




临床微生物学 检验技术

徐 莉 ◎ 著

天津出版传媒集团

 天津科学技术出版社

临床微生物学检验技术

徐 莉 ○著

天津出版传媒集团



天津科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

临床微生物学检验技术 / 徐莉著. -- 天津 : 天津科学技术出版社, 2018.1

ISBN 978-7-5576-4632-5

I. ①临… II. ①徐… III. ①微生物学-医学检验
IV. ①R446.5

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第039100号

责任编辑: 孟祥刚

责任印制: 王莹

天津出版传媒集团

出版

 天津科学技术出版社

出版人: 蔡颢

天津市西康路35号 邮编 300051

电话 (022) 23332397

网址: www.tjkjchs.com.cn

新华书店经销

北京虎彩文化传播有限公司印刷

开本 787 × 1092 1/16 印张 23.75 字数 570 000

2018年1月第1版第1次印刷 2018年9月第2次印刷

定价: 118.00元

前 言

随着医学领域新进展不断,检验科学进步也是日新月异,新的诊断、治疗技术层出不穷。微生物的检验,无论在理论研究还是在生产实践中都具有重要的意义,在提高医药微生物学检验技术方面的同时,同样也要提高检验人员的检验技能。

本书共分三十章,包括细菌检验、真菌检验、病毒检验、细菌耐药性检测、病原性球菌检验、肠杆菌科检验等内容。在编写中,我们力求科学、实用、准确,文字简练,指导性强,相信本书会成为临床微生物实验室检验人员和临床医师实用的工具书和参考书。

医学的发展日新月异,由于作者水平有限及编写时间仓促,书中错误或不当之处在所难免,敬请广大读者批评和指正。在此,特向关心和支持本书出版的专家和同仁致以诚挚的感谢!

编 者

目 录

第一章 细菌检验基本技术	(1)
第一节 细菌形态学检查法	(1)
第二节 细菌的培养与分离技术	(4)
第三节 细菌的生物化学鉴定技术	(12)
第四节 细菌非培养检验技术	(19)
第五节 细菌检验的自动化	(23)
第二章 真菌检验基本技术	(27)
第一节 真菌的形态学检查	(27)
第二节 真菌的培养与鉴定技术	(29)
第三节 其他非培养检验技术	(35)
第三章 病毒检验基本技术	(36)
第一节 病毒的形态学检查	(36)
第二节 病毒的培养与鉴定技术	(38)
第三节 病毒的非培养检验技术	(41)
第四章 细菌耐药性检测	(46)
第一节 临床常用抗菌药物	(46)
第二节 抗菌药物敏感试验	(49)
第三节 细菌耐药机制	(54)
第四节 细菌耐药检测	(56)
第五章 医院内感染	(61)
第一节 医院内感染定义和分类	(61)
第二节 医院内感染控制	(62)
第六章 质量保证	(67)
第一节 检验前质量保证	(67)
第二节 检验中质量保证	(69)
第三节 检验后质量保证	(76)
第七章 实验室安全防护及菌种保存技术	(77)
第一节 实验室安全防护	(77)
第二节 菌种保存技术及管理	(83)

第八章 病原性球菌检验	(86)
第一节 葡萄球菌属	(86)
第二节 链球菌属	(90)
第三节 肠球菌属	(97)
第四节 奈瑟菌属和卡他莫拉菌	(99)
第九章 肠杆菌科检验	(104)
第一节 概述	(104)
第二节 埃希菌属	(108)
第三节 克雷伯菌属	(111)
第四节 志贺菌属	(114)
第五节 沙门菌属	(116)
第六节 耶尔森菌属	(120)
第七节 变形杆菌属、普罗威登斯菌属及摩根菌属	(124)
第八节 肠杆菌科的其他菌属	(126)
第十章 弧菌属检验、气单胞菌属检验	(130)
第一节 弧菌属	(130)
第二节 气单胞菌属	(138)
第十一章 弯曲菌属检验、螺杆菌属检验	(140)
第一节 弯曲菌属	(140)
第二节 螺杆菌属	(142)
第十二章 非发酵菌检验	(147)
第一节 概述	(147)
第二节 假单胞菌属	(148)
第三节 窄食单胞菌属	(152)
第四节 不动杆菌属	(154)
第五节 伯克霍尔德菌属	(156)
第六节 产碱杆菌属和无色杆菌属	(158)
第七节 莫拉菌属	(160)
第八节 伊丽莎白菌属 and 金黄杆菌属	(161)
第十三章 其他革兰氏阴性杆菌检验	(164)
第一节 嗜血杆菌属	(164)
第二节 鲍特菌属	(168)
第三节 军团菌属	(171)
第四节 布鲁菌属	(174)

第十四章	需氧革兰氏阳性杆菌检验	(178)
第一节	棒状杆菌属	(178)
第二节	炭疽芽孢杆菌	(182)
第三节	蜡样芽孢杆菌	(187)
第四节	产单核细胞李斯特菌	(190)
第五节	红斑丹毒丝菌	(192)
第六节	阴道加特纳菌	(194)
第十五章	分枝杆菌属检验	(197)
第一节	结核分枝杆菌复合群	(197)
第二节	非结核分枝杆菌	(205)
第三节	麻风分枝杆菌	(208)
第十六章	放线菌检验	(210)
第一节	放线菌属	(210)
第二节	诺卡菌属	(212)
第十七章	厌氧性细菌检验	(215)
第一节	概述	(215)
第二节	梭状芽孢杆菌	(220)
第三节	革兰氏阴性无芽孢厌氧杆菌	(225)
第四节	革兰氏阳性无芽孢厌氧杆菌	(229)
第五节	厌氧性球菌	(232)
第十八章	衣原性检验	(236)
第一节	概述	(236)
第二节	沙眼衣原体	(236)
第三节	肺炎嗜衣原体	(240)
第四节	鹦鹉热嗜衣原体	(242)
第十九章	立克次体检验	(244)
第一节	概述	(244)
第二节	立克次体属	(245)
第三节	东方体属	(249)
第四节	其他立克次体	(251)
第二十章	支原性检验	(253)
第一节	概述	(253)
第二节	肺炎支原体	(254)
第三节	解脲脲原体	(258)
第四节	其他支原体	(260)

第二十一章 螺旋体检验	(263)
第一节 密螺旋体属	(263)
第二节 疏螺旋体属	(267)
第三节 钩端螺旋体属	(269)
第二十二章 真菌学概论	(273)
第一节 分类与命名	(273)
第二节 生物学特性	(274)
第二十三章 常见感染性真菌检验	(278)
第一节 皮肤黏膜感染真菌	(278)
第二节 侵袭性感染真菌	(283)
第二十四章 病毒学概论	(298)
第一节 分类	(298)
第二节 基本特性	(300)
第二十五章 呼吸道病毒检验	(304)
第一节 正黏病毒科	(304)
第二节 副黏病毒科	(308)
第三节 其他呼吸道病毒	(312)
第二十六章 肠道病毒检验	(314)
第一节 概述	(314)
第二节 人类肠道病毒	(314)
第三节 轮状病毒	(321)
第四节 其他急性胃肠炎病毒	(324)
第二十七章 肝炎病毒及检验	(327)
第一节 甲型肝炎病毒	(327)
第二节 乙型肝炎病毒	(331)
第三节 丙型肝炎病毒	(335)
第四节 丁型肝炎病毒	(338)
第五节 戊型肝炎病毒	(340)
第二十八章 反转录病毒	(342)
第一节 人免疫缺陷病毒	(342)
第二节 人类嗜 T 细胞病毒 I 型、II 型	(348)
第二十九章 疱疹病毒	(350)
第一节 单纯疱疹病毒	(350)
第二节 水痘一带状疱疹病毒	(352)
第三节 人巨细胞病毒	(354)

第四节	EB 病毒.....	(357)
第五节	人疱疹病毒 6、7、8 型	(360)
第三十章	其他病毒检验	(364)
第一节	流行性乙型脑炎病毒	(364)
第二节	森林脑炎病毒	(365)
第三节	登革病毒	(366)
第四节	出血热病毒	(367)
第五节	狂犬病病毒	(371)
第六节	人乳头瘤病毒	(373)

第一章 细菌检验基本技术

细菌检验是利用细菌学基本知识和技术,结合临床实际,对患者标本进行检验。包括对感染病原菌的分离培养、病原菌代谢产物的检测及机体感染后免疫应答产物的检测等。临床细菌学检验不仅可以为感染性疾病提供快速、准确的病原学诊断、指导临床合理应用抗菌药物,而且可以监控医院内感染,进一步研究感染性疾病的病原体特征,不断提高诊断水平。

第一节 细菌形态学检查法

细菌形态学检查是细菌检验的重要方法之一,不仅可以为后续的进一步检验提供参考依据,更重要的是可以通过细菌形态学检查迅速了解标本中有无细菌及菌量的大致情况;对少数具有典型形态特征的细菌可以做出初步诊断,为临床选用抗菌药物治疗起到重要的提示作用。临床标本的细菌形态学检查方法主要包括染色标本和不染色标本的检查。

一、显微镜

细菌体积微小,必须借助显微镜放大后才能观察。细菌的一般形态结构可用光学显微镜观察,而细菌内部的超微结构则需用电子显微镜观察。

1. 普通光学显微镜

普通光学显微镜(light microscope)以可见光作为光源,波长 $0.4\sim 0.7\mu\text{m}$,最大分辨率 $0.2\mu\text{m}$,约为波长的一半。人肉眼能分辨的最小距离是 0.2mm ,因此用油镜放大1000倍, $0.2\mu\text{m}$ 的微粒即被放大到肉眼可见的 0.2mm 。一般细菌都大于 $0.2\mu\text{m}$,故可用普通光学显微镜进行观察。

2. 暗视野显微镜

暗视野显微镜(dark field microscope)是在普通光学显微镜上装暗视野聚光器,使照明光线不直接进入物镜,只允许被标本反射和衍射的光线进入物镜,背景视野变暗,菌体发亮。观察时黑暗的背景中可见到发亮的菌体,明暗反差提高了观察效果,常用于不染色标本的动力及运动状况检查。

3. 荧光显微镜

荧光显微镜(fluorescence microscope)以高压汞灯作为光源,能发出 $280\sim 600\text{nm}$ 波长的光线,主要在 $365\sim 435\text{nm}$ 之间。根据使用荧光素的不同选择不同波长的光线作为激发光。因其波长比可见光短,故分辨率高于普通光学显微镜。细菌预先经相应的荧光素处理,然后置荧光显微镜下激发荧光,在暗色背景中可见到发荧光的菌体。用于观察细菌的结构及鉴别

细菌。

4. 相差显微镜

相差显微镜(phase contrast microscope)是利用相差板的光栅作用,在普通光学显微镜基础上配制特殊相差板,采用特殊相差目镜制成。当光线透过标本时,标本不同部位因密度不同,引起光位相差,相差板的光栅作用改变直射光的光位相和振幅,把光位相差异转为光强度差异,从而显示细菌不同部位的差异。多用于不染色活细菌的形态、内部结构及运动方式的观察。

5. 电子显微镜

电子显微镜(electron microscope)以电子流代替光源,其波长与可见光相差几万倍,因而分辨能力得到极大提高,能分辨 1nm 的微粒。目前使用的电子显微镜有透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)和扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)两类。TEM 可用于观察细菌、病毒的超微结构;SEM 主要适合对细菌、病毒等表面结构及附件和三维立体图像的观察。电子显微镜观察须经特殊制片,无法观察活体微生物,因而在微生物学检验中不常使用。

二、不染色标本的检查

不染色标本一般用于观察细菌的动力及运动情况,但不能清楚地看到细菌的形态及结构特征。有动力的细菌在镜下呈活泼有方向性的运动,有明显位移;无动力的细菌则在原位颤动,呈不规则的布朗运动。常用的方法有压滴法和悬滴法,以普通光学显微镜观察,如用暗视野显微镜,效果更好。

在临床上,有时通过不染色标本的动力检查可对某些病原菌做出初步鉴定。如疑似霍乱患者,可取其米泔水样便,制成压滴或悬滴标本,高倍镜或暗视野下观察细菌动力,若见穿梭样运动的细菌,则同法再制备一标本片并加入 O1 群霍乱弧菌抗血清,若细菌的活跃运动现象消失,称之为制动试验阳性,可初步推断为“疑似 O1 群霍乱弧菌”。另外,螺旋体由于不易着色并有特征性的形态特点,亦可用不染色标本作暗视野显微镜观察。

三、染色标本的检查

细菌标本经染色后,不仅能清晰地看到细菌的形态、大小及排列方式,还可根据染色结果将细菌进行分类。染色标本与周围环境在颜色上形成鲜明对比,可在普通光学显微镜下进行观察。一般形态学检查均需染色。

(一) 常用染料

用于细菌染色的染料,大部分是人工合成的含苯环的有机化合物,在其苯环上带有色基和助色基。色基赋予化合物颜色,助色基可增加色基与被染物的亲和力。助色基有的为碱性(如-NH₂),有的为酸性(如-OH),因此助色基的性质决定染料的酸碱性。常用染料一般均难溶于水,易溶于有机溶剂,实验室配制时通常制成盐类水溶液。

1. 碱性染料

常用的碱性染料有碱性亚甲蓝、结晶紫及碱性复红等,这些染料电离后色基带正电荷,易

与带负电荷的被染物结合。多数细菌等电点(pI)在2~5之间,在中性、碱性以及弱酸性环境中都带负电荷,易被碱性染料着色,故细菌学检查中常用此类染料。

2. 酸性染料

常用的有伊红、酸性复红及刚果红等,这些染料电离后色基带负电荷,不易与细菌结合,不常用于细菌染色。必要时可降低菌液的pH,使细菌带正电荷,方可着色。

3. 中性染料

是碱性染料与酸性染料的复合物,如瑞氏染液中的伊红亚甲蓝、吉姆萨染液中的伊红天青等,可用于较特殊染色技术。

(二) 常用的细菌染色法

根据所用染料是一种还是多种,细菌染色法分为单染色法和复染色法。单染色法是用一种染料染色,细菌涂片染成同一颜色,可观察到形态、大小及排列等特点,但不能显示细菌染色特性。复染色法是用两种或两种以上染料进行染色,将不同细菌或同一细菌的不同结构染成不同颜色。复染色法不仅可以观察细菌的形态结构,还可根据染色反应鉴别细菌,故又称鉴别染色法。临床常用的主要有革兰氏染色和抗酸染色。

1. 革兰氏染色(Gram staining)

本法是细菌学检验中最经典、最常用的染色方法,沿用至今已有百余年历史,是一种包括初染、媒染、脱色和复染的鉴别染色技术。通过此染色法,可将细菌分为革兰氏阳性(G^+)菌和革兰氏阴性(G^-)菌两大类,并可初步识别细菌,缩小范围,有助于进一步鉴定。有时结合细菌特殊形态结构及排列方式,对病原菌可做出初步鉴定。

革兰氏染色的原理至今尚未完全清楚,有以下几种学说:①细胞壁学说: G^+ 菌细胞壁结构较致密,肽聚糖层厚,脂质含量少,乙醇不易透入, G^- 菌细胞壁结构较疏松,肽聚糖层少,脂质含量多,乙醇易渗入;②等电点学说: G^+ 菌的等电点低(pI 2~3), G^- 菌等电点较高(pI 4~5),在相同pH条件下, G^+ 菌所带负电荷比 G^- 菌多,与带正电荷的结晶紫染料结合较牢固且不易脱色;③化学学说: G^+ 菌细胞内含有大量核糖核酸镁盐,可与结晶紫和碘牢固地结合成大分子复合物,不易被乙醇脱色, G^- 菌细胞内含极少量的核糖核酸镁盐,吸附染料量少,形成的复合物分子也较小,故易被乙醇脱色。目前认为,细胞壁结构与化学组成上的差异是染色反应不同的主要原因。

革兰氏染色可用于菌落涂片和标本涂片。菌落涂片不仅可观察细菌的形态染色特点,更重要的是可以为后续选择合适的鉴定程序提供参考依据。另外,由于 G^+ 菌和 G^- 菌细胞壁结构存在很大差异,对一些抗生素表现出不同的敏感性,且二者产生的致病物质及作用机制不同,因此革兰氏染色尚可为临床选择用药提供参考,帮助临床制定有针对性的治疗方案。在临床上除少数标本(如粪便、血液)外,绝大多数标本在分离培养前都要进行革兰氏染色。

2. 抗酸染色(acid-fast staining)

抗酸染色是细菌着色后不被盐酸乙醇脱色的染色方法,其中最具代表性的是萁-尼(Ziehl-Neelsen)染色法。经此法染色可将细菌分为抗酸性细菌和非抗酸性细菌两大类。由于临床上

绝大多数细菌为非抗酸性细菌,所以抗酸染色不作为临床上常规的细菌检查项目,只针对性用于结核病、麻风病等疾病的细菌检查。疑似结核分枝杆菌感染的标本,经抗酸染色后在油镜下观察,根据所见结果报告“找到(或未找到)抗酸菌”,可做出初步鉴定。另外,若改变脱色剂,诺卡菌属亦可呈弱抗酸性。目前认为,抗酸染色性的差异可能与菌体中所含的分枝菌酸、脂类等成分有关。

3. 荧光染色 (fluorescence staining)

荧光染色是用能够发荧光的物质对标本进行染色,在荧光显微镜下观察发荧光的细菌。此法具有敏感性高、效率高、结果易于观察等特点,故在临床细菌鉴定中有很大的应用价值。目前主要用于结核分枝杆菌、麻风分枝杆菌、白喉棒状杆菌及痢疾志贺菌等病原菌的检测。如痰标本涂片、固定后用荧光染料金胺 O 法(也称金胺 O-罗丹明 B 法)染色,在荧光显微镜下可观察到呈金黄色荧光的菌体。

4. 负染色

是一种使标本的背景着色而细菌不着色的染色方法。常用染液有墨汁,也可用酸性染料如刚果红、水溶性苯胺黑等,因酸性染料带负电荷,故菌体不着色,只能使背景着色。实际工作中还可用墨汁负染色法配合单染色法(如吕氏亚甲蓝)检查细菌的荚膜,镜下可见黑色背景中蓝色菌体周围包绕一层无色透明的荚膜。

5. 特殊染色

细菌的特殊结构如芽孢、鞭毛及荚膜等和其他结构如细胞壁、核质及胞质颗粒等,用普通染色法均不易着色,必须用相应的特殊染色才能染上颜色。常用的特殊染色法有细胞壁染色、荚膜染色、芽孢染色、鞭毛染色及异染颗粒染色等。鞭毛染色后在显微镜下不仅可以观察到有无鞭毛,还可进一步观察到鞭毛的位置以及数量,在细菌鉴定,尤其是非发酵菌的鉴定中具有重要价值。荚膜染色用于有荚膜细菌的鉴定,如肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、炭疽芽孢杆菌及产气荚膜梭菌等的鉴定。异染颗粒主要用于白喉棒状杆菌的鉴定,如疑为白喉棒状杆菌感染,进行涂片检查,除证实为革兰氏阳性典型棒状杆菌外,尚需用异染颗粒染色检查有无异染颗粒,若有方可初步报告“检出形似白喉棒状杆菌”,为临床早期诊断提供依据。

第二节 细菌的培养与分离技术

细菌的培养系用人工方法,提供细菌生长繁殖所需的营养和最适生长条件,如温度、湿度及气体环境等,使细菌迅速生长繁殖。细菌的分离技术是指将临床标本或其他培养物中存在的多种细菌通过一定方式使之分开,形成由一个细菌繁殖而来的肉眼可见的细菌集落,即菌落(colony),供鉴定、研究细菌用。细菌培养与分离技术的目的在于鉴定细菌的种类和保存菌种,为进一步确定细菌的致病性、药物敏感性提供依据。

一、培养基

培养基(culture medium)是用人工方法配制而成,适合微生物生长繁殖需要的混合营养基质。适宜的培养基不仅用于细菌的分离、纯化、传代及菌种保存等,还可用于研究细菌的生理、生化特性。因此,掌握培养基的制备技术及其原理,是进行细菌学检验的重要环节和必不可少的手段。

(一)培养基的主要成分及其作用

细菌的生长繁殖除需要一定的营养物质,如含氮化合物、糖类、盐类、类脂质及水外,有的还需加入特殊营养物质,如维生素的辅助生长因子或某些其他特殊因子;有的则需加入指示剂或抑制剂,以利于细菌的分离和鉴定。

1. 营养物质

营养物质提供细菌生长繁殖所需的能量、合成菌体的原料以及激活细菌酶的活性和调节渗透压等作用。细菌需要的营养物质主要有氮源、碳源、无机盐及生长因子。

(1)蛋白胨:是由动物或植物蛋白质经酶或酸碱分解而产生的中间产物,是培养基中最常用的成分之一,主要供给细菌氮源,合成菌体蛋白质、酶类等,另外还具有缓冲作用。由于蛋白质的来源和消化程度不同,因而制得的蛋白胨质量相差很大。按照生产原料的性质,蛋白胨可分为植物胨和动物胨两类。蛋白胨经喷雾干燥成粉末,吸水性较强,保存时应干燥密封,防止潮解结块。

(2)肉浸液:系用新鲜牛肉(去掉脂肪、肌膜及肌腱等)浸泡煮沸制成的肉汤。肉浸液中包括含氮和非含氮两类浸出物,还有一些生长因子。作为细菌生长所需要的氮源和碳源,由于加热后大部分蛋白质凝固,仅留少部分氨基酸和其他含氮物质,不能满足细菌生长需要,故在制作培养基时,一般需加1%~2%蛋白胨和0.5%的NaCl。

(3)牛肉膏:又称牛肉浸膏,是肉浸液加热浓缩而得到的一种棕黄色至棕褐色的膏状物。其中不耐热的物质如糖类已被破坏,故其营养价值不及肉浸液,但因无糖,可作为肠道细菌鉴别培养基的基础成分。

(4)糖(醇)类:含有细菌所需的碳源。制备培养基所应用的糖(醇)类很多,常用的糖类有单糖(如葡萄糖、阿拉伯糖等)、双糖(如乳糖、蔗糖等)、多糖(如菊糖、淀粉等);醇类有甘露醇、卫矛醇及侧金盏花醇等。在培养基中加入糖(醇)类物质,除提供细菌作为碳源和能源外,主要利用细菌对糖(醇)类利用能力的差异鉴别细菌。

(5)血液:血液除能增加培养基中蛋白质、多种氨基酸、糖类及无机盐等营养成分外,尚能提供辅酶、血红素等特殊生长因子。此外,还可以观察细菌的溶血现象。

(6)鸡蛋与动物血清:此二者虽非基本成分,但对某些营养要求高的细菌则是必需成分,如培养结核分枝杆菌的鸡蛋培养基和培养白喉棒状杆菌的吕氏血清斜面等。

(7)无机盐:细菌生长繁殖需要多种无机盐类,其需要浓度在 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ mol/L的元素为常用元素,其需要浓度在 $10^{-6} \sim 10^{-8}$ mol/L的元素为微量元素。前者如磷、硫、钾、钠、镁、钙及铁等;后者如钴、锌、锰及铜等。

(8)生长因子:是一些细菌生长所必需而自身不能合成的物质。通常为有机化合物,包括B族维生素、某些氨基酸、嘌呤及嘧啶等。少数细菌还需要特殊的生长因子,如流感嗜血杆菌需要X因子和V因子。这些生长因子常存在于动物血清、酵母浸液、肝浸液及鸡蛋等中。因此,在培养营养要求高的细菌时,常加入上述物质,以满足其生长需要。

2. 水

水是良好的溶剂,细菌所需要的营养物质必须先溶于水,营养的吸收与代谢均需有水才能进行。制备培养基常用不含杂质的蒸馏水或离子交换水。

3. 凝固物质

即赋形剂。制备固体培养基时,必须加入凝固物质,如琼脂、明胶、卵白蛋白及血清等。理想的凝固物质应具有以下特性:①本身不被细菌利用;②在微生物生长温度范围内保持固体状态,凝固点的温度对微生物无害;③不因消毒灭菌而破坏,透明度好,黏着力强。目前认为最合适的凝固物质是琼脂。

(1)琼脂(agar):是从石花菜、紫菜及江蓠类海生植物中提取的一种胶体物质,其化学成分主要为胶体多糖类。具有在100℃溶解,45℃以下时凝固的特性。琼脂本身无营养价值,仅作为培养基的赋形剂。

(2)明胶(gelatin):是由动物胶原组织(如皮、肌腱等)经煮沸熬制而成,主要含蛋白质。由于此类蛋白质缺乏必需氨基酸,故营养价值不大。明胶制成的培养基在24℃以上溶解,20℃以下凝固,故不宜在35~37℃环境中培养。因有些细菌可分解明胶使其液化,所以一般不用明胶作赋形剂,但可用于制备鉴别培养基,观察细菌对明胶有无液化作用。

4. 抑制剂

是一类能抑制或减少非检出菌生长而有利于检出菌生长的物质。抑制剂种类很多,如胆盐、煌绿、玫瑰红酸、亚硫酸钠、某些染料及多种抗生素等。不同培养基应根据需要选择合适的抑制剂。

5. 指示剂

为了观察和鉴别细菌是否分解利用糖类、氨基酸等物质,常在某些培养基中加入一定种类的指示剂。常用的酸碱指示剂有酚红、溴甲酚紫、溴麝香草酚蓝、中性红及甲基红等。在进行厌氧菌培养时,还需在培养环境中加入氧化还原指示剂,常用的有亚甲蓝和刃天青。

(二)培养基的分类

培养基的种类很多,一般按其用途及物理性状进行分类。

1. 按用途分类

分为基础培养基、营养培养基、选择培养基、鉴别培养基和特殊培养基。

(1)基础培养基(basic medium):含有细菌生长所需基本营养成分的培养基,常用的有肉浸液(俗称肉汤)、普通琼脂平板等。广泛用于细菌的检验,也是配制其他培养基的基础成分。

(2)营养培养基(nutrient medium):在基础培养基中加入血液、血清及生长因子等一些特殊成分,供营养要求较高和需要特殊生长因子的细菌生长繁殖的培养基,最常用的是血琼脂平

板(blood agar plate, BAP)和巧克力色琼脂平板。

(3)选择培养基(selective medium):在培养基中加入某些种类的抑制剂,抑制标本中非目的菌生长,选择性地促进目的菌生长的培养基。如 SS(Salmonella-Shigella)琼脂平板中的胆盐能抑制革兰氏阳性菌,枸橼酸钠和煌绿能抑制大肠埃希菌,从而有利于沙门菌和志贺菌的分离。选择培养基多为固体平板培养基。

(4)鉴别培养基(differential medium):利用细菌分解糖类和蛋白质的能力不同及代谢产物的差异,在培养基中加入特定作用底物和指示剂,观察细菌生长过程中分解底物所释放的不同产物,通过指示剂的反应不同来鉴别细菌。例如糖发酵管、克氏双糖铁琼脂(KIA)等。也有一些培养基将选择和鉴别功能结合在一起,在选择的同时起一定的鉴别作用,如 SS 琼脂平板、伊红亚甲蓝(eosin-methylene-blue, EMB)琼脂平板、麦康凯(MacConkey, MAC)琼脂平板等。

(5)特殊培养基(special medium):包括厌氧培养基、细菌 L 型培养基等。前者是培养专性厌氧菌的培养基,除含有合适的营养成分外,还加入还原剂以降低培养基的氧化还原电势,如庖肉培养基、硫乙醇酸盐培养基等,并在液体培养基表面加入凡士林或液状石蜡以隔绝空气。后者是针对细胞壁缺损的细菌 L 型,由于胞内渗透压较高,故必须采用高渗琼脂培养基。

2.按物理性状分类

可分为液体、固体和半固体培养基三种,其区分主要取决于培养基有无凝固剂及凝固剂的多少。

(1)液体培养基(liquid medium):各营养成分按一定比例配制而成的水溶液或液体状态的培养基,肉汤是最常用的液体培养基。此类培养基常用于增菌培养,也可用于接种纯种细菌观察细菌生长现象。

(2)半固体培养基(semi-solid medium):在液体培养基中加入 0.3%~0.5%琼脂即为半固体培养基。多用于观察细菌的动力、保存菌种等,可根据细菌的营养要求加入特殊营养成分。

(3)固体培养基(solid medium):在液体培养基中加入 1.5%~2.0%琼脂则为固体培养基。如制成平板,多用于微生物的分离纯化、鉴定及药敏试验等;也可制成斜面或高层用于鉴定及菌种的短期保存。

此外,还可根据培养基的组成成分是否明确,将其分为合成培养基、天然培养基和半合成培养基。

(三)培养基的制备

不同培养基制备的过程不完全相同,但其制备程序基本相似,可分为调配、溶解、校正 pH、分装、灭菌、质量检验及保存等步骤。

1.调配

按培养基配方准确称取各成分的用量,混悬于装有定量蒸馏水的锥形瓶中,振摇混合。有些成分,如指示剂、抑制剂等应在校正 pH 后方可加入。

2. 溶解

将调配好的混合物加热使其完全溶解。如有琼脂成分,应注意防止外溢。溶解完毕,注意补足失去的水分。

3. 校正 pH

用 pH 比色计或精密 pH 试纸进行校正,一般将 pH 调至 7.2~7.6,亦有酸性或碱性培养基。培养基经高压灭菌后其 pH 可发生 0.1~0.2 的变动。如用 NaOH 校正,高压灭菌后 pH 下降 0.1~0.2;若用 Na_2CO_3 校正,高压灭菌后 pH 升高 0.1~0.2。商品干燥培养基一般已校正 pH,用时无须再校。

4. 分装

根据需要将培养基分装至不同容量的锥形瓶、试管等容器中。分装量不宜超过容器的 2/3,以免灭菌时外溢。

(1) 液体培养基:分装量为试管长度的 1/4~1/3,灭菌后直立待用。

(2) 半固体培养基:分装量约为试管长度的 1/3,灭菌后直立凝固待用。

(3) 琼脂斜面:通常在溶解后分装于试管,加塞灭菌后趁热摆放成斜面,斜面长度约为试管长度的 2/3。

(4) 琼脂高层:分装量约为试管长度的 1/3,灭菌后直立凝固待用。

(5) 琼脂平板:培养基高压灭菌后冷却至 50~60℃时,以无菌操作倾注于灭菌平皿内,水平旋转平板,待琼脂凝固后将平板翻转,置 4℃ 冰箱保存备用。倾注培养基时,切勿将平皿盖全部打开,以免空气中的尘埃及细菌落入。新制成的平板表面有冷凝水,不利于细菌分离,故通常将平板置于 35℃ 温箱 30 分钟左右,待平板表面干燥后使用。

5. 灭菌

不同成分、性质的培养基可采用不同的方法灭菌。

(1) 高压蒸汽灭菌法:由耐热物质配制成的培养基(如普通琼脂)常用此法灭菌。通常在一个大气压下,当蒸汽压力达到 103.4kPa 时,温度可达 121.3℃,维持 15~20 分钟即可杀死细菌的繁殖体和芽孢;含糖培养基以 68.95kPa,10~15 分钟为宜,以免破坏糖类物质。

(2) 间歇蒸汽灭菌法:不耐高热的物质配制成的培养基,如糖类、明胶、血清、鸡蛋及牛乳等常用此法。将需灭菌物置于流动蒸汽灭菌器内,使温度达到 80~100℃,维持 15~30 分钟,杀死其繁殖体,但芽孢尚有残存。取出后置 35℃ 温箱过夜,使芽孢变成繁殖体,次日再蒸,如此连续三次,可达到灭菌目的。若有些物质不耐 100℃,可将温度降至 75~80℃,并适当延长加热时间,也可达到灭菌目的。

(3) 滤过除菌法:对高营养液态的不耐热培养基,如血清、细胞培养液等,可用滤过除菌。

(4) 血清凝固器灭菌法:含有血清、鸡蛋的培养基可用血清凝固器进行间歇灭菌。

6. 质量检验

每批培养基制成后须经检验方可使用。质量检验包括两方面内容:① 无菌试验:将灭菌后的培养基置 35℃ 温箱培养过夜,判定是否灭菌合格;② 效果检验:按不同的培养要求,接种相