

厚膜孢子吐甘牛乳培养法

黄元桐 崔杰 高颖

(山西省中医研究所微生物室,太原 030012)

摘要 本文报告了一个可以培养厚膜孢子的吐甘牛乳培养基,及其临床应用效果。吐甘牛乳培养基以脱脂牛乳为基础加入1%吐温-80和2%甘油而组成。以薄层液体培养方法,经28℃培养48小时,可以培养出典型而丰富的厚膜孢子:从临床患者分离的20个血清芽管发生试验阳性的白色念珠菌菌株,经用本吐甘牛乳培养基进行40次厚膜孢子检查试验,结果全部阳性。说明用吐甘牛乳培养基培养厚膜孢子具有良好的可靠性和实用性。本方法与固体玉米琼脂培养法比较,有操作方便、结果明确的优点。

关键词 厚膜孢子;吐甘牛乳;薄层液体培养

厚膜孢子培养,在真菌的鉴别诊断上有一定的重要意义。在玉米琼脂上作厚膜孢子培养检查^[1],操作复杂,观察比较困难,有时得不到明确结果。我国最近出版的《全国临床检验操作规程》一书中,对此方法虽有所改进,但仍有诸多不便之处^[2]。近来我们实验研究了一个“厚膜孢子吐甘牛乳培养法”,结果明确,使用方便。现将吐甘牛乳培养基的配制方法和应用结果报告如下。

材料与方 法

(一) 材料

1. 小培养瓶: 平底圆型小瓶,底部直径20mm,高40mm;可采用抗生素小瓶,不必订做。
2. 装吐甘牛乳培养基的小试管: 必须采用10×100mm的中性硬质玻璃试管。
3. 试验菌种: 从本所附属医院门诊和病房分离到的白色念珠菌,共20株。

(二) 方法

1. 脱脂牛乳的制备: 取4℃保存新鲜牛乳一袋,分装于4个50ml离心瓶中,每瓶装入40ml左右,3000r/min离心沉淀10分钟。将注射器前端接一段15cm长的透明胶管,然后取出牛乳小瓶,缓缓倾斜,使飘浮在上面的奶油层

偏向一方,露出无脂牛乳液面,将透明胶管从此处伸入瓶底吸出无脂牛乳。吸取另一小瓶时需更换透明胶管,以免带入飘浮在表面的脂肪层。

2. 吐甘牛乳培养基的制备: 脱脂牛乳100ml,吐温-80 1.0ml,甘油2.0ml。放入80℃左右水浴中加温融化后分装于中试管,每管10ml左右,加棉塞,流动蒸汽0.7kg/cm²灭菌15分钟,换上无菌胶塞,4℃保存备用。

3. 厚膜孢子小瓶培养法: 将灭菌后的吐甘牛乳培养基分装于小培养瓶中,每瓶装0.7ml,接种供试菌,换用棉塞,置28℃恒温培养箱中培养48小时(至24小时摇动一次)。取2—3白金耳培养液置玻片上,加盖片,用高倍镜检查厚膜孢子的生长情况。

4. 厚膜孢子小试管培养法: 将灭菌后的吐甘牛乳培养基分装于10×100mm小试管中,每管装1.0ml,接种供试菌,换用棉塞,以斜面方式(约15°角)放入28℃恒温培养箱中培养48小时(至24小时摇动一次),镜检厚膜孢子同上法。

结果与讨论

(一) 牛乳浓度与厚膜孢子生长的关系

将新鲜脱脂牛乳作1/2、1/4、1/8、1/16稀

释,各取100ml,各加入甘油2.0ml,吐温-80 1.0ml,制成不同浓度牛乳的吐甘牛乳培养基,灭菌后分装于小培养瓶中,每小瓶0.7ml,接种白色念珠菌,置28℃培养2天,观察厚膜孢子的生长情况。结果见表1。

表1 牛乳稀释度与厚膜孢子的关系

试验菌株	吐甘牛乳培养基中牛乳稀释度				
	未稀释	1/2	1/4	1/8	1/16
白色念珠菌1号	++++	+++	+++	+	-
白色念珠菌2号	++++	++++	++++	+	-

注:“++++”厚膜孢子生长良好,“+++”厚膜孢子较少,“+”厚膜孢子少,不成熟,“-”未见厚膜孢子。

从表1结果可以看出,新鲜脱脂牛乳稀释4倍后仍可使厚膜孢子生长良好。但是为了确保厚膜孢子有充分的生长养料,我们在以后的试验中和实际应用中仍采用不稀释新鲜脱脂牛乳制成的吐甘牛乳培养基供厚膜孢子培养使用。

(二) 吐甘牛乳培养基容积与厚膜孢子生长的关系

1. 小瓶培养试验:将吐甘牛乳培养基以不同的装置分装于小培养瓶中,接种试验菌,静置28℃48小时观察厚膜孢子的生长情况。结果见表2。

表2 小培养瓶吐甘牛乳培养基装量与厚膜孢子生长的关系

试验菌株	吐甘牛乳培养基装量 (ml)						
	0.5	0.6	0.7	0.8	1.0	1.5	2.0
白色念珠菌1号	++++	++++	++++	++++	++++	+	+
白色念珠菌2号	++++	++++	++++	++++	++++	+	+

注释同表1。

从表2结果中可以看出,以小培养瓶为容器,培养液装量0.5—0.8ml的薄层培养中(培养液厚度<2—4mm)均可使厚膜孢子生长良好(图版1-1)。

我们还观察到在培养基装量1.5—2.0ml的培养瓶中,厚膜孢子明显生长不良,或只生长出少数极不成熟的孢子,难以确认,但菌丝却生长良好,清楚可见(图版1-2)。

2. 试管培养试验:取无菌试管(10×100mm)4支,每支装入吐甘牛乳培养基1ml,接种2个试验菌,每菌接种2支培养基,置28℃培养箱中,一支直立培养,另一支作斜面培养(斜面中部的培养液厚度2—3mm左右),培养48小时后观察厚膜孢子生长情况。结果见表3。

表3 试管斜面培养与直立培养对比试验

试验菌株	吐甘牛乳培养基(1ml)	
	斜面培养	直立培养
白色念珠菌1号	++++	-
白色念珠菌2号	++++	-

注释同表1。

试验结果,两株白色念珠菌在含有1ml培养液的试管斜面培养中均生长出典型、丰富的厚膜孢子(图版1-3),而在含有1ml培养液的直立试管培养中只生长出众多的菌丝而不见厚膜孢子生长(图版1-4)。

上述实验结果充分说明了真菌厚膜孢子的生长与充分供O₂有关系。只有采用薄层培养法,使空气中O₂能够大量溶入液体培养基,为真菌厚膜孢子的生长提供足够的需氧量,厚膜孢子才能充分发育成长。实际使用中,装量0.5—0.8ml的小瓶薄层培养法和装量1.0ml的试管斜面培养法均可采用。效果均好。

(三) 临床实用效果

从本所附属医院患者中分离的,血清芽管发生试验阳性的20株白色念珠菌,分别接种于装有0.7ml吐甘牛乳培养基的小培养瓶中,直立培养,和装有1ml吐甘牛乳培养基的试管中作斜面培养,置28℃恒温箱培养48小时后观察结果。全部结果表明,不论小瓶直立薄层培养或斜面试管培养,在吐甘牛乳培养液中都生长出典型丰富的厚膜孢子。说明了以吐甘牛乳培养基培养厚膜孢子具有良好的可靠性和实用性。

酵母型真菌大都系需氧菌,牛乳是一种营养丰富、微生物的天然培养基,但必需除去脂肪,以便空气中的O₂能够顺利地不断溶入牛乳培养基中;甘油和吐温-80均有促进厚膜孢子

生长的作用^[4]，因此吐甘牛乳培养基加上薄层液体培养技术就可以培养出发育良好的厚膜孢子。本方法与固体培养基比较，有操作方便，结果明确的优点。

参 考 文 献

1. Lennette E H et al.: Manual of clinical microbiology. 3rd ed. Washington D C: American Soc of microbiology,

- p. 568—569, 1980.
2. Washington J A: Laboratory procedures in clinical microbiology. New York: Springer-Verlag, p. 428—429, 1981.
3. Bauer J D et al.: Clinical laboratory methods. 8th ed. Saint Louis: C V Mosby Co, p. 756, 760, 1974.
4. Conant N F et al.: Manual of clinical mycology. 3rd ed. Philadelphia: W B Saunders Co, p. 704—705, 1971.
5. 叶应妩、王毓三: 全国临床检验操作规程，第一版，东南大学出版社出版，南京，第451页，1991。

(1992-6-4 收稿)