

基于不同通用培养基的真菌培养组学方法研究

张舒¹,周梦诗^{2#},李睿²,耿圆圆¹,赵飞¹,何利华¹,龚杰^{1,3*}

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. 西安博睿康宁生物医学中心有限公司, 陕西 西安 712000;

3. 安徽师范大学生态与环境学院, 省部共建皖江流域退化生态系统的恢复与重建协同创新中心, 安徽 芜湖 241002

摘要: **目的** 通过对多种通用真菌培养基的性能对比,选择在病原真菌分离培养上普适性更高的培养基,优化真菌培养组学技术,更好地用于病原真菌的培养组学研究。**方法** 利用多种常用的真菌培养基[沙保罗葡萄糖琼脂培养基(Sabouraud dextrose agar, SDA)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)、改良Dixon琼脂培养基(modified Dixon, mDixon)、改良Leeming-Notman琼脂培养基(modified Leeming-Notman agar, mLNA)等]和新型Pan-fungal培养基(pan-fungal medium, PF)对40株常见的病原真菌菌株进行培养,明确菌株在不同培养基上的生长状态。在此基础上,使用PF、SDA、PDA、mDixon、MLNA共5种培养基对1例模拟样本(白念珠菌与烟曲霉的混悬液)、10例人体样本(4例粪便样本、6例阴道分泌物样本)和3例环境样本进行菌株分离培养。**结果** 40株病原真菌在7种培养基上的阳性生长率分别为PDA 95.0%(38/40)、SDA 95.0%(38/40)、BHI 95.0%(38/40)、YPD 90.0%(36/40)、mDixon 95.0%(38/40)、MLNA 87.5%(35/40)、PF 100.0%(40/40)。在模拟样本实验中,PF培养基能使丝状真菌表现为自限性生长,在菌株分离培养方面获得更优的结果。而在人体和环境样本的分离培养中,PF培养基具有和SDA、PDA培养基一样强的通用性。**结论** 在病原真菌的分离培养方面,PF培养基能够有效地对多数真菌菌种进行分离培养,且能使在常用真菌培养基上快速生长的真菌呈现为自限性生长,边缘清晰,不易交叉污染,有利于单菌落的分离鉴定,在培养组学中对未知样本的菌株分离方面有明显的优势,可有效地用于真菌培养组学研究。

关键词: 病原真菌;真菌培养组学;分离培养;通用培养基;Pan-fungal培养基

中图分类号:R379 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2023)08-783-07

DOI:10.13604/j.cnki.46-1064/r.2023.08.01

Research on fungal culturomics based on different universal media

ZHANG Shu¹, ZHOU Mengshi², LI Rui², GENG Yuanyuan¹, ZHAO Fei¹, HE Lihua¹, GONG Jie^{1,3}

1. State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2. Xi'an Bioreal-coming Biomedical Center Co.,Ltd, Xi'an, Shaanxi 712000, China; 3. Collaborative Innovation Center of Recovery and Reconstruction of Degraded Ecosystem in Wanjiang Basin Co-founded by Anhui Province and Ministry of Education, School of Ecology and Environment, Anhui Normal University, Wuhu, Anhui 241002, China

Corresponding author: GONG Jie, E-mail: gongjie@icdc.cn

Abstract: **Objective** To screen out a more universally applicable culture medium for the isolation and culturing of pathogenic fungi through comparing the performance of various universal fungal culture media, to optimize the fungal culturomics technique, and to better apply it to the culturomics research of pathogenic fungi. **Methods** Multiple common fungal culture media Sabouraud dextrose agar (SDA), potato dextrose agar (PDA), modified Dixon (mDixon), modified Leeming-Notman agar (MLNA), etc., and a new pan-fungal medium (PF) were used to culture 40 strains of common pathogenic fungi to determine the growth states of strains under different conditions. Based on that, PF, SDA, PDA, mDixon and MLNA, a total of 5 culture media, were used to isolate and culture a simulated sample (suspension of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*), 10 human samples (4 fecal samples and 6 vaginal secretion samples) and 3 environmental samples. **Results** The positive growth rates of 40 strains of pathogenic fungi in the 7 media were as follows: PDA 95.0% (38/40), SDA 95.0% (38/40), BHI 95.0% (38/40), YPD 90.0% (36/40), mDixon 95.0% (38/40), MLNA 87.5% (35/40), PF 100.0% (40/40). For the simulated samples, PF could effectively promote the self-limited growth of filamentous fungi, performing better in isolation and culture. For the human samples and environmental samples, PF showed the same versatility as SDA and PDA. **Conclusions** In the

基金项目:国家重点研发计划项目(No. 2022YFC2504800)

#周梦诗为共同第一作者

作者简介:张舒(1995—),女,硕士,实习研究员,研究方向:病原真菌。

周梦诗(1995—),女,本科,研究方向:病原微生物。

*通信作者:龚杰, E-mail: gongjie@icdc.cn

isolation and culturing of pathogenic fungi, PF medium can effectively isolate and culture most fungal species. Meanwhile, PF can make the fast-growing fungi show self-limited growth and clear edges, and not easy to cross-contamination, which indicates it is conducive to the isolation and identification of single colonies. PF medium outperforms other common media in isolating strains from unknown samples in culturomics, which illustrates PF medium can be effectively used for the study of fungal culturomics.

Keywords: Pathogenic fungi; fungal culturomics; isolation and culture; universal medium; pan-fungal medium

真菌是和动物、植物并列的一个独立的真核生物界,具有非常高的物种多样性,目前,一般认为真菌界的物种总数达200~500万,约有12万个物种已经被准确地描述^[1-2]。一方面,真菌是宝贵的医药资源,如利用真菌开发的抗生素等药物显著提高了人类健康水平和寿命^[3];另一方面,真菌中有200余个物种明确能导致人类感染^[4],由病原真菌造成的感染率逐年升高,严重影响人类健康安全^[5-6]。然而,目前已被认知和描述的真菌还不足总多样性的6%,大量真菌的背景信息尚未得到认知。在目前多种微生物鉴定技术平台的发展下,真菌的分离、培养和鉴定仍是真菌病诊疗、发现和利用真菌生理功能和代谢潜力的主要技术手段。

真菌培养组学是一种通过改善培养条件培养真菌的方法。该方法通过改善培养条件,尽可能多地获得可培养菌株,并结合基质辅助激光解析串联飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)和核糖体RNA内转录间隔区(ribosomal DNA internal transcribed spacer, ITS rRNA)基因测序等技术对分离得到的菌株进行鉴定^[7-8]。鉴定的准确性取决于从初级培养板(即直接样品)中挑选真菌菌落的精度以及适用于真菌菌落生长的培养基。其中,改良培养基组分、培养条件优化等是真菌培养组学中主要分离技术^[9]。

本研究通过对常用6种真菌培养基和新型Pan-fungal培养基(pan-fungal medium, PF)的性能对比,尝试初步构建更合理的真菌培养组学标准方案,用于病原真菌的培养组学研究。

1 材料与方法

1.1 样本来源

1.1.1 菌株样本 实验用菌株保存于中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,包括8个属的21种真菌,共计40株,见表1。

1.1.2 临床和环境样本 临床样本共10例,包含来源于4名健康人群志愿者的粪便样本(F01~F04),以及来源于6例临床患者的阴道分泌物样本(Y01~Y06);环境样本为河道泥沙样本3份(H01~H03),均来源于咸阳市沔河南岸,为河岸浅水区挖掘取出的泥沙及河水的等比例混合物。

1.2 培养条件及方法

1.2.1 培养基 选用6种常用培养基,包括马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)、沙保罗葡萄糖琼脂培养基(Sabouraud dextrose agar, SDA)、脑心浸液琼脂培养基(brain-heart infusion agar, BHI)、酵母蛋白胨葡萄糖琼脂培养基(yeast-peptone dextrose agar, YPD)、改良Dixon琼脂培养基(modified dixon agar, mDixon)、改良Leeming-Notman琼脂培养基(Leeming & Notman agar modified, MLNA)和1种新型培养基PF,均购自西安博睿康宁生物医学中心有限公司。

1.2.2 菌株样本的培养

1.2.2.1 菌株培养 将病原真菌的菌悬液或孢子洗脱液,分别在生理盐水中重悬稀释,接种至上述7种培养基上,28℃恒温培养,观察菌株在不同培养基上的生长情况。

1.2.2.2 模拟标本的培养 将烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)孢子洗脱液和耳念珠菌(*Candida auris*)悬液均调整至OD₆₀₀为0.1,稀释1000倍,两者等比例混合均匀,取50 μL涂布于3种培养基(PF、SDA、PDA)上,28℃恒温培养,观察菌落生长情况。

1.2.3 临床样本的培养 临床样本使用1 mL无菌生理盐水稀释,振荡混匀后取100 μL涂布至5种培养基(PF、SDA、PDA、mDixon、MLNA)上,28℃恒温培养。平板上长出菌落后,挑取菌丝或单菌落进一步转接和纯化培养。

1.2.4 环境样本的培养 环境样本为泥沙及河水的等比例混合物,将样本混匀后取100 μL接种到5种培养基(PF、SDA、PDA、mDixon、MLNA)上,28℃恒温培养。平板上长出菌落后,挑取菌丝或单菌落转接2~3次以获得纯培养菌株。

1.3 分离菌株的鉴定 分离纯化得到的菌株,采用真菌DNA提取试剂盒提取DNA。使用ITS通用引物对环境及临床菌株的ITS rDNA区进行PCR扩增,引物序列如下:ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3')、ITS4(5'-TCCTCCGCT TATTGATATGC-3')^[10]。PCR扩增采用30 μL反应体系,包括:PCR Mix(2')(TaKaRa)15 μL,正向、反向引物各0.9 μL,无菌水11.2 μL, DNA模板2 μL;反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸40 s,

进行34个循环;72℃延伸10 min。PCR产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果在NCBI数据库上进行比对(BLAST),确定菌种名称。

2 结果

2.1 菌株培养结果 从表1可见,40株病原真菌在不同培养基上的阳性生长率不同,分别为PDA 95.0%(38/40)、SDA 95.0%(38/40)、BHI 95.0%(38/40)、YPD

90.0%(36/40)、mDixon 95.0%(38/40)、MLNA 87.5%(35/40)、PF 100.0%(40/40)。

酵母相真菌中,念珠菌属6种菌株在7种培养基上均能良好生长,菌落生长速度、菌落形态、大小及菌落数基本一致。对于隐球菌属,除在mDixon和MLNA不能生长或缓慢生长外,在其他5种培养基上能够生长良好,各培养基上菌落大小接近,菌落形态完整。

表1 本研究所用真菌菌株及其在7种培养基上的培养成功率 %

Table 1 Fungal strains used in this study and culture success rates of them inoculated onto seven media %

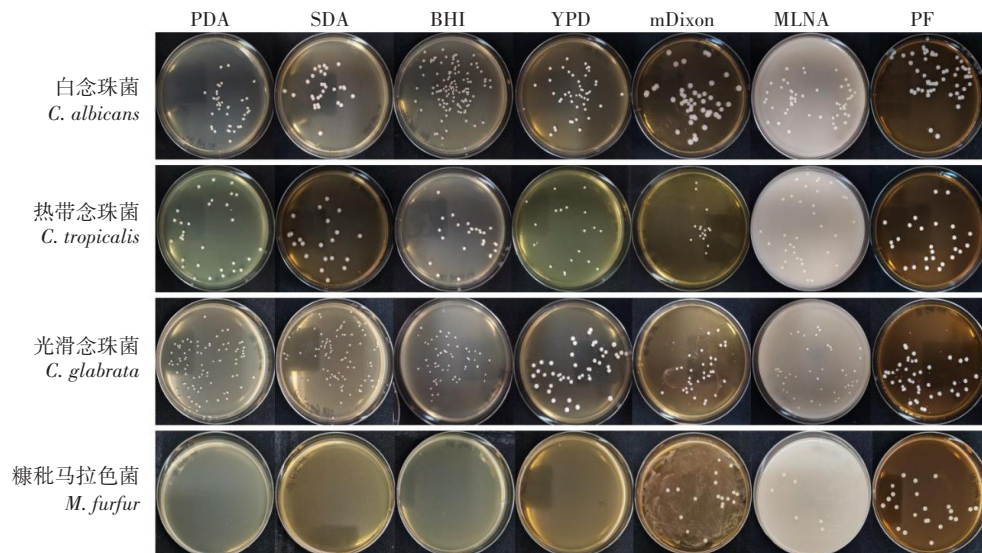
| 菌种名称 Strains name | 株数 n | PDA | SDA | BHI | YPD | mDixon | MLNA | PF |
|--------------------------------|------|------|------|------|------|--------|------|-------|
| 酵母相真菌 Yeast-like fungi | | | | | | | | |
| 念珠菌属 <i>Candida</i> spp. | | | | | | | | |
| 白念珠菌 <i>C. albicans</i> | 2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 热带念珠菌 <i>C. tropicalis</i> | 2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 克柔念珠菌 <i>C. krusei</i> | 2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 近平滑念珠菌 <i>C. parapsilosis</i> | 2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 光滑念珠菌 <i>C. glabrata</i> | 2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 耳念珠菌 <i>C. auris</i> | 2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 隐球菌属 <i>Cryptococcus</i> spp. | | | | | | | | |
| 新生隐球菌 <i>C. neoformans</i> | 2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 50 | 50 | 100 |
| 格特隐球菌 <i>C. gattii</i> | 2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 50 | 0 | 100 |
| 毛孢子菌属 <i>Trichosporon</i> spp. | | | | | | | | |
| 阿萨希毛孢子菌 <i>T. asahii</i> | 2 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 马拉色菌属 <i>Malassezia</i> spp. | | | | | | | | |
| 糠秕马拉色菌 <i>M. furfur</i> | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 丝状真菌 Filamentous fungi | | | | | | | | |
| 曲霉属 <i>Aspergillus</i> spp. | | | | | | | | |
| 黄曲霉 <i>A. flavus</i> | 2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 黑曲霉 <i>A. niger</i> | 2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 花斑曲霉 <i>A. versicolor</i> | 2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 构巢曲霉 <i>A. nidulans</i> | 1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 烟曲霉 <i>A. fumigatus</i> | 2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 棘孢曲霉 <i>A. aculeatus</i> | 2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 土曲霉 <i>A. terreus</i> | 1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 毛癣菌属 <i>Trichophyton</i> spp. | | | | | | | | |
| 须癣毛癣菌 <i>T. mentagrophytes</i> | 1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 趾间毛癣菌 <i>T. interdigitale</i> | 2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 双相真菌 Dimorphic fungi | | | | | | | | |
| 篮状菌属 <i>Talaromyces</i> spp. | | | | | | | | |
| 马尔尼菲篮状菌 <i>T. marneffei</i> | 2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 |
| 孢子丝菌属 <i>Sporothrix</i> spp. | | | | | | | | |
| 球形孢子丝菌 <i>S. globosa</i> | 3 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 总计 Total | 40 | 95.0 | 95.0 | 95.0 | 90.0 | 95.0 | 87.5 | 100.0 |

注: PDA. 马铃薯葡萄糖琼脂培养基; SDA. 沙保罗葡萄糖琼脂培养基; BHI. 脑心浸液琼脂培养基; YPD. 酵母蛋白胨葡萄糖琼脂培养基; mDixon. 改良 Dixon 琼脂培养基; MLNA. 改良 Leeming-Notman 琼脂培养基; PF. Pan-fungal 培养基。Note: PDA. Potato dextrose agar; SDA. Sabouraud dextrose agar; BHI. Brain-heart infusion agar; YPD. Yeast-peptone dextrose agar; mDixon. Modified dixon agar; MLNA. Leeming & Notman agar modified agar; PF. Pan-fungal medium.

而糠秕马拉色菌(*Malassezia furfur*)仅能在PF、mDixon、MLNA 3种培养基上生长,菌落大小接近,形态完整,在其他4种培养基上的生长受抑制(图1)。

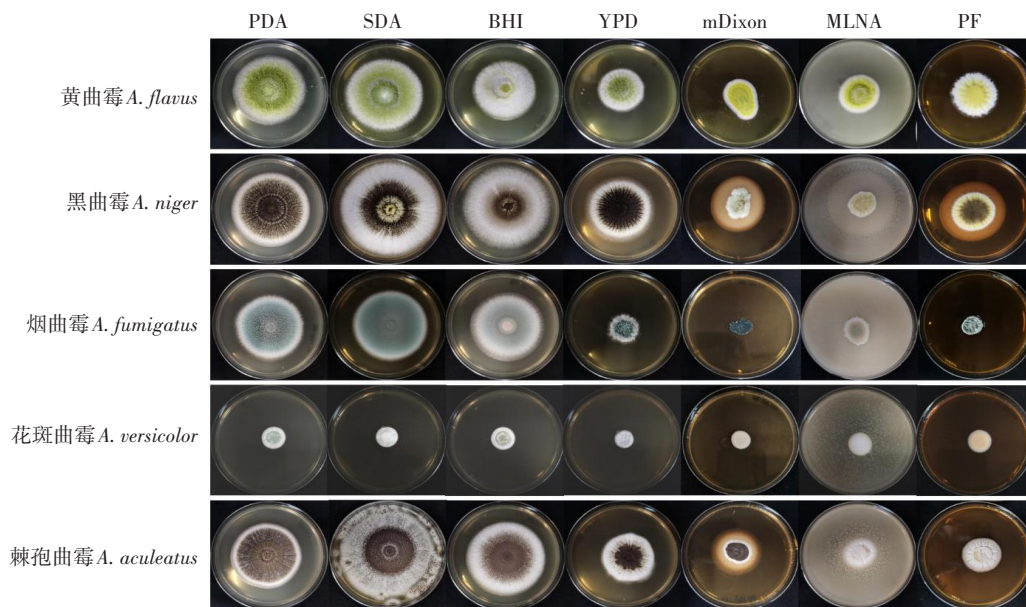
曲霉属真菌在各种培养基上均能生长,但生长速度有明显差异。其中,在PDA、SDA、BHI 3种培养基

呈较为典型的弥漫性生长,如黑曲霉(*Aspergillus niger*)、棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)在SDA培养基上培养时,第5天基本长满培养基表面(90 mm培养皿)。而在PF培养基上,菌落紧致,呈限制性生长,随着培养时间的延长,菌落边界清晰。见表1、图2。



注: PDA. 马铃薯葡萄糖琼脂培养基;SDA. 沙保罗葡萄糖琼脂培养基;BHI. 脑心浸液琼脂培养基;YPD. 酵母蛋白胨葡萄糖琼脂培养基;mDixon. 改良Dixon琼脂培养基;MLNA. 改良Leeming-Notman琼脂培养基;PF. Pan-fungal培养基。Note: PDA. Potato dextrose agar; SDA. Sabouraud dextrose agar; BHI. Brain-heart infusion agar; YPD. Yeast-peptone dextrose agar; mDixon. Modified dixon agar; MLNA. Leeming & Notman agar modified agar; PF. Pan-fungal medium.

图1 部分酵母相真菌在不同培养基上的生长情况(第3天)
Fig. 1 The growth of yeast-like fungi on different media (Day 3)



注: PDA. 马铃薯葡萄糖琼脂培养基;SDA. 沙保罗葡萄糖琼脂培养基;BHI. 脑心浸液琼脂培养基;YPD. 酵母蛋白胨葡萄糖琼脂培养基;mDixon. 改良Dixon琼脂培养基;MLNA. 改良Leeming-Notman琼脂培养基;PF. Pan-fungal培养基。Note: PDA. Potato dextrose agar; SDA. Sabouraud dextrose agar; BHI. Brain-heart infusion agar; YPD. Yeast-peptone dextrose agar; mDixon. Modified dixon agar; MLNA. Leeming & Notman agar modified agar; PF. Pan-fungal medium.

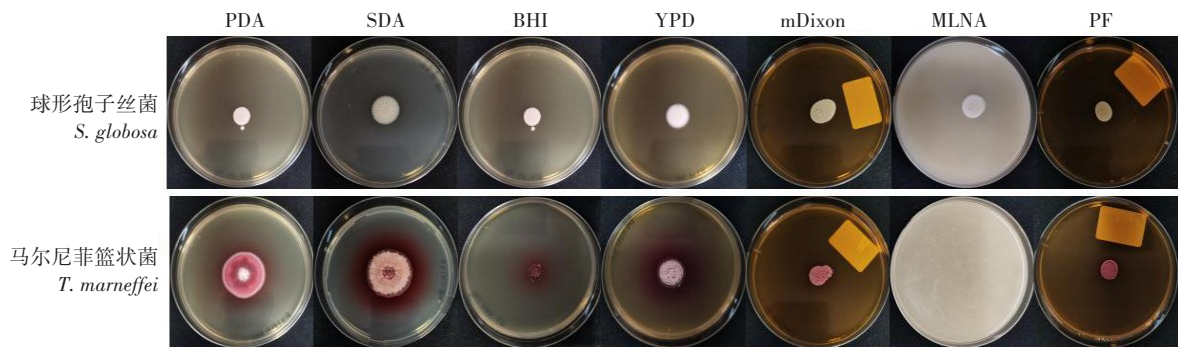
图2 部分曲霉属在不同培养基上的生长情况(第5天)
Fig. 2 The growth of *Aspergillus* spp. on different media (Day 5)

双相真菌中,球形孢子丝菌(*Sporothrix globosa*)在7种培养基上均生长良好,形态完整;马尔尼菲篮状菌(*Talaromyces marneffeii*)在MLNA培养基上几乎不生长(菌落直径0.1 cm),在其余6种培养基上均能正常生长,其中SDA和PDA的生长速度最快。见图3。

2.2 耳念珠菌的分离模拟实验 结果显示(图4),SDA和PDA培养基上,烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)生长速度快,呈弥漫性生长,耳念珠菌(*Candida auris*)

落散在其中,挑取耳念珠菌的单克隆时易被烟曲霉污染,分离难度大。而在PF培养基上,烟曲霉与耳念珠菌大小接近,呈自限性生长的圆形菌落,散在分布。

2.3 临床和环境样本培养结果 从表2可见,粪便样本F02在PDA、SDA、PF上有菌落生长,样本F03在PDA、SDA、mDixon、PF上有菌落生长,阴道分泌物样本Y01在PDA、SDA、mDixon、PF上有菌落生长,样本Y04在PDA、SDA、PF上有菌落生长。将以上菌落全部进行分离纯化,通过扩增测序,利用NCBI数据库对



注: PDA. 马铃薯葡萄糖琼脂培养基;SDA. 沙保罗葡萄糖琼脂培养基;BHI. 脑心浸液琼脂培养基;YPD. 酵母蛋白胨葡萄糖琼脂培养基;mDixon. 改良Dixon琼脂培养基;MLNA. 改良Leeming-Notman琼脂培养基;PF. Pan-fungal培养基。Note: PDA. Potato dextrose agar; SDA. Sabouraud dextrose agar; BHI. Brain-heart infusion agar; YPD. Yeast-peptone dextrose agar; mDixon. Modified dixon agar; MLNA. Leeming & Notman agar modified agar; PF. Pan-fungal medium.

图3 部分双相真菌在不同培养基上的生长情况(第10天)
Fig. 3 The growth of dimorphic fungi on different media (Day 10)

表2 临床和环境样本中真菌菌株分离鉴定结果

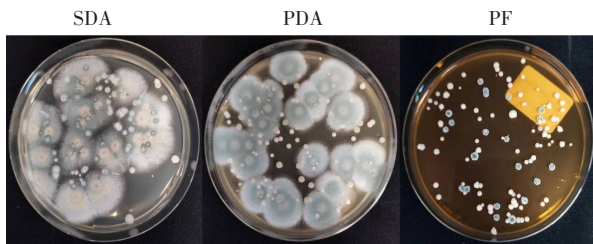
Table 2 Isolation and identification of fungal strains in clinical and environmental samples

| 编号 Serial No. | PDA | | SDA | | mDixon | | MLNA | | PF | |
|------------------|-------------------------------|---------|-------------------------------|---------|-------------------------------|---------|-------------------------------|---------|-------------------------------|---------|
| | 鉴定结果 Identification result | 株数 n | 鉴定结果 Identification result | 株数 n | 鉴定结果 Identification result | 株数 n | 鉴定结果 Identification result | 株数 n | 鉴定结果 Identification result | 株数 n |
| F01 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 |
| F02 | 白念珠菌 | 10 | 白念珠菌 | 12 | - | 0 | - | 0 | 白念珠菌 | 7 |
| F03 | 白念珠菌 | 13 | 白念珠菌 | 14 | 白念珠菌 | 5 | - | 0 | 白念珠菌 | 9 |
| F04 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 |
| Y01 | 白念珠菌 | 5 | 白念珠菌 | 10 | 白念珠菌 | 6 | - | 0 | 白念珠菌 | 6 |
| Y02 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 |
| Y03 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 |
| Y04 | 白念珠菌 | 4 | 白念珠菌 | 7 | - | 0 | - | 0 | 白念珠菌 | 5 |
| Y05 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 |
| Y06 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 |
| H01 | 黄曲霉 | 1 | 黄曲霉 | 3 | 黄曲霉 | 2 | - | 0 | 黄曲霉 | 2 |
| | - | 0 | 黑曲霉 | 2 | - | 0 | - | 0 | 黑曲霉 | 1 |
| H02 | 黄曲霉 | 2 | 黄曲霉 | 3 | 黄曲霉 | 2 | - | 0 | 黄曲霉 | 1 |
| H03 | 黄曲霉 | 1 | 黄曲霉 | 2 | 黄曲霉 | 1 | 黄曲霉 | 1 | 黄曲霉 | 1 |
| | 黑曲霉 | 2 | 黑曲霉 | 1 | - | 0 | - | 0 | 黑曲霉 | 1 |

注: PDA. 马铃薯葡萄糖琼脂培养基;SDA. 沙保罗葡萄糖琼脂培养基;mDixon. 改良Dixon琼脂培养基;MLNA. 改良Leeming-Notman琼脂培养基;PF. Pan-fungal培养基;- . 培养结果阴性。Note: PDA. Potato dextrose agar; SDA. Sabouraud dextrose agar; mDixon. Modified dixon agar; MLNA. Leeming & Notman agar modified agar; PF. Pan-fungal medium; -. The culture result is negative.

扩增序列进行比对,发现分离到的临床菌株均为白念珠菌(*Candida albicans*)。

3份河道泥沙样本均有不同数量和形态的菌落生长,对平板菌落分离纯化后进行鉴定发现,同一样本中,SDA、PDA、PF 3种培养基的培养能力相当,如样本H01和H03中同时分离出黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*),而mDixon仅分离出黄曲霉,MLNA仅在H03中分离到1株黄曲霉(表2)。



注: SDA. 沙保罗葡萄糖琼脂培养基;PDA. 马铃薯葡萄糖琼脂培养基;PF. Pan-fungal 培养基。Note: SDA. Sabouraud dextrose agar; PDA. Potato dextrose agar; PF. Pan-fungal medium.

图4 烟曲霉与耳念珠菌混合物在SDA、PDA、PF 3种培养基上的生长情况(第4天)

Fig. 4 The growth of *Aspergillus fumigatus* and *Candida auris* mixture on SDA, PDA and PF medium (Day 4)

3 讨论

SDA和PDA是使用最为广泛的真菌培养基,这2种培养基对菌株具有较好的营养能力^[11],但对于部分生长条件苛刻的真菌,如嗜脂性生长的马拉色菌属,SDA和PDA不能提供相应的营养成分,对于未知样本的培养可能出现假阴性结果^[12-13]。BHI营养成分丰富,常用于细菌培养,也可用于霉菌、酵母的培养。郝小康等^[14]研究表明BHI能够代替人血清作为芽管试验的诱导剂来培养白念珠菌,具有较高的培养阳性率。YPD常用于酵母菌的培养,杨远航等^[15]曾选用添加10%底泥浸出液的YPD培养基,应用于淡水水域底泥和水体中真菌种群分布调查,提高了水体样本种菌落的检出率。mDixon和MLNA培养基中含有脂质成分,是马拉色菌分离和培养的专用培养基^[16-17]。PF培养基是一种新型真菌培养基,前期研究发现PF培养基能够对有效地对多数真菌菌种进行分离培养。

本研究通过多种通用的真菌培养基的性能对比研究,尝试初步构建更合理的真菌培养组学标准方案,用于病原真菌的培养组学研究。首先,测试了多种酵母相真菌、丝状真菌、双相真菌共40株病原真菌在7种培养基(PDA、SDA、BHI、YPD、mDixon、MLNA、PF)上的培养情况。阳性生长率为PDA 95.0%(38/

40)、SDA 95.0%(38/40)、BHI 95.0%(38/40)、YPD 90.0%(36/40)、mDixon 95.0%(38/40)、MLNA 87.5%(35/40)、PF 100%(40/40)。PF培养基可培养的酵母相真菌范围更广,与常规培养基相比,菌株生长速度、菌落形态及大小基本一致,但在培养丝状菌上,存在菌落形态和生长速度的明显不同,其菌落紧致,呈限制性生长。

其次,基于PF培养基在培养丝状真菌时与常规SDA、PDA培养基的差异,通过模拟实验,发现在丝状菌和酵母相真菌共培养的情况下,PF具有快速分离出酵母相真菌的能力。而真实样本中,由于某些菌株数量少、占比小,或生长速度缓慢,易被其他生长快速的菌株掩盖。以耳念珠菌为例,其对于生长环境的适应性较强,复杂的样本类型,如皮肤、血液、尿液、耳分泌物等增加了耳念珠菌分离的难度^[18-20]。尽管SDA与PDA中菌落生长速度较快,但菌落间容易连接生长,不利于挑取单菌落,存在交叉污染的风险^[21],而PF培养基中菌落呈限制性生长,菌落间散在分布,有利于菌株分离,该情况在模拟分离耳念珠菌的实验中较为明显。

最后,通过在多种培养基上对临床和环境样本菌株的分离培养,明确PF培养基在病原真菌分离培养上具有更优的性能,可有效地用真菌培养组学研究。在临床样本的菌株分离培养中,鉴定结果为白念珠菌,与既往报道一致^[22-24]。环境样本中分离出黄曲霉及黑曲霉,除MLNA外,几种培养基分离出的菌落种类数量基本一致。此外,菌种在该培养基上具有明显的自限性生长特点,便于进行未知样本菌种的分离培养。

总体来看,临床和科研领域常用的真菌培养基基本能够对大多数真菌进行培养,然而对于部分生长条件苛刻的真菌,使用传统的真菌培养基,增加了培养组学中对未知样本分离培养的难度,可能导致假阴性结果;此外,菌落在培养基表面的弥漫性生长也为单菌落分离带来了巨大的困难。PF培养基在具有常规真菌培养能力的同时,克服了同类培养基的上述缺点,营养能力能够覆盖更多真菌菌种,菌落呈自限性生长、边缘清晰,不易交叉污染,有利于单菌落的分离鉴定,在培养组学中对未知样本的菌株分离方面有明显的优势。由此可见,PF培养基可作为其他常用真菌培养基的补充,有效地用于真菌培养组学研究。

伦理审查与知情同意 本研究不涉及伦理批准和患者知情同意

利益冲突声明 所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] BLACKWELL M. The fungi: 1, 2, 3.. 5.1 million species?[J]. Am J Bot, 2011, 98(3): 426-438.
- [2] HAWKSWORTH D L, LÜCKING R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species[J]. Microbiol Spectr, 2017, 5(4): FUNK-0052-2016.
- [3] ZHOU Z Y, LIU X, CUI J L, et al. Endophytic fungi and their bioactive secondary metabolites in medicinal Leguminosae plants: nearly untapped medical resources[J]. FEMS Microbiol Lett, 2022, 369(1): fnac052.
- [4] FISHER M C, GURR S J, CUOMO C A, et al. Threats posed by the fungal Kingdom to humans, wildlife, and agriculture[J]. mBio, 2020, 11(3): e00449-e00420.
- [5] BONGOMIN F, GAGO S, OLADELE R O, et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision[J]. J Fungi, 2017, 3(4): 57.
- [6] KÖHLER J R, HUBE B, PUCCIA R, et al. Fungi that infect humans [J]. Microbiol Spectr, 2017, 5(3): FUNK-0014-2016.
- [7] LAGIER J C, DUBOURG G, MILLION M, et al. Culturing the human microbiota and culturomics[J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16: 540-550.
- [8] PEREIRA A C, CUNHA M V. An effective culturomics approach to study the gut microbiota of mammals[J]. Res Microbiol, 2020, 171(8): 290-300.
- [9] 周士越, 周欣, 张志锋, 等. 未培养真菌分离培养方法初探[J]. 菌物学报, 2020, 39(4): 766-776.
ZHOU S Y, ZHOU X, ZHANG Z F, et al. Attempt to isolate hitherto uncultured fungi[J]. Mycosystema, 2020, 39(4): 766-776. (in Chinese)
- [10] IRINYI L, SERENA C, GARCIA-HERMOSO D, et al. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM) -ITS reference DNA barcoding database—the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi[J]. Med Mycol, 2015, 53(4): 313-337.
- [11] DE ANGELIS G, MENCHINELLI G, TORELLI R, et al. Different detection capabilities by mycological media for *Candida* isolates from mono- or dual-species cultures[J]. PLoS One, 2020, 15(3): e0226467.
- [12] KINDO A J, SOPHIA S K C, KALYANI J, et al. Identification of *Malassezia* species[J]. Indian J Med Microbiol, 2004, 22(3): 179-181.
- [13] CHUA K B, CHUA I L, CHUA I E, et al. A modified mycological medium for isolation and culture of *Malassezia furfur*[J]. Malays J Pathol, 2005, 27(2): 99-105.
- [14] 郝小康, 王宇鹤, 徐世林, 等. 不同培养基对白假丝酵母菌生物膜芽管形成的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(11): 1269-1271.
HAO X K, WANG Y H, XU S L, et al. Comparison among 5 liquid media for germ tube formation of biofilm-producing *Candida albicans*[J]. Chin J Microecol, 2021, 33(11): 1269-1271. (in Chinese)
- [15] 杨远航, 许忠能, 林小涛, 等. 人工湖底泥与水体真菌培养基的筛选[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2008, 29(5): 510-515.
YANG Y H, XU Z N, LIN X T, et al. Culture screening for waters and sediment fungi growing in artificial lake[J]. J Jinan Univ Nat Sci Ed, 2008, 29(5): 510-515. (in Chinese)
- [16] RATHNAPRIYA, USHAKRISHNAN, JANAKI, et al. Isolation of *Malassezia yeast* using Modified Dixon's Agar from Pityriasis versicolor lesions[J]. Indian Journal of Basic and Applied Medical Research, 2016, 5(3): 123-129.
- [17] SUZUKI K, INOUE M, TAKAYAMA K, et al. Development of artificial-sebum-containing leeming and notman agar medium to enhance the growth of *Malassezia*[J]. Mycopathologia, 2022, 187(4): 393-396.
- [18] 付雷雯, 乐婷婷, 王玲, 等. 耳念珠菌不同条件下生长特性及体内毒性[J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(7): 1049-1055.
FU L W, LE T T, WANG L, et al. Study on growth characteristics of *Candida auris* under different conditions *in vitro* and its *in vivo* toxicity[J]. J South Med Univ, 2020, 40(7): 1049-1055. (in Chinese)
- [19] OSEI S J. *Candida auris*: a systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen[J]. MicrobiologyOpen, 2018, 7(4): e00578.
- [20] 程向方, 王雷. 阴道念珠菌4种常用检验方法的比较及应用[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(8): 1390-1391.
CHENG X F, WANG L. Comparison and application of four commonly used detection methods for vaginal candidiasis[J]. Chin J Lab Diagn, 2011, 15(8): 1390-1391. (in Chinese)
- [21] KATO S, YAMAGISHI A, DAIMON S, et al. Isolation of previously uncultured slow-growing bacteria by using a simple modification in the preparation of agar media[J]. Appl Environ Microbiol, 2018, 84(19): e00807-e00818.
- [22] HAMAD I, RANQUE S, AZHAR E I, et al. Culturomics and amplicon-based metagenomic approaches for the study of fungal population in human gut microbiota[J]. Sci Rep, 2017, 7: 16788.
- [23] HALLEN-ADAMS H E, SUHR M J. Fungi in the healthy human gastrointestinal tract[J]. Virulence, 2017, 8(3): 352-358.
- [24] BRADFORD L L, RAVEL J. The vaginal mycobiome: a contemporary perspective on fungi in women's health and diseases[J]. Virulence, 2017, 8(3): 342-351.

收稿日期:2023-05-22 编辑:王佳燕