

实用医学培养基手册

主 编 王钦升 周正明 高 屹

人民军医出版社

175-225

WRS

YX111/24

实用医学培养基手册

SHIYONG YIXUE PEIYANGJI SHOUC

主 编 王钦升 周正明 高 屹

主 审 李仲兴

人民军医出版社

北 京

(京)新登字 128 号

图书在版编目(CIP)数据

实用医学培养基手册/王钦升等主编;马红英等编著. 北京:人民军医出版社,1999.3

ISBN 7-80020-892-3

I. 实… II. ①王…②马… III. 培养基-手册 IV. R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(98)第 29207 号

人民军医出版社出版

(北京市复兴路 22 号甲 3 号)

(邮政编码:100842 电话:68222916)

人民军医出版社激光照排中心排版

北京天宇星印刷厂印刷

新华书店总店北京发行所发行

*

开本:787×1092mm 1/32·印张:11.625·字数:253 千字

1999 年 3 月第 1 版 1999 年 3 月(北京)第 1 次印刷

印数:0001~6000 定价:19.50 元

ISBN 7-80020-892-3/R · 821

〔科技新书目:482—234⑧〕

(购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换)

内 容 提 要

本书是作者多年从事商品培养基生产、鉴定经验的总结。分总论与各论两部分,总论概述了培养基的定义、分类、制备程序、主要原料的质量控制,及微生物的营养与生长等。各论详尽介绍了培养基的分类及各种培养基的用途、原理、配方、配制方法、质量控制及注意事项等。全书内容新全,文字精练,理论联系实际,具有较强的实用性。适合医学检验工作人员参阅。

责任编辑 靳纯桥

编著者名单

(以姓氏笔画为序)

马红英	解放军浙江省军区后勤部卫生防疫检验所
王钦升	解放军浙江省军区后勤部卫生防疫检验所
叶云凌	解放军浙江省军区后勤部卫生防疫检验所
李昌英	解放军浙江省军区后勤部卫生防疫检验所
周正明	解放军浙江省军区后勤部卫生防疫检验所
所洪渐	解放军浙江省军区后勤部卫生防疫检验所
侯晓娜	解放军沈阳军区总医院
高 屹	中华人民共和国卫生部临床检验中心
童贵忠	浙江省卫生防疫站

序

这本《实用医学培养基手册》是作者多年从事商品培养基的生产、鉴定所积累经验的总结,是多年来心血的结晶。该书收集了近年来国内外各种培养基,并进行了一定的精选,因而比较实用。

全书内容深入浅出,通俗易懂,总论部分介绍了细菌生理、生长繁殖规律,也记载了组成各种培养基的基本组份,如蛋白胨、糖、醇、无机盐、生长因子等,着重介绍了配制培养基所用各种主要原材料的质量控制,如胆盐、琼脂和浸出液等,使初学者有一个系统的概念。在各论中,详尽地介绍了培养基的分类,及每一种培养基的用途、原理、配方、配制方法、质控及注意事项等。

不仅如此,还介绍了一些国外著名培养基生产厂家,如美国 Difco 公司生产的一些商品培养基,供广大细菌检验工作人员选择使用。

相信本书的问世,将会促进我国微生物学,尤其是医学细菌学的发展。

李仲兴

1998 年 8 月

前 言

近年来,医学培养基尤其是干燥培养基的高速发展,迫切需要编写一本适合国内微生物学领域需要、适应时代要求的理论与实验技术相结合的医学培养基学专著,供专业工作者及广大读者在实际工作中应用、借鉴。

本书共十五章,简明扼要地介绍了医学培养基的历史沿革和制备方法,着重介绍了医学培养基使用中的注意事项和质量控制要点,同时收编了近几十年来飞速发展的干燥培养基学的有关理论,并对其配制使用的主要原材料进行了单独介绍。

本书内容丰富,编排合理,文字简练,可操作性强,集多位专家、教授的科研成果和教学经验编写而成,注重理论联系实际,是一本很有实用价值的专著。

编著者不遗余力,经过六年的构思和筹划,终于使这本《实用医学培养基手册》摆在了广大读者的面前。由于编著者才疏学浅,错谬和不妥之处在所难免,恳请有关专家和广大读者提出宝贵意见,以臻逐趋完善。

编 者

1998年8月1日

目 录

总 论

第一章 绪论	(1)
第一节 培养基学的定义	(1)
第二节 培养基的分类	(2)
第三节 培养基的灭菌	(8)
第四节 微生物的培养方法	(11)
第二章 微生物的营养与生长代谢	(12)
第一节 微生物的营养	(12)
第二节 微生物的生长	(18)
第三节 微生物的代谢	(23)
第三章 培养基的制备程序	(28)
第一节 玻璃器皿灭菌前的准备	(28)
第二节 培养基的主要成分及其作用	(29)
第三节 培养基的制备程序	(34)
第四节 培养基 pH 的测定	(37)
第五节 培养基制备过程中的注意事项	(47)
第四章 培养基主要原料的质量控制	(51)
第一节 蛋白胨	(51)
第二节 琼脂	(55)
第三节 胆盐	(58)
第四节 浸出液	(59)

各 论

第五章 基础培养基	(67)
第一节 液体基础培养基	(67)
第二节 固体基础培养基	(73)
第六章 运送、保存和增菌培养基	(79)

第一节	运送培养基	(79)
第二节	菌种保存培养基	(84)
第三节	增菌培养基	(87)
第七章	分离培养基	(123)
第一节	球菌分离培养基	(123)
第二节	革兰阳性杆菌分离培养基	(134)
第三节	革兰阴性杆菌分离培养基	(143)
第八章	生化试验培养基	(186)
第一节	糖发酵培养基	(186)
第二节	酶类测定培养基和试剂	(200)
第三节	碳源和氮源利用试验培养基	(222)
第四节	生化试验培养基	(234)
第九章	抗生素敏感试验培养基	(256)
第十章	L 型细菌培养基	(260)
第一节	L 型细菌增菌培养基	(260)
第二节	L 型细菌分离琼脂	(263)
第十一章	钩端螺旋体、支原体和衣原体培养基	(266)
第一节	钩端螺旋体培养基	(266)
第二节	支原体培养基	(269)
第三节	衣原体培养基	(274)
第十二章	水、化妆品和食品检验用培养基	(278)
第一节	水质检验用培养基	(278)
第二节	化妆品检验用培养基	(281)
第三节	食品卫生检验用培养基	(287)
第十三章	厌氧菌培养基	(291)
第一节	液体培养基	(291)
第二节	固体培养基	(296)
第十四章	真菌培养基	(300)
第十五章	干燥培养基	(310)
第一节	干燥培养基的制造	(310)

第二节	干燥培养基的质量控制	(314)
第三节	国内外干燥培养基	(327)
第四节	质控标准	(350)

总 论

第一章 绪 论

第一节 培养基学的定义

培养基(culture media),是指由人工方法配合而成的,专供微生物培养、分离、贮运、鉴别、研究和保存用的营养混合物制品。而研究培养基的配制、保存、培养、质量控制和商品制造等一系列问题的科学称之为培养基学。

一般基础培养基的配方中仅含酵母浸膏、肉浸膏、蛋白胨、氯化钠和琼脂等基本营养物质。但在细菌诊断工作中,常需利用选择性培养基和鉴别培养基,此类培养基配方中除了基本营养成分外,还需加入抑菌剂、指示剂、血液、糖等,使病原菌容易生长,并呈现各自的特点,同时抑制杂菌生长,以利于目的细菌的分离与鉴别。

在临床实际工作中,应该针对各类微生物的不同营养要求,以及各项工作目的,选用各自最适用的培养基,才能达到预期的效果。所以培养基质量的好坏和选用是否适当,对试验结果有直接的影响。测定细菌的一种特性可能有几种方法,必须注意的是,测定方法的不同,其敏感性也不一样,所得结果也有差异,如测定细菌可否产生 H_2S ,以醋酸铅试纸法最敏感,此法阳性的菌株,三糖铁上不一定阳性。尿酸动(UIM)培养基含有少量葡萄糖,使靛基质的敏感性降低。另一方面,测定同一特性,但对象不同,培养基也不同。如测定糖的分解能力,肠杆菌科用 Ewing 推荐的方法,非发酵细菌用 Hugh-Leifson 的方法,葡萄球菌用 Game 的方法,念珠菌用含糖 2% 培养基,弧菌科用含 1%NaCl 的培养基,如果配方不对,将导致结果的错误。

第二节 培养基的分类

微生物培养基的种类很多,据不完全统计,常用的有千种以上。而且,随着生物科学的飞速发展,培养基的种类亦将不断增加。对于日益增加的诸多培养基如何分类?至今尚无统一之方法。一般常按培养基的形态、成分和用途进行分类。

一、按成分分类

根据培养基的组成成分,又可分为天然培养基和合成培养基两大类。

1. 天然培养基 天然培养基含有化学成分不完全明了的天然物质,如蛋白胨、牛肉膏、肉浸液、脑心浸液、肝消化汤、血液、血清、腹水等。用此类材料配成的培养基很难做到不同

批号之间质量一致。因此在选用原料时务必标明其商品的名称及批号。虽然天然培养基存在这些缺点,但其取材方便,成本低,细菌繁殖较好,所以一般使用的培养基,均以天然培养基为主。

2. 合成培养基 合成培养基是由已知化学成分的营养物质组成。由于微生物对营养要求的不同,它可以完全由无机盐或无机盐加有机化合物(氨基酸、糖、维生素等)组成。这种合成培养基的配方成分都是已知的,所以只要配制过程的操作严格要求,各批培养基的质量可做到稳定一致。这种培养基可用来研究某种营养物或药物对微生物代谢的影响。合成培养基的成本较高,其价格相当于同类天然培养基的几倍以至几十倍,因此,合成培养基一般只能在研究工作中使用。

二、按用途分类

根据不同用途,培养基又可分为基础培养基、增菌培养基、选择性培养基、鉴别培养基和厌氧菌培养基等。

1. 基础培养基(Basic media) 营养要求相同的微生物,所需要的营养物质除少数几种不同外,其他大部分营养物是共同的。因此就可以配成一种基础培养基,再按照某一微生物的特殊需要,添加某种营养物即可。如肉汤培养基和肉汤琼脂培养基均属此类。由于该类培养基中含有一般细菌生长繁殖所需要的最基本的营养物质,如牛肉膏、蛋白胨、NaCl、H₂O等,故此可供微生物生长繁殖之用。根据各种细菌生长繁殖的特殊要求,在此基础上再加入各种不同成分而制成选择性培养基、鉴别培养基和特殊培养基。

2. 增菌培养基(Enrichment media) 在自然环境下,微生物的营养基质,如蛋白胨、肉浸液、糖、NaCl等,均适合许多

微生物的生长。若了解到某种微生物的特殊营养要求,则可配制出适合于这种微生物而不适合其他微生物生长的培养基。近几年来国外一些新的增菌培养基,多采用抗生素为选择性抑制剂,如万古霉素、TMP、两性霉素等,这些抗生素均可提高培养基的选择与增菌效果。增菌培养基特别适用于病原菌含量少的标本。如食品标本、化妆品标本、血标本等增菌培养基。上述情况下,使用增菌培养基在标本中分离目的菌常可大大提高检出率,而获得较为满意的结果。

3. 选择性培养基(Selective media) 选择性培养基均含有增菌剂和选择剂。标本接种于这类培养基后,由于抑菌剂的选择性抑制作用,使所要分离的病原菌得到较好的繁殖,而其他菌被抑制。经过一定的培养时间后,再将目的菌接种到鉴别培养基上,可以提高病原菌的分离阳性率。抑菌剂的种类很多,如孔雀绿、煌绿、亚硒酸钠、去氧胆酸钠、胆盐、四硫磺酸钠、抗生素等,都是这类可选择使用的抑菌剂,但抑菌剂的加入量需准确,有的可以水溶液无菌配制冷藏备用,有的为极毒品如亚硒酸钠又不耐高热,配备时须小心。以上成分的用量,加入方法均按各类处方进行。

4. 鉴别培养基(Differential media) 鉴别培养基有一般鉴别培养基和选择性鉴别培养基之分,用于区别不同微生物种类的培养基称为一般鉴别培养基,此类培养基中一般不加抑菌剂而只含指示剂。如伊红—美蓝琼脂,在其配方中含有乳糖、伊红、美蓝,用以鉴别肠道病原菌及其他杂菌。其中伊红、美蓝作指示剂,伊红系酸性染料,当大肠杆菌或产气杆菌分解乳糖产酸时,由于细菌带正电荷,所以为伊红着色。因为伊红与美蓝结合,使菌落不呈红色,而是蓝紫黑色,且具有金属光泽。菌落呈棕色者为产气杆菌。不分解乳糖的肠道病原菌则

不着色,有时因产生碱性物质较多,细菌带负电荷,美蓝着色后,在平板上菌落并不呈蓝色,因美蓝与伊红结合,所以菌落为淡紫色。

在培养基中加入某种抑制剂和指示剂,以抑制某些细菌生长,而促进某种病原菌的繁殖,并使菌落具有一定特征,以助鉴别、分离。这类培养基称为选择性鉴别培养基。如亚硫酸铋琼脂(BS),在此培养基配方中含有葡萄糖、亚硫酸钠、柠檬酸铋铵和煌绿,它们既是抑菌剂,又是指示剂。煌绿、亚硫酸铋能抑制革兰阳性菌和大肠埃希菌的生长。两种抑菌剂对伤寒和副伤寒沙门菌均无影响,而且由于伤寒沙门菌能发酵葡萄糖,可将亚硫酸铋还原成硫酸铋,形成黑色菌落,其周围有黑色环,对光观察可见有金属光泽。以此达到鉴别的目的。

还有一些用于糖发酵和脱羧酶、脱氢酶试验的培养基,则是利用细菌特有的各种酶系统,能分解各种特定的糖、醇或氨基酸而产酸、产气或产碱。不同细菌对各种糖类和氨基酸的分解能力是不同的,所以可利用糖发酵、脱羧或脱氢作用进行各种细菌的鉴别。

用于细菌生化特性试验的培养基其特点是:在无糖基础培养基中加入某种特定的糖基质或某种特定的氨基酸,并以苯酚红、酸性复红、溴甲酚紫或 BTB 为指示剂。细菌在此类培养基中的一系列生化反应结果,均由指示剂的最终显色来判断。此类培养基属生化反应鉴别培养基。

需注意的是,因为糖类经高温灭菌后会发​​生不同程度的水解,因此应避免高压高温灭菌,可采用降低压力、温度或阿诺氏蒸汽灭菌,有条件的话,用除菌过滤方法灭菌;或将糖类单独灭菌后,再加入到蛋白胨水中。以免因糖类被水解而影响使用效果。

5. 厌氧菌培养基 (Anaerobic media) 专供厌氧菌的分离、培养和鉴别用的培养基,称为厌氧菌培养基。由于厌氧菌自身缺乏有氧代谢必备的各种酶,如细胞色素和细胞色素氧化酶、过氧化酶和过氧化物酶以及超氧化物歧化酶,所以造成自身代谢的缺陷,无法进行有氧代谢,而无氧酵解所产生的能量不足,所以厌氧菌在正常大气环境下既不能生长又不能生存。故其生长条件比较特殊。为使厌氧菌能正常生长,必须制备营养成分丰富,氧化还原电势较低,具有特殊生长因子的专用培养基。

因此,通常用心、脑或其他脏器浸液配制厌氧菌培养基,并加入硫乙醇酸钠、美蓝、刃天青、氨基酸、葡萄糖、肝块、肉渣、还原铁、脱脂棉或少活性炭等还原剂和除氧材料。有时还须加入维生素 K、氯化血红素,以促进产黑色素类杆菌和其他类杆菌的生长。在液体培养基中还可加入刃天青或美蓝作氧化还原指示剂以观察培养基的含氧程度。由于心、脑浸液和肝块、肉渣中含有不饱和脂肪酸,能吸收培养基中的氧。硫乙醇酸盐和半胱氨酸是较强的还原剂,也能消耗溶解在培养基中的氧。干燥的活性炭亦可吸收培养基中的氧。所以培养基中加入还原剂和吸氧材料的目的是为造成培养基的缺氧环境,使培养基保持较低的氧化还原电势,以保证厌氧菌生长的良好环境。也可在培养基表面加液体石蜡。

氧化还原指示剂在 pH7.0 时,美蓝可指示到 +11mV 的氧化还原电势,即在 +11mV 以上显蓝色, +11mV 以下为无色。刃天青可指示到 -43mV 的氧化还原电势,即在 -43mV 以上显红色, -43mV 以下为无色。由此可见,刃天青比美蓝敏感度高得多,所以厌氧菌培养基常用刃天青做氧化还原指示剂。

综上所述,不同营养成分的培养基适合不同类型的微生物生长,这是由于它们营养类型不同所致。但是,除营养要求之外,不同微生物对环境的要求亦不相同。例如:嗜高温和低温,耐高渗透压和不耐高渗透压,需氧和厌氧等。如要分离、培养厌氧菌时,除了采用适宜的厌氧菌培养基之外,还需要创造适宜的厌氧环境。

近几十年来,由于厌氧培养条件技术的不断改进,出现了许多新的培养方法和培养基。给厌氧菌的生长与繁殖创造了良好的条件,从而使过去难以分离到的许多厌氧菌,也能够从标本中分离出来,使人们对厌氧菌的认识迅速提高。

三、按形态分类

培养基根据其形态不同,可分为液体、流体、半固体和固体四种。其区分主要取决于培养基有无凝固剂,或凝固剂量的多少而定。

1. 液体培养基 常用的液体培养基是肉汤培养基,其配方成分为:在肉浸液中加入 1% 的蛋白胨和 0.5% 的氯化钠,最终 pH 为 7.4。一般微生物都能在此培养基中生长。液体培养基也常用于大量生产和增菌培养。如血液增菌培养基、碱性胨水培养基均为液体培养基。近年来,国内外均有一次性液体培养基出售,如血增菌培养基,L 型细菌增菌培养基等,使用较为方便。另外尚有双相培养瓶,倍受临床细菌学家欢迎。

2. 流体培养基 在液体培养基中加入 0.05%~0.07% 的琼脂粉,即成流体培养基。加入琼脂粉增加了培养基的粘度,降低空气中的氧气进入培养基的速度,能使培养基保持较长时间的厌氧条件,有利于一般厌氧菌的生长繁殖。如硫乙醇酸盐培养基、改良马丁培养基等,一般用于霉菌和厌氧菌检查