \pm 4.00 \times 10^5$ (1.63±0.06)	$2.20 \times 10^7 \pm 26.5 \times 10^6$ (2.00±0.10)
9	$3.00 \times 10^3 \pm 5.77 \times 10^2$ (1.60±0.00)	$5.30 \times 10^5 \pm 1.53 \times 10^5$ (1.93±0.12)

注: ^a: 添加和不添加蔗糖对于五日热巴尔通体生长没有显著影响, $P > 0.05$; ^b: SIM 培养液中添加 5% 蔗糖; ^c: SIM 培养液中未添加 5% 蔗糖。

Note: ^a: There was no significance between +Suc and -Suc in *B. quintana*, $P > 0.05$; ^b: The Schneider's insect medium was supplemented with 5% sucrose; ^c: The Schneider's insect medium was not supplemented with 5% sucrose.

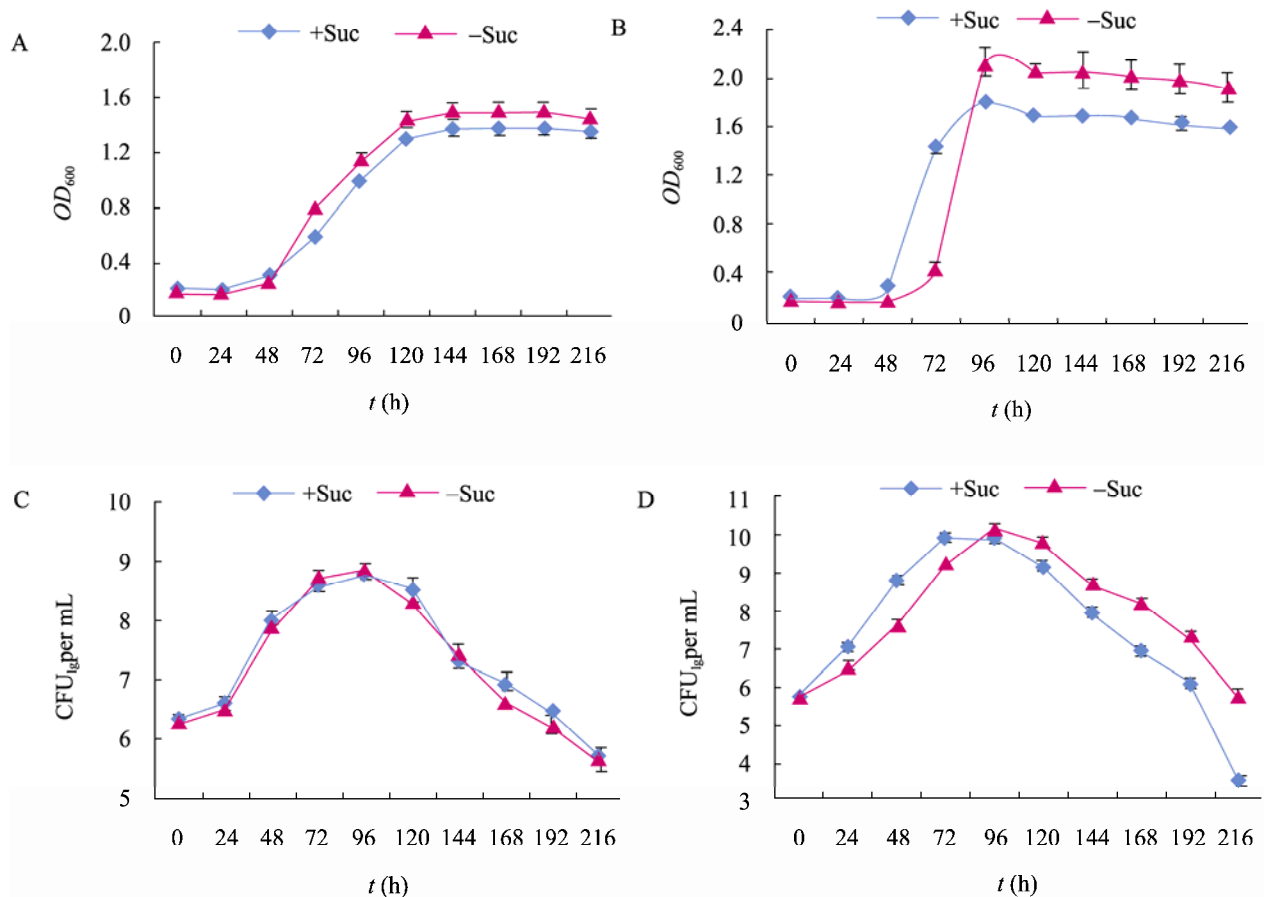


图2 蔗糖对汉赛巴尔通体(A, C)和五日热巴尔通体(B, D)液体培养的影响

Fig. 2 Growth curves of *B. henselae* (A, C) and *B. quintana* (B, D) in Schneider's insect medium containing 10% FCS depending on the addition of 5% sucrose (Suc)

注: 起始接种浓度为 2.0 OD; 图 A、B 和 C、D 分别以每 24 h 细菌培养液 OD 值变化和生长量(CFU/mL)绘制生长曲线。

Note: The initial inoculated concentration was 2.0 OD; Bacterial growth was determined in triplicates by measuring the OD₆₀₀ (A, B) and by quantifying the number of viable bacteria (CFU/mL) at 24 h intervals.

2.3 其他巴尔通体生长曲线的测定

由于 Bc、Bk、Bb、Bvb、Bva、Bvv、Be、Bg、Bd 和 Bt 在固体培养基上生长速度不同, 为掌握这些巴尔通体在液体培养时的状态, 本研究观察记录了它们在液体培养中的生长情况并绘制生长曲线。

从生长曲线看(图 3), Bvb、Bva、Bvv、Be、Bg、Bd 和 Bt 在培养液中生长良好, 大部分菌株

在培养 0-1 d 处于停滞期, 1-4 d 处于对数期; Be 和 Bva 较其他菌生长更快; Bvv 生长略慢, 培养 0-2 d 处于停滞期, 2-6 d 处于对数期。

Bk 在培养液中呈贴壁生长, 在培养第 3 天即可见瓶壁上贴附的白色菌体, 不易脱落, 用力摇动瓶体或强行刮下, 在培养液中形成团块或颗粒, 不易混匀, 无法准确测定 OD 值。Bc 在液体培养基中未见生长。

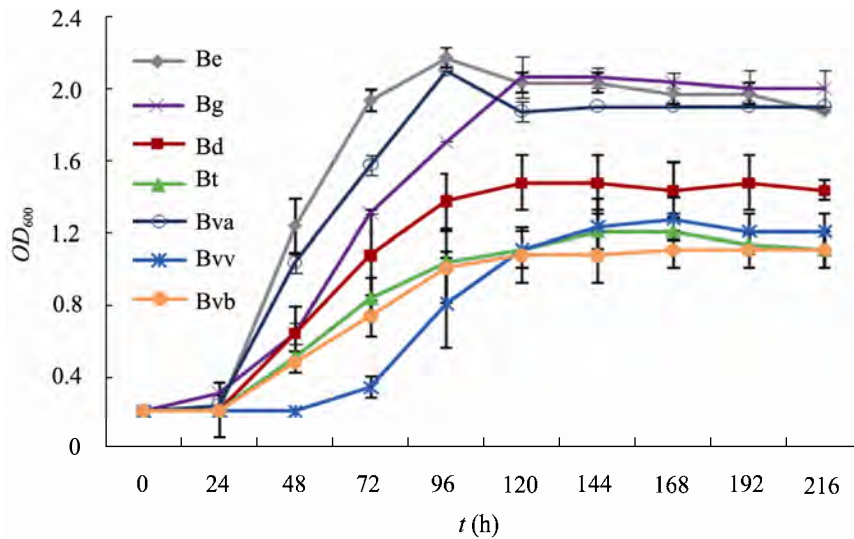


图3 7种巴尔通体 ATCC 标准菌株液体培养的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of 7 ATCC strains of *Bartonella* in Schneider's insect medium containing 10% FCS

注: 每 24 h 测定细菌培养液在 600 nm 波长下的 OD_{600} 值. Be: 伊丽莎白巴尔通体; Bg: 格拉汉姆巴尔通体; Bd: 道志巴尔通体; Bt: 特利波契巴尔通体; Bva: 文森巴尔通体阿鲁潘亚种; Bvv: 文森巴尔通体文森亚种; Bvb: 文森巴尔通体博格霍夫亚种.

Note: Bacterial growth was determined by measuring the OD_{600} in triplicates at 24 h intervals. The strains are, from the right legend: Be: *B. elizabethae*; Bg: *B. grahamii*; Bd: *B. doshiae*; Bt: *B. tribocorum*; Bva: *B. vinsonii* subsp. *arupensis*; Bvv: *B. vinsonii* subsp. *vinsonii*; Bvb: *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*.

3 讨论

由于巴尔通体对铁离子的依赖^[2-3], 在固体培养时需要添加血液成分(羊^[1]、兔^[2]、马^[3]或人^[4]全血), 在已报道的数种液体培养方法中^[4,7-9]也需要添加类似成分, 如动物全血、血红素或胎牛血清, 还有一些其他成分如 Fildes 提取物、氨基酸和矿物盐等。

Riess 等^[1]在研究巴尔通体与果蝇细胞相互作用时发现 SIM 添加 FCS 后适用于巴尔通体的培养, 其他添加成分还有谷氨酰胺和蔗糖。谷氨酰胺是动物细胞培养时必需添加的氨基酸, 巴尔通体可以将其分解为谷氨酸盐作为碳源和能量来源^[10]。本研究中应用的液体培养基是含 L-谷氨酰胺 SIM, 那么在培养中是否有必要再添加此成分, 我们对此做了进一步探讨。研究结果显示添加与否对巴尔通体生长无明显影响, 因此, 建议在应

用这种含 L-谷氨酰胺 SIM 时无需再次添加谷氨酰胺。关于蔗糖是否对巴尔通体生长有促进效果, 本研究结果与 Riess 等^[1]的报道不一致, 即添加蔗糖没有明显促进巴尔通体的生长。由于没有完全的糖酵解途径, 巴尔通体不能利用葡萄糖作为能量来源^[10], 如何利用蔗糖及其是否能作为碳源或能量来源或其他作用, 还需要进一步的研究, 或许将能够解释结果不一致的原因。

在固体培养时汉赛巴尔通体和五日热巴尔通体的生长速度和菌量没有明显差别, 而液体培养使五日热巴尔通体在这两方面都优于汉赛巴尔通体, 菌量几乎是汉赛巴尔通体的 2 倍, 通过计算世代时间, 也可以看出五日热巴尔通体的繁殖速度快于汉赛巴尔通体, 为什么液体培养会造成这种生长速度的差异, 还有待于进一步研究。

巴尔通体生长的最适 pH 是 6.8-7.2^[10], 从生长曲线看, 这个范围是对数期, 随着 pH 不断升

高, 巴尔通体的繁殖进入衰亡期。液体培养过程中 pH 的变化与分解氨基酸产生 NH_3 有关^[10], 氨基酸不断被消耗产生 NH_3 使培养液碱化, 直至不再适于巴尔通体生长。因此, 在传代培养时, 应该在对数期或稳定期将菌体重新接入新的培养液中。另外, 也可以将 pH 的变化作为指示, 判断培养液中氨基酸的消耗和巴尔通体的生长状态。

本研究还对其他 10 种巴尔通体进行了液体培养, 发现鼠类宿主的巴尔通体较猫、犬和人作为宿主的巴尔通体生长速度要快, 与固体培养是一致的。生长曲线反映出不同种巴尔通体具有不同繁殖速度, 为进一步掌握这些巴尔通体的生长特性提供了基础数据。总的来说, 在液体培养基中巴尔通体的生长比在固体培养基上快, 特别是某些种, 如克勒巴尔通体和杆菌样巴尔通体(数据未显示), 在固体培养基上生长非常缓慢, 通常需要 10 d 才能长出微小菌落, 而在液体培养时生长明显加快, 因此, 这种液体培养方法为这类更难培养的巴尔通体提供了很好的解决办法。

致谢: 感谢英国萨福大学 Richard Birtles 教授在实验过程中给予的指导和讨论。感谢美国佐治亚南方大学 Marina E. Ereemeva 博士对论文摘要的修改。

参 考 文 献

- [1] Riess T, Dietrich F, Schmidt KV, et al. Analysis of a novel insect cell culture medium-based growth medium for *Bartonella* species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(16): 5224-5227.
- [2] Sander A, Kretzer S, Bredt W, et al. Hemin-dependent growth and hemin binding of *Bartonella henselae*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 189(1): 55-59.
- [3] Zimmermann R, Kempf VAJ, Schiltz E, et al. Hemin binding, functional expression, and complementation analysis of Pap 31 from *Bartonella henselae*[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(5): 1739-1744.
- [4] Daly JS, Worthington MG, Brenner DJ, et al. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1993, 31(4): 872-881.
- [5] Slater LN, Welch DF, Hensel D, et al. A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia[J]. The New England Journal of Medicine, 1990, 323(6): 1587-1593.
- [6] Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB. Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2004, 224(8): 1270-1279.
- [7] Wong MT, Thornton DC, Kennedy RC, et al. A chemically defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea (Bartonella) henselae* from blood and tissue specimens[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(3): 742-744.
- [8] Schwartzman WA, Nesbit CA, Baron EJ. Development and evaluation of a blood-free medium for determining growth curves and optimizing growth of *Rochalimaea henselae*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1993, 31(7): 1882-1885.
- [9] Maggi RG, Duncan AW, Breitschwerdt EB. Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven *Bartonella* species[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(6): 2651-2655.
- [10] Chenoweth MR, Somerville GA, Krause DC, et al. Growth characteristics of *Bartonella henselae* in a novel liquid medium: primary isolation, growth-phase-dependent phage induction, and metabolic studies[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(2): 656-663.