

医学真菌常用培养基的制备和应用

朱红梅 徐红 温海

(上海长征医院全军真菌病重点实验室)

【关键词】 医学真菌;培养基;制备

【中图分类号】 R 446.53 【文献标识码】 B 【文章编号】 1673-3827(2010)05-0296-11

真菌的培养方法和细菌培养方法基本相同,但真菌除试管及平皿培养外,还有小培养(玻片培养)直接观察真菌形态结构。真菌对环境抵抗力强,因此所需营养与细菌有所不同,pH 范围较大,真菌菌落较大,杂菌污染时易于发现,除少数菌种外一般培养并不困难。

1 真菌的基础培养基

1.1 沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)

配方 葡萄糖 40 g、蛋白胨 10 g、琼脂 18 ~ 20 g、水 1 000 mL。将以上成分倒入烧杯或铝锅内,先加少量蒸馏水进行加热溶解,不断搅拌,待完全溶解后补足蒸馏水分至所需要的总体积,并加入氯霉素 50 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分装试管,115 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 高压灭菌。

用途 用于真菌常规培养。

1.2 沙氏液体培养基

配方 葡萄糖 40 g、蛋白胨 10 g、水 1 000 mL。混合以上成分,分装试管中,115 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 高压灭菌。

用途 观察真菌在液体培养基中生长状态。念珠菌属在此基中生长良好。

1.3 改良沙氏琼脂基

配方 麦芽糖 20 g、蛋白胨 10 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL。制法同 SDA。为防止细菌生长,培养基中可加庆大霉素 40 ~ 50 g/mL ,或加氯霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,抑制污染真菌可加入放线菌酮 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,但影响新生隐球菌和曲霉菌生长。加入维生素 B 0.1 mg/mL ,可以促进紫色癣菌和断发癣菌生长繁殖。

加入酵母浸膏 5 mg/mL ,可促进皮肤癣菌生长。

1.4 保存菌种培养基

配方 蛋白胨 10 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL。

制法:同 SDA。

用途 保存菌种。

2 浅部真菌常用的鉴定培养基

2.1 米饭培养基

主要配方 大米 8 g、蒸馏水或自来水 25 mL、置于 125 mL 的烧瓶中。也可根据 1 g 米、3 mL 水的比例,使用平皿、试管等容器。高压灭菌,121 $^{\circ}\text{C}$ 6.8 kg 15min,冷却后备用。

用途 用于鉴别非典型的羊毛状小孢子菌和奥杜盎小孢子菌,还能促进许多皮肤癣菌产生孢子,有助于鉴定。

2.2 玉米粉吐温琼脂

配方 玉米粉 50 g、葡萄糖 2 g、琼脂 15 g、吐温-80 10 mL 加蒸馏水 1 000 mL,将玉米粉倒入 1 000 mL 蒸馏水中,混合均匀。高压 121 $^{\circ}\text{C}$ 6.8 kg 10 min。用 2 层纱布过滤后,蒸馏水补足 1 000 mL。加入琼脂、葡萄糖、吐温-80 后加热至沸。高压灭菌后分装试管置斜面,冷却后冰箱保存。试管斜面有效期为 30 d,平皿 14 d。

用途 典型的红色毛癣菌在沙氏琼脂培养基上有深红色的色素,但许多菌株在初代培养的沙氏琼脂培养基上却不产生这种色素。含 0.2% 葡萄糖玉米粉吐温琼脂的培养基能促进红色毛癣菌产生深红色色素,而其他常见的皮肤癣菌则无这种现象,所以可用于红色毛癣菌的鉴别。玉米粉吐温琼脂如不加葡萄糖可用作念珠菌鉴定的小培养,以促进白念珠菌假菌丝和厚壁孢子的形成,也会促进暗色孢科真菌孢子的形成。

2.3 尿素琼脂

作者简介:朱红梅,女(汉族),博士,副主任医师。E-mail:hmzhu_cn@yahoo.com.cn

通讯作者:温海,E-mail:wenhai98@sohu.com

配方 葡萄糖 10.0 g、琼脂 20.0 g、蛋白胨 1.0 g、NaCl 5.0 g、 KH_2PO_4 2.0 g、酚红 0.012 或 0.02% 水溶液 6 mL、蒸馏水 1 000 mL、20% 尿素液（后加）。各成分混合均匀后调 pH 至 6.8。加入琼脂 20 g，煮沸至琼脂完全溶解，置高压消毒，4.54 kg（10 磅）10 min。取出后冷却至 45~50℃ 时，每 450 mL 培养基中加入抽滤灭菌的 20% 尿素溶液 50 mL，混合均匀后分装斜面，冷后备用。

用途 新生隐球菌等一些隐球菌和一些酵母能够尿素酶，而许多其他酵母包括念珠菌属中的一些种却不能产生尿素酶，这个特性构成酵母鉴定、鉴别的依据之一。尿素酶能分解培养基中的尿素，并形成大量的氨，使培养基 pH 值升高而呈碱性，酚红指示剂因而变红。另外皮肤癣菌的尿素酶试验也用此培养基，但葡萄糖的浓度不是 1% 而是 5%。用于鉴别红色毛癣菌和须癣毛癣菌，后者能在 7 d 内使培养基变红。

2.4 皮肤癣菌鉴别琼脂 (DTM)

配方 葡萄糖 10 g、蛋白胨 10 g、琼脂 20 g、酚红 (0.2%) 6 mL、盐酸 (0.8 N) 蒸馏水 1 000 mL。

制法 待琼脂加热溶化后，再加入其他成分混匀，121℃ 15 min 高压灭菌，冷至 45℃ 加酚红与盐酸氯霉素或庆大霉素。

用途 鉴定皮肤癣菌。

2.5 橄榄油培养基

配方 马铃薯 200 g、葡萄糖 15 g、蛋白胨 10 g、酵母浸膏 10 g、橄榄油 20 mL、琼脂 15 g、蒸馏水 1 000 mL。制法：先将马铃薯制成浸汁，然后加入其他成分，加热溶解，分装于试管中，121℃ 20 min 高压灭菌，取出置成斜面，室温保存。

3 深部真菌常用的鉴定培养基

3.1 咖啡酸琼脂

配方 葡萄糖 59.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 酵母浸膏 29.0 g、 K_2HPO_4 0.89 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.79 g、咖啡酸 0.189 g、枸橼酸铁溶液 4 mL、琼脂 20.09 g、蒸馏水加至 1 000 mL。充分混合，加热至琼脂溶解，高压灭菌后置斜面，冷却后备用。

用途 咖啡酸试验用于鉴别新生隐球菌。将待鉴定酵母接种于咖啡酸琼脂斜面，置 25℃ 培养 24~72 h，观察有无色素产生。新生隐球菌会产生棕色色素，其他隐球菌可能有很淡的色素，而酵母菌则不产生色素。

3.2 马铃薯 (PDA) 培养基

配方 马铃薯 200 g、琼脂 20.0 g、葡萄糖 20.0 g、蒸馏水 1 000 mL。将马铃薯洗皮，切成碎块，加入煮沸 20 min。纱布过滤。滤液中加入葡萄糖和琼脂，加热使之溶化。再补足水量至 1 000 mL，分装，高压灭菌。

用途 用于培养和鉴定曲霉菌和青霉菌。

3.3 米粉吐温琼脂培养基

配方 米粉 10.0 g、琼脂 20.0 g、吐温-80 10.0 g、蒸馏水 1 000 mL。先将米粉用半量蒸馏水调成糊状，用另外半量水将琼脂溶化，混合两部分，加入吐温-80，搅匀，补足水量，校正 PH 值，分装，15 磅灭菌 20 min。

用途 用于培养白念珠菌产生厚壁孢子和菌丝。

3.4 察氏琼脂培养基

配方 硝酸钠 3 g、磷酸氢二钾 1 g、硫酸镁 0.5 g、氯化钾 0.5 g、硫酸铁 0.01 g、蔗糖 30 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL。除了蔗糖及琼脂外，其余成分均加入水中。在水浴中加热约 15 min 后，稍冷却即将蔗糖及琼脂加入。121℃ 20 min 高压灭菌。

用途 用于分离、培养及鉴定真菌及放线菌常用的培养基，对耐高渗透压的菌株，可增加蔗糖含量至 30%~40%，为高渗察氏琼脂。用 0.5% 蛋白胨代替硝酸钠，即为察氏蛋白胨琼脂，适用培养酵母菌。

3.5 芽管实验培养基

成分 人血或动物血清（或鸡蛋清）。

制法 将以上血清装入 12 mm × 75 mm 试管，每 0.3 mL，用棉塞塞好放 -70℃ 冰箱备用，保存期 1 a。

用途 鉴定白念珠菌。接种后放 37℃ 温箱孵育 2.5 h，白念珠菌可长出芽管，而热带及其他念珠菌则无。

3.6 奴卡菌鉴定培养基

配方 1 液：牛肉浸膏 3 g、蛋白胨 5 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 000 mL。2 液：酪氨酸 5 g、黄嘌呤 4 g，先将琼脂加入 90% 水量，加热溶化，再加入牛肉浸膏和蛋白胨熔化，调整至 pH 7.0，分装于三角烧瓶中，121℃ 20 min 高压灭菌，待用。(2) 将酪氨酸溶于少量蒸馏水中，113℃ 20 min 高压灭菌，待用。使用时混合 (1)、(2) 两液，摇匀，在无菌操作下分装于试管内，制成斜面或平皿基，备用。

用途 鉴定奴卡菌与链霉菌。

3.7 高斯氏合成培养基

成分 硝酸钾 1 g、氯化钠 0.5 g、磷酸氢二钾 0.5 g、硫酸镁 0.5 g、硫酸亚铁 0.01 g、可溶性淀粉 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL,将可溶性淀粉用少量蒸馏水调成糊状,加入约半量水煮沸,加入其他成分,另将琼脂加半量蒸馏水熔化,再与前者混合,并补足水量,调整至 pH7.2 ~ 7.4,分装试管中,121℃ 20 min 高压灭菌。

用途 培养和鉴定放线菌。

3.8 葡萄糖酵母汁蛋白胨液体基

成分 蛋白胨 10 g、琼脂 5 g、蒸馏水 1 000 mL、葡萄糖 20 g,混合以上成分加热煮沸,分装于试管中,113℃ 灭菌 15 min。

用途 分离培养酵母菌。

3.9 子囊琼脂

成分 氯化钠 5 g、琼脂 10 g、蒸馏水 1 000 mL、葡萄糖 2.5 g、牛肉浸膏 10 g,混合以上成分,115℃ 灭菌 10 min。

用途 培养酵母菌子囊。

3.10 石膏块培养基

取硫酸钙 ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) 8 份,水 3 份,混合制成楔状石膏块斜面,置于管底垫棉花的试管内,用稀麦芽汁(糖度为 1.5 波林),或 2% 甘露醇和 0.5% 磷酸氢二钾溶液湿润之,113℃ 灭菌 30 min。

用途 培养酵母菌产生子囊孢子。

3.11 脱脂牛奶培养基

制法 取新鲜牛奶 100 mL,离心 (3 000 r/20 min),去除表面奶皮,即成脱脂牛奶,分装于试管中,常压间歇灭菌 3 次,每次 30 min。根据需要可加石蕊作指示剂,以使结果显示清晰。石蕊用量为 100 mL 牛奶,加 2.5% 石蕊水溶液 0.4 mL。

用途 鉴别放线菌、酵母菌等对牛奶的利用能力。

3.12 毛霉合成培养基

成分 葡萄糖 40 g、天冬酰胺 2 g、磷酸二氢钾 0.5 g、硫酸镁 0.25 g、硫酸素 0.005 g、琼脂 15 g、水 1 000 mL, pH6.9 ~ 7.1。

制法 除硫酸素外,其余成分加于水中,混匀,加热溶解,调 pH,分装,116℃ 20 min 高压灭菌。硫酸素配制水溶液,过滤除菌,用时按比例无菌加入。

用途 培养与鉴别毛霉。

3.13 同化氮源琼脂

成分 葡萄糖 20 g、磷酸二氢钾 1 g、硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5 g、酵母浸膏 0.2 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL, pH6.4 ~ 6.6。

制法 各成分相加,混匀,加热溶解,调 pH,116℃ 20 min 高压灭菌,用于测氮源的化合物,常为硫酸铵、硝酸钾等,加入量可用 0.5% ~ 1%。

用途 测定酵母利用氮源的能力,可用生长图谱法试验。

3.14 糖发酵肉汤基础

成分 牛肉浸膏 3 g、蛋白胨 5 g、氯化钠 5 g、1.6% 溴甲酚紫 1 mL、水 1 000 mL, pH7.2。

制法 各成分相加(溴甲酚紫除外),混匀,加热溶解,调至 pH7.2,加入溴甲酚紫,116℃ 20 min 高压灭菌。使用前,加入糖溶液 10% 溶液,煮沸 15 min 杀菌,用 110℃ 10 min 高压灭菌更佳,浓度为培养基的 2%。肉汤基础加入 0.5% 琼脂,即为糖发酵半固体培养基。

用途 酵母发酵糖类的能力测定。

4 特殊培养基

4.1 富集培养基

脑心浸双相培养基 (Biphasic Medium of Brain-heart Infusion, Roberts and Wasington, 1975) 从血液标本中分离真菌,或从正常无菌的骨髓、脊髓等标本中分离难培养真菌。

脑心葡萄糖血琼脂 (Brain Heart Glucose Blood Agar) 分离培养深部病原性真菌,若使用 5% ~ 10% CO_2 培养箱,可培养厌氧放线菌。

淀粉琼脂 (Starch Agar) 培养丝状真菌。

酵母浸膏琼脂 I (Yeast Extract Agar I) 培养真菌,可刺激毛癣菌属产生大分生孢子。特别注意酵母浸膏加量,过多会刺激菌丝生成,不利孢子产生。

酵母浸膏琼脂 II (Yeast Extract Agar II) 培养毛壳菌及其他子囊菌。

毛癣菌琼脂 1 ~ 7 号 (Trichphyton Agar Number 1-7, Difco, 1953) 用于鉴别各种毛癣菌。由于各种毛癣菌毛癣菌有不同的营养要求,用系列培养观察它们的生长情况,判断其所属。

4.2 选择性培养基

溴甲酚绿琼脂培养基 (Bromocresol Green Agar Medium, Harold and Snyder, 1969) 多种念珠菌及

其他酵母菌在此培养基生产特殊颜色的菌落,有利于挑取单个菌落作纯培养,并可对其中的一些做初步鉴别。加入新霉素可减少细菌的污染。

皮肤癣菌鉴别琼脂 (Dermatophytes Identity Agar, DTM) 分离、培养及鉴别皮肤癣菌,多数皮肤癣菌在生长过程中可使分解的氨基酸产碱,培养基由黄色变为红色,污染真菌一般不变色,白念珠菌等酵母也不变色。

油菊籽培养基 (Niger Seed Agar, Staib Agar, Birdseed Agar, Guizotia Abyssinica Creatinine Agar, Dolan and Roberts, 1974) 为选择鉴别培养基,可从隐球菌属及其他酵母菌中,将新生隐球菌区别出。

皮癣菌试验培养基 (Dermatophyte Test Medium, Taplin, Zaias, Rebell, 1969) 为一种选择性培养基,放线菌酮可抑制多种常见霉菌,庆大霉素和四环素可抑制大多数的细菌污染。酚红可检出皮癣菌及有关真菌的产碱能力,故为一种鉴别试验。有些非皮癣菌也可产生阳性(红色)颜色反应。

熊果甙琼脂(或称杨梅苷琼脂, Arbutin Agar) 检查酵母菌分解熊果甙的能力。若能分解,菌苔表面可呈现褐色。

真菌选择性培养基 (Fungus selection Agar with Cycloheximide and Chloramphenicol, Mycosel Agar, Mycobiotic Agar, Difco, 1960) 可从被大量霉菌或细菌菌群污染的标本中分离病原性真菌。

咖啡酸琼脂培养基 (Caffeic Acid Agar medium, Healey, Dillavou and Taylor, 1978) 鉴别新生隐球菌。新生隐球菌在此培养基上室温培养可形成可褐色菌落,而其他的隐球菌、念珠菌、球拟酵母等均不产生颜色。

酵母浸粉磷酸盐培养基 (Yeast Extract Phosphate Medium, Smith and Goodman, 1974) 从污染标本中分离组织胞浆菌及皮炎芽生菌。但需加氨水。

4.3 培养特性研究用培养基

同化碳源琼脂基础 I (Carbon Sources Assimilation Agar Base I) 分固体及液体两种。固体培养基适用于生长图谱法,观察酵母菌同化碳源的能力。液体培养基适用于检查生长缓慢的酵母菌利用碳源的能力。

产酯培养基 (Ester-formation Medium) 酵母形成酯试验。

同化乙醇培养基 (Ethyl Alcohol Assimilation Medium) 酵母同化乙醇试验。

糖发酵肉汤基础 (Sugar Fermentation Broth Base) 酵母发酵糖类的能力测定。

低温试验用琼脂或冰冻琼脂 (Lowtemperature Test Agar; Freeze Agar) 皮肤癣菌接种后,置 2~10℃ 冰箱中,可促使铁锈色小孢子菌产生大分生孢子。

明胶培养基 (Gelatin Medium) 用于观察真菌、放线菌等对动物蛋白(明胶)液化利用的能力。

油脂分解培养基 (Grease Decomposition Medium) 为检查酵母脂肪分解试验的基础培养基。

克来因氏琼脂 (Kleyn's Agar, 即醋酸钠培养基) 培养酵母形成子囊孢子。

钼培养基 (Molybdenum Medium) 分离鉴别酵母,特别是白念珠菌。白念珠菌为中等大光滑型橄榄色菌落;星形念珠菌为有光泽的浅灰色菌落;热带念珠菌为光滑、深蓝色或深灰色菌落;克柔氏念珠菌为光滑、暗白色菌落;酿酒酵母菌为光滑有光泽的浅蓝色或深蓝色菌落。

毛霉合成培养基 (Mucor Synthetic Medium) 培养鉴别毛霉。

同化氮源琼脂基础 (Nitrogen Source Assimilation Agar Base) 鉴定酵母利用氮源的能力,可用生长图谱法试验。

米粉吐温-80 琼脂 (Rice-flour Tween-80 Agar) 培养的念珠菌产生厚壁孢子及菌丝。

米饭培养基 (Rice medium) 可促使犬、歪斜及奥杜盎等小孢子菌产生大分生孢子,也能刺激某些皮肤癣菌产生孢子。

脱脂牛乳培养基 (Skim Milk Medium) 用于鉴定念珠菌属和丝孢酵母属。

淀粉样化合物测试培养基 (Starch-Like Substances Assay medium) 测定酵母菌产生淀粉样化合物的能力。经 25~28℃ 培养 1~2 周,若形成淀粉样化合物,滴加碘液后,在菌体周围可形成蓝色。

尿素琼脂 (Urea Agar) 鉴定红色癣菌和须癣毛癣菌,后者生长 3~4 d 后,可使培养基由黄色变为红色,即为阳性反应。念珠菌及酵母为阴性反应,培养基不变色。

4.4 染色检查

HE 染色 HE 染色对许多真菌都适用,而且不掩盖真菌本身的颜色,并能显示组织反应和

Splendore-Hoeppli 现象,是真菌组织病理检查必不可少的染色方法,尤其对曲霉和接合菌(毛霉、根霉)等染色较好。但大多数病原真菌经 HE 染色后,真菌的颜色和组织的颜色接近,虽能辨别轮廓,但不易区别。尤其是当组织中真菌成分很少的时候,更易忽略。为了解清楚地显示组织中的真菌,除 HE 染色外,还应根据需要采用其他染色方法。

革兰染色 (gram stain) 革兰染色有 Brown 法、Brenn 法、Brown-Hopps 法、MacCallum-Goodpasture 法等。真菌和放线菌类为革兰染色阳性,呈蓝黑色,核呈红色。其他革兰阴性微生物呈红色,背景为黄色。革兰染色法对放线菌、奴卡菌和链霉菌染色较好,而且可以发现组织中真菌与细菌的双重感染。缺点是对许多真菌无选择性的染色作用。

抗酸染色 (Acid fast stain) 抗酸染色阳性呈红色。部分抗酸染色阳性呈节段性红色,背景为蓝色。抗酸染色适用于星形奴卡菌、巴西奴卡菌、豚鼠奴卡菌等,也适用于结核分枝杆菌和其他分枝杆菌。有时奴卡菌在组织中抗酸染色也呈阴性,真菌则抗酸染色全部阴性。

GF 染色 (Gridley fungus stain) 孢子染成深玫瑰色至紫色,菌丝为深蓝色或深玫瑰色,弹力纤维和黏蛋白等呈深蓝色,背景黄色。

嗜银染色 (gomori methenamine silver stain, GMS) 真菌细胞壁、放线菌、奴卡菌、链霉菌、网状纤维、弹力纤维等染成黑色,黏蛋白呈深灰色,菌丝内胞浆呈深玫瑰色,背景为淡绿色。GMS 染色时要经常检查以保证染色的时间适当,以免染色过深。若染色过深,红细胞和裸露的核会染黑而与酵母混淆;血管会着色与接合菌的菌丝相似。对肺囊虫病感染尤为重要,因为肺泡中的红细胞也可为新月形,染黑后极似肺囊虫孢子。

过碘酸锡夫染色 (Periodic acid-Schiff stain, PAS) 因为真菌和组织中含有的多糖成分如糖原、黏蛋白、透明质酸、血栓纤维蛋白、类淀粉物及胶质颗粒等,经其染色都呈红色,核蓝色,背景为淡绿色。PAS 染色对放线菌、奴卡菌和链霉菌不能显色或染色很差,所以这些菌的感染不应用 PAS 染色检查。另外,因黏蛋白也着色成红色,所以 PAS 染色法不适用于未经消化处理的呼吸道分泌物。

GF、GMS 和 PAS 这 3 种特殊染色方法都非常适用于真菌,其中 GMS 染色优于 GF 和 PAS 染色,尤其是对老的和无活力的真菌更加适用。GMS 染

色对放线菌、奴卡菌和链霉菌也同样适用。当标本中真菌数量极少时,更应采用 GMS 染色法,因为染色后的真菌与背景对比强烈,非常明显,不易忽略。

GMS 染色法的缺点是会掩盖真菌本来的颜色和周围组织的反应,而且 GMS 染色可能着色过深而不能分辨真菌结构的细节。若与 HE 染色法联合使用,即先用 GMS 染色,然后用 HE 染色法复染,就结合了这两种染色法的优点,既易发现真菌,又能显示组织反应,也对放线菌类适用。当只有 1 张病理组织片时,GMS-HE 染色法应为首选,但这种方法的缺点也会掩盖真菌的本色。

吉姆萨染色 (Giemsa stain) 吉姆萨染色将真菌染成浅到深蓝色,核蓝色,荚膜蓝灰色至红色,背景为粉红色或淡蓝色。吉姆萨染色用于荚膜组织胞浆菌细胞内孢子的辨认。孢子周围有晕,系染色过程中细胞壁皱缩所致而非荚膜。

黏蛋白卡红染色 (Mayer's mucicarmine stain, MMS) 黏蛋白卡红染色用于新生隐球菌的染色,能将新生隐球菌和与其形态、大小相似的酵母鉴别开来。MMS 染色将新生隐球菌的荚膜染成红色至深玫瑰色,核呈黑色,背景黄色。但这种染色并非特异,鼻孢子菌、一些皮炎芽生菌的孢子也会被染成红色,但它们的形态不同,容易区别。

其他染色 1) 子囊孢子染色 (ascospore stain): 能将酵母菌染成红色,子囊孢子呈绿色,对比鲜明。2) Wright 染色: 适用于血涂片,能将单核细胞核其他血细胞内的荚膜组织胞浆菌染成蓝至深蓝色。

4.5 生化检查和营养

为了鉴定菌种,有时必须依赖一些生理、生化实验和营养试验。

5 酵母鉴定试验培养基

5.1 碳源同化试验

酵母能发酵某种糖就一定同化该糖,故同化试验只需做不能被发酵的碳源,一般用生长图谱法。碳源有葡萄糖、半乳糖、山梨醇、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、海藻糖、乳糖、蜜二糖、棉子糖、松三糖、菊芋糖、可溶性淀粉、D-木糖、C-阿拉伯糖、D-阿拉伯糖、D-核糖、L-鼠李糖、乙醇、甘油、赤藓糖醇、核糖醇、II 矛醇、D-山梨醇、水杨苷、 α -甲基-D-葡萄糖苷、杨梅苷、DL-乳酸、琥珀酸、柠檬酸、肌醇等。

方法 使用半固体碳源同化培养基。取 20

mL 装入大试管, 3.632 kg (8 磅) 30 min 灭菌。另将二接种环生长 3 d 的待鉴定酵母加 1 mL 无菌蒸馏水, 要匀成混悬液, 倒入已冷却至 45 ~ 50℃ 的大试管中, 与碳源同化培养基混合均匀, 再倒入无菌平皿中, 待其凝固。然后倒置于 28℃ 温箱中数小时, 使表面干燥。底部标上碳源名称。培养基用无菌小铲开沟, 沟不能开至中心点, 以免培养基移动。每个平皿最多可分隔成 6 块, 可同时测试 6 种碳源。每块培养基表面用无菌不锈钢匙或牙签按底部标记加入待测碳源。加不同的碳源需用不同的小匙, 以免碳源相互污染。也可用圆纸片浸 10% 待测碳源 (应煮沸消毒), 置每块培养基表面。以葡萄糖为对照, 置 25℃ 培养 1 ~ 2 d, 观察结果。碳源四周若有酵母生长圈表示阳性, 即该菌能同化这种碳源。

凡生长缓慢的酵母可用液体碳源同化培养基, 将待测碳源和待鉴定酵母加入培养基, 25℃ 培养 1 ~ 2 周, 观察有无菌落生长。必要时可延长至 3 周, 仍以葡萄糖为对照。若培养基混浊、有菌璞、菌环和菌岛等形成表示同化试验阳性, 即待鉴定酵母能同化这种碳源。

培养基 ①碳源同化固体培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0 g, 酵母浸膏 0.2 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水 1 000 mL。将琼脂与蒸馏水混合加热至沸, 待琼脂溶化后加入上述其他成分, 搅拌均匀装三角烧瓶, 塞上棉花塞, 3.632 kg (8 磅) 灭菌 30 min 后倒入平皿, 每平皿 20 mL。待冷却凝固后底朝上置 28 ~ 30℃ 的温箱中数小时, 使表面干燥, 即可使用。②碳源同化液体培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.1 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, 酵母浸膏 0.2 g, 蒸馏水 1 000 mL, 全部成分混合搅拌均匀后, 分装试管, 每管 3 mL。3.632 kg (8 磅) 灭菌 20 min, 冷却后即可使用。试验时以葡萄糖为对照。适用于鉴定生长缓慢的酵母。碳源浓度为 0.5%。

5.2 碳源发酵试验

碳源发酵试验所用的糖类有葡萄糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、棉子糖、蜜二糖、纤维二糖、海藻糖、松三糖、菊芋糖、可溶性淀粉、 α -甲基-D-葡萄糖苷等。容器一般采用杜氏管, 菌丝多的酵母采用艾氏管。培养基使用 12.5% 豆芽汁或 0.6% 酵母粉浸汁, 糖浓度为 2%, 棉子糖为 4%。试验时若杜氏管内小管顶部或艾氏管封闭一端的顶部有

二氧化碳气体产生为阳性, 说明待鉴定酵母能发酵这种糖。凡能发酵葡萄糖的酵母, 就能发酵果糖和甘露糖, 所以测定葡萄糖后, 不必再测定果糖和甘露糖。

方法 取二接种环已生长 3 d 的待鉴定酵母, 置 2 mL 蒸馏水中摇匀成混悬液, 再取 0.2 mL 混悬液滴入发酵管中。发酵管内含 3 mL 液体培养基和用于发酵的糖。另取 1 管不加糖的作为对照, 以观察待鉴定菌种是否“携带”糖。接种完毕后置 25℃, 每天观察结果, 检查有否二氧化碳气泡产生, 并轻轻摇动培养基。艾氏管每次观察结束后还必须用接种针将菌丝尽量推入试管封闭端以免影响观察。一般观察 2 ~ 3 d 即可。如无发酵可延长至 10 d, 半乳糖发酵较慢, 宜观察 2 周 ~ 1 个月。

每次检查时应先观察对照管有无生长, 若有生长, 说明该酵母本身携带糖类, 全部实验应重做。

培养基 ①12.5% 豆芽汁: 黄豆芽 125 g 加水 1 000 mL, 煮沸 30 min, 过滤后加蒸馏水补至 1 000 mL, 3.632 kg (8 磅) 30 min 高压灭菌后分装。②0.6% 94 酵母粉浸汁: 60 g 干酵母粉加水至 1 000 mL, 6.81 kg (15 磅) 15 min 高压灭菌, 趁热用双层滤纸过滤, 再 3.632 kg (8 磅) 30 min 高压灭菌后分装。

5.3 产子囊孢子试验

用途 子囊菌亚门的酵母。尤其是酵母属 (*Saccharomyces*) 中的一些种, 在产子囊孢子琼脂上能产生子囊孢子, 为菌种鉴定的重要依据。

方法 将待鉴定菌种划线接种于产子囊孢子琼脂上, 同时接种 1 管酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 作为对照, 置室温培养 3 d。各挑取菌落, 以蒸馏水制成涂片, 吹干后热固定, 抗酸染色后置显微镜下检查。子囊孢子呈红色。着检查阴性, 需继续培养, 每周检查 1 次, 连续 3 周。若此时对照阳性而待鉴定菌种仍无子囊孢子出现, 结果判为阴性。也可采用子囊孢子染色法, 于囊孢子染成蓝绿色而其他细胞呈红色, 更清楚易辨。

产子囊孢子琼脂 (*ascospore agar*) 培养基 醋酸钾 10.0 g, 酵母浸膏 2.5 g, 葡萄糖 1.0 g, 琼脂 30.0 g, 蒸馏水 1 000 mL。将各成分充分混合后加热至沸, 使琼脂溶解。高压灭菌后分装平皿。

5.4 放线菌酮耐受试验

用途 念珠菌属的一些种对放线菌酮敏感, 利用这一特性可有助于鉴别念珠菌属中的一些种及

其他的一些病原真菌。

方法 挑取待鉴定念珠菌加无菌蒸馏水制成混悬液,划线接种于含有放线菌酮的沙氏琼脂培养基上,接种量为一接种环。另接种 1 管不含放线菌酮的沙氏琼脂培养基为对照。置室温培养 3 d,观察结果。放线菌酮耐受试验用于其他真菌的鉴定时,方法同上,但应观察 4 周时间。

结果判定 两管均有生长判为阳性,表示对放线菌酮不敏感,能耐受。有放线菌酮的斜面无生长或比对照管生长差,判为阴性,表示对放线菌酮敏感。

在含放线菌酮的沙氏琼脂培养基上能够生长的念珠菌为白念珠菌(99%)、伪热带念珠菌、季也蒙念珠菌、类星形念珠菌,不能生长的念珠菌为近平滑念珠菌、热带念珠菌和克柔念珠菌。

5.5 芽管试验

方法 用无菌细吸管吸取少量待鉴定酵母接种于 0.5 mL 无菌的兔、牛或人血清中,混合均匀。将血清连吸管一起置 37℃ 培养,2 h 后吸取血清标本作涂片,镜下观察有无芽管形成。芽管为短菌丝,与母细胞连接处无缩窄环,判为阳性。芽孢和假菌丝则有缩窄。如有疑问可用油镜复查。另取 1 管血清接种白念珠菌作为对照。培养时间不得 >3h。若 >3h,热带念珠菌或其他一些真菌也有可能形成芽管,产生假阳性结果。

结果判断 白念珠菌和类星形念珠菌芽管试验阳性,其中 98% 为白念珠菌,所以芽管试验阳性一般可报告为白念珠菌。由于菌株之间存在差异,有些白念珠菌也会不形成芽管。

5.6 米粉小培养

用途 与玉米粉吐温琼脂培养和芽管试验的意义相同,用于观察酵母的形态以利于鉴定白念珠菌、念珠菌属、丝孢酵母属和地霉属。

方法 按配方称取当年新糯米所磨的米粉,加水搅拌均匀,隔水煮 30 min。如颗粒太粗,可用细纱布过滤。滤液中加入琼脂,加热至溶化,再加入吐温-80,蒸馏水补足 1 000 mL,分装试管后高压灭菌。冷却后置冰箱保存。用时取出,将试管先在火焰上慢慢加热,待培养基融化,倒在玻片上用作小培养。在小培养上(平板)划线接种待鉴定菌种,以白念珠菌作为对照。每块平板可接种 6 个菌株,盖上无菌盖玻片,置无菌平皿中,加湿棉球保湿,25℃ 培养 48 h。将平板置显微镜下检查,观其形态。

有假菌丝和芽孢为念珠菌属,有顶端厚壁孢子形成则 98% 为白念珠菌,2% 为类星形念珠菌,有假菌丝、芽孢和关节孢子为丝孢酵母,仅有假菌丝和关节孢子为地霉属,无菌丝只有孢子为酵母。

米粉培养基 米粉 10.0 g、吐温-80 mL、琼脂 10.0 ~ 20.0 g、蒸馏水 1 000 mL。

5.7 硝酸盐同化试验

方法 采用生长图谱法。取 2 接种环已生长 24 ~ 48 h 的待鉴定酵母,置 1 mL 无菌蒸馏水中成混悬液,倒入已冷却至 45 ~ 50℃ 含 15 mL 无氮源培养基的大试管中,混合均匀后倒平皿,待凝固。用记号笔在平皿反面将平皿一划为二。用无菌不锈钢匙或牙签加少量硝酸钾于半边培养基的表面,另半边加少量蛋白胨。用白隐球菌(*Cryptococcus albidus*)和新生隐球菌作为阳性和阴性对照。

5.8 咖啡酸试验

方法 咖啡酸试验用于鉴别新生隐球菌。将待鉴定酵母接种于咖啡酸琼脂斜面,另接种 1 管白念珠菌为阴性对照,1 管新生隐球菌为阳性对照。置 25℃ 培养 24 ~ 72 h,观察有无色素产生。新生隐球菌会产生深棕色色素,其他隐球菌可能有很淡的色素,而酵母菌则不产生色素。

培养基 ①咖啡酸琼脂(caffeic acid agar):葡萄糖 59.0 g、(NH₄)₂SO₄ 59.0 g、酵母浸膏 29.0 g、K₂HPO₄ 0.89 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.79 g、咖啡酸 0.189 g、枸橼酸铁溶液 4 mL、琼脂 20.09 g、蒸馏水加至 1 000 mL。充分混合。加热至琼脂溶解,高压灭菌后置斜面,冷却后备用。②咖啡酸米粉琼脂(caffeic acid rice Powder agar):米粉 10.0 g、琼脂 20.0 g、吐温-80 10 mL、咖啡酸 0.3 g、蒸馏水 1 000 mL。将米粉、琼脂煮溶后用纱布过滤,加入吐温-80 和咖啡酸。咖啡酸用少量 95% 乙醇溶解。混合均匀后分装试管,高压灭菌,115℃,4.5 kg,10 min,取出后置斜面。

用时将待鉴定酵母接种于咖啡酸米粉琼脂,置 25℃ 培养。18 ~ 72 h 菌落变褐或黑色为阳性。其他隐球菌或酵母不变色为阴性。以白念珠菌和新生隐球菌为阴性和阳性对照。

5.9 尿素酶试验

用途 新生隐球菌等一些隐球菌和一些酵母能够产生尿素酶。而许多其他酵母包括念珠菌属中的一些种却不能产生尿素酶,这个特性构成酵母鉴定、鉴别的依据之一。尿素酶能分解培养基中的

尿素,并形成大量的氨,使培养基 pH 值升高而呈碱性,酚红指示剂因而变红。

方法 将待鉴定酵母接种于尿素琼脂斜面上。另接种一管新生隐球菌作为阳性别照。置室温培养 3 d,每天观察颜色变化。

结果 培养基呈粉红色或鲜红色为阳性,说明有尿素酶产生。若培养基颜色不变或仅为黄色,判为阴性,表示有酸产生。注意一些尿素酶阳性的细菌污染也有可能产生阳性结果。

尿素琼脂 (chhensen's urea agar) 的配方 葡萄糖 10.0 g、琼脂 20.0 g、蛋白胨 1.0 g、NaCl 5.0 g、KH₂PO₄ 2.0 g、酚红 0.012 或 0.02% 水溶液 6 mL、蒸馏水 1 000 mL、20% 尿素液 (后加)。各成分混合均匀后调 pH 至 6.8。加入琼脂 20 g 煮沸至琼脂完全溶解,置高压消毒,4.54 kg (10 磅) 10 min。取出后冷却至 45~50℃ 时,每 450 mL 培养基中加入抽滤灭菌的 20% 尿素溶液 50 mL;混合均匀后分装置斜面,冷后备用。

皮肤癣菌的尿素酶试验也用此培养基,但葡萄糖的浓度不是 1% 而是 5%。用于鉴别红色毛癣菌和须癣毛癣菌,后者能在 7 d 内使培养基变红。

5.10 水解淀粉试验

方法 使用淀粉培养基。取 2 个平皿各接种待鉴定菌种,另取一平皿接种已知菌种作为阳性对照。将平皿置 25℃ 或 37℃ 培养,视该菌最适生长温度而定。菌落生长成熟后,取一待鉴定平皿,倒入 95% 乙醇 10 mL。若菌落四周有明显的圈,为阳性,说明该菌能水解淀粉。若无明显的圈,第 2 周再检测第 2 个平皿。如果仍为阴性,而对照为阳性则判为阴性。若对照也为阴性,需重做该实验。

淀粉培养基 (starch meurn) 配方 ①蛋白胨 5.0 g、牛肉浸膏 3.0 g、琼脂 15.0 g、蒸馏水 1 000 mL。②马铃薯淀粉 10.0 g、蒸馏水 400 mL。

制备 将①组成分混合均匀,加热至沸,待琼脂完全溶解。将②组混合均匀,倒入已溶化的①组内,混合均匀。高压灭菌,分装平皿,冷却凝固后备用。

5.11 分解杨梅苷试验

用途 该试验检测酵母葡萄糖苷酶的活性,用于属的鉴别,包括汉逊酵母属 (*Hansenula*)、季也蒙酵母属 (*Guilliermondia*)、念珠菌属、酵母属、毕赤酵母属 (*pichia*) 等。

方法 将试管内备用的杨梅苷琼脂加热融化,

加入一滴无菌的 10% FeCl₃。混合均匀后置斜面。凝固后接种待鉴定菌株,置室温培养 1 周,观察结果。如果培养基变为褐色,判为阳性,说明该菌株能分解杨梅苷。

杨梅苷琼脂 (arbutin agar) 杨梅苷 0.5 g、水洗琼脂 2.0 g、10% 豆芽汁 100 mL。豆芽汁加入琼脂,加热溶化后再加入杨梅苷,混合均匀后分装于大试管,高压灭菌后备用。

5.12 石蕊牛奶试验

用途 用于鉴定念珠菌属和丝孢酵母属。

方法 牛奶中加入石蕊作为指示剂,接种待鉴定菌种后置 28℃ 培养 2~4 周,观察牛奶颜色和形态的变化。

结果 产酸或产碱,石蕊酸性时呈粉红色,表示待鉴定菌种能发酵牛奶中的乳糖产酸;石蕊变蓝色,说明牛奶中的酪蛋白被分解产生碱性物质;中性时石蕊呈淡紫色。

酪化 有些酵母能产生蛋白酶,降解牛奶中的酪蛋白成蛋白陈,有透明或半透明状液体。

凝固 有些酵母能发酵牛奶中的乳糖,使牛奶凝固和石蕊变红色。有些酵母能产生凝乳酶使牛奶中的酪蛋白凝固,石蕊不变色或呈蓝色。

6 皮肤癣菌鉴定试验培养基

6.1 米饭培养基试验

用途 用于鉴别非典型的羊毛状小孢子菌和奥杜盎小孢子菌。还能促进许多皮肤癣菌产生孢子,有助于鉴定。

试验方法 ①将待鉴定菌种接种于米饭培养基上,置 25℃ 培养。8~10 d 后检查菌落形态和镜下特征。②奥杜盎小孢子菌在米饭培养基上无生长或仅在接种处的米饭上有棕色变色。羊毛状小孢子则生长快而茂盛,产生淡黄色色素,有典型的大分生孢子产生。

米饭培养基的配制 ①大米 8 g、蒸馏水或自来水 25 mL,置于 125 mL 的烧瓶中。也可根据 1 g 米、3 mL 水的比例,使用平皿、试管等容器。②高压灭菌,121℃ 6.8 kg (15 磅) 15 min,冷却后备用。③贮藏于 4℃,有效期为 30 d。

6.2 玉米粉吐温琼脂试验

用途 典型的红色毛癣菌在沙氏琼脂培养基上有深红色的色素,但许多菌株在初代培养的沙氏琼脂培养基上却不产生这种色素。含 0.2% 葡萄

粉玉米粉吐温琼脂的培养基能促进红色毛癣菌产生深红色色素,而其他常见的皮肤癣菌则无这种现象,所以可用于红色毛癣菌的鉴别。玉米粉吐温琼脂如不加葡萄可用作念珠菌鉴定的小培养,以促进白念珠菌假菌丝和厚壁孢子的形成,也会促进暗色孢科真菌孢子的形成。

试验方法 将待鉴定菌接种于玉米粉吐温琼脂斜面上,置 25℃ 培养,每周检查结果,连续培养 4 周。菌落有深红色色素产生判为阳性,表示待鉴定菌种为红色毛癣菌。若 4 周后仍为无色或仅为淡黄色及棕色,判为阴性,不是红色毛癣菌。土生性毛癣菌在此培养基上也会产生红色色素,应注意鉴别。

玉米粉吐温琼脂 成分:玉米粉 50 g、葡萄糖 2 g、琼脂 15 g、吐温-80 10 mL 加蒸馏水 1 000 mL。**配制方法:**将玉米粉倒入 1 000 mL 蒸馏水中,混合均匀。高压 121℃,6.8 kg,10 min。用 2 层纱布过滤后,蒸馏水补足 1 000 mL。加入琼脂、葡萄糖、吐温-80 后加热至沸。高压灭菌后分装试管置斜面,冷却后冰箱保存。试管斜面有效期为 30 d,平皿为 14 d。

6.3 皮肤癣菌营养试验 (dermatophyte nutritional test)

用途 一些皮肤癣菌在生长过程中需要特别的营养,这种特性可用于一些种的鉴定。

试验方法 将待鉴定菌种接种于毛癣菌营养琼脂培养基上,每管的接种量应尽量相等,另外接种 1 管沙氏琼脂作为对照;全部斜面置 25℃ 培养 2 周,若仍无结果可继续培养 2 周,或培养至沙氏琼脂培养基对照管的菌落生长良好为止,最多 6 周。以沙氏琼脂培养基作对照,检查菌落生长情况,比较菌落的大小。无生长为阴性,其他以 + ~ + + 表示。

毛癣菌营养琼脂培养基 (trichophyton test medium) T1:酪蛋白(酸解、无纤维素)2.5 g、葡萄糖 40 g、MgSO₄·7H₂O 0.1 g、H₂PO₄ 1.8 g、琼脂 15 g、加蒸馏水 1 000 mL。T2:T1 加 50 mg 肌醇。T3:T1 加 50 mg 肌醇、200 mg 维生素 B。T4:T1 加 200 mg 维生素 B。T5:T1 加 2 mg 烟酸。T6:NH₄NO₃ 1.5 g、葡萄糖 40 g、MgSO₄·7H₂O 0.1 g、KH₂PO₄ 1.8 g、琼脂 15 g、加蒸馏水 1 000 mL。T7:T6 加 30 mg 组氨酸。

配制方法 营养液 I 号:维生素 B 1 mg 加蒸

馏水 10 mL。营养液 II 号:肌醇 250 mg 加蒸馏水 10 mL。营养液 III 号:烟酸 10 mg 加蒸馏水 10 mL。营养液 IV 号:组氨酸 150 mg 加蒸馏水 10 mL。按配方配制 T1 和 T6,然后按要求加入营养液 I ~ IV 号,每种成分需 2 mL 营养液,即成 T1 ~ T7,高压灭菌后分装试管。

6.4 DTM 试验

用途 DTM 为一选择培养基。98% 的皮肤癣菌能使 DTM 由酸变碱,培养基 1 周内由黄色变为红色,其他真菌则相反。所以 DTM 要用于皮肤癣菌的筛选。DTM 中应含放线菌酮和抗生素,以抑制常见霉菌和细菌的污染。

DTM 的成分 葡萄糖 10 g,蛋白胨 10 g,琼脂 20 g,酚红(0.5%水溶液)40 mL,放线菌酮 0.5 g,硫酸庆大霉素 10 万 U,盐酸金霉素 10 万 U 加 0.8 mol/L HCl 6 mL,蒸馏水 1 000 mL。

配制方法 将蛋白胨、葡萄糖和琼脂加入 100 mL 蒸馏水中混合均匀;置文火加热并不断搅动直至全部溶解;趁热加入 0.5% 酚红水溶液及 HCl,不断搅动;加入放线菌酮(先溶于 2 mL 丙酮中),混合均匀;加入硫酸庆大霉素(先溶于 2 mL 蒸馏水中,混合均匀;高压灭菌 10 min;冷却至 45 ~ 50℃,置同样温度热水浴中;将盐酸金霉素溶于 25 mL 无菌蒸馏水中,加入培养基,不断搅动混合均匀;无菌分装后置斜面,制成的培养基呈黄色,室温下 pH 为 5.5。

实验方法 将待鉴定菌种接种于 DTM 斜面上,另接 1 管沙氏琼脂作为对照置室温培养 1 周。1 周内 DTM 斜面上有菌落生长,且菌落周围呈红色为 DTM 试验阳性,表示待鉴定菌种有 98% 可能为皮肤癣菌。DTM 斜面和沙氏琼脂斜面都有菌落生长,如果 DTM 斜面无颜色改变,待鉴定菌种不是皮肤癣菌。若只有沙氏琼脂斜面上有菌落生长,也说明待鉴定菌种不是皮肤癣菌。

有些皮肤癣菌在 DTM 培养基上颜色改变较慢。此外,一些非皮肤癣菌的霉菌在 1 周内也有可能引起 DTM 的颜色改变,应注意鉴别。这些菌是顶孢霉、皮炎芽生菌、甄氏外瓶霉、裴氏着色真菌、荚膜组织胞浆菌、波氏霉样菌、疣状瓶霉、共头霉、金孢子菌、申克孢子丝菌、轮枝孢等。DTM 试验必须在 1 周内观察颜色的改变,因为绝大多数能在 DTM 培养基上生长的真菌最终都能使 DTM 变成红色。

6.5 皮肤癣菌尿素酶试验 (urease test)

用途 用于鉴别须癣毛癣菌和红色毛癣菌。98.2% 的须癣毛癣菌能在 7 d 内使尿素琼脂由黄变红,产生阳性反应,红色毛癣菌则为阴性。

方法 培养基使用尿素琼脂,但葡萄糖浓度为 5%。接种后置 25℃ 培养,另接 1 管须癣毛癣菌作为阳性对照。

7 双相型真菌鉴定试验培养基

7.1 菌丝相转化为酵母相 (mould to yeast conversion)

①培养基用 BHIA 斜面,沙氏琼脂培养基作为对照。②分别接种待鉴定菌种。③BHIA 培养基置 37℃,最好在含 10% 的二氧化碳培养箱中培养,对照的沙氏琼脂培养基置室温培养,共 4 周。每周检查菌落和镜下形态。④若 37℃ 培养为酵母相,25℃ 培养为丝菌相,应使酵母相再恢复为菌丝相,即可最后确定待鉴定菌种为双相型真菌。若 37℃ 和 25℃ 培养均为菌丝相,应将菌种连续移种 3~4 次,每次间隔约 1 周,各置 37℃ 和 25℃ 培养并观察菌落及镜下形态。若仍为菌丝相,判为阴性。仍高度怀疑为双相菌的菌株应进行动物接种。⑤多数皮炎芽生菌、副球孢子菌、孢子丝菌及马尔尼菲青霉容易自菌丝相转化成酵母相,但许多荚膜组织胞浆菌转换困难。⑥粗球孢子菌需用特殊培养基。

7.2 酵母相转化为菌丝相试验 (yeast to mould conversion)

①接种于沙氏琼脂斜面。②将斜面置室温培养 1 周或更长时间直至菌落形成,检查菌落形态和镜下形态,如为菌丝相生长判为阳性。

7.3 粗球孢子菌双相转化试验 (mould to spherule conversion)

①全部操作均应在隔离罩中或超净工作台上进行,因为粗球孢子菌菌丝相的关节孢子具高度感染性。②粗球孢子菌在普通培养基室温培养为菌丝相,镜下可见关节菌丝和关节孢子。挑取少量这种菌落接种于球囊培养基上。③置含有 20% 二氧化碳的培养箱中 40℃ 培养,或置玻璃缸内,点燃蜡烛后密闭,待其自然熄灭后连缸一起置 40℃ 培养。自培养后第 5 天开始检查。④每次检查取斜面一支,高压灭菌或加入福尔马林液 5 mL 置 37℃ 24 h 后开启,挑取菌落做镜下检查。⑤镜检应见球囊即内孢囊内含大量内孢子。注意其他一些真菌也能

产生大的囊形结构极似球囊但不含有内孢子。⑥若镜下发现球囊和内孢子,即挑取未经杀灭的含球囊和内孢子的菌落移种于沙氏琼脂培养基上置 25℃ 培养,数天后检查。如菌落又恢复成菌丝相且镜检见关节菌丝和关节孢子,试验结果判为阳性,说明待鉴定菌种为粗球孢子菌。⑦本试验一律采用试管培养,每批至少同时接种 4 管,以便连续检查。⑧球囊培养基:葡萄糖 4.0 g、NaCl 0.014 g、醋酸铵 1.53 g、CaCl₂ 0.002 g、KH₂PO₄ 0.5 g、Tamol 0.5 g、K₂HPO₄ 0.52 g、NaHCO₃ 0.012 g、MgSO₄ 0.4 g、琼脂 15.0 g、ZnSO₄ 0.02 g、蒸馏水 1 000 mL。将上述各成分混合均匀,加热至沸溶解。高压灭菌后分装置斜面。

7.4 放线菌酮耐受试验

不同真菌对放线菌酮的耐受性不同,有些菌生长被抑制而有些菌具耐受性并能生长,故放线菌酮耐受试验可作为真菌鉴定的依据之一。若将放线菌酮配制于培养基中,可选择性地抑制一些真菌的生长,使分离的菌种纯化。

荚膜组织胞浆菌和皮炎芽生菌 25℃ 培养时能耐受放线菌酮,而在 37℃ 时则被放线菌酮抑制。

①配制沙氏琼脂培养基含 0.5 mg/mL 放线菌酮或含氯霉素 0.05 mg/mL 和放线菌酮 0.5 mg/mL。接种待鉴定菌种,以不含放线菌酮的沙氏琼脂培养基为对照。②置室温培养,一般酵母培养 4~5 d,霉菌为 4 周。③结果判定:若在 2 种培养基上真菌都能生长,说明待鉴定菌株能耐放线菌酮;若试验管比对照管生长差,甚至没有生长,说明待鉴定菌株对放线菌酮敏感,不能耐受。

对荚膜组织胞浆菌和皮炎芽生菌还应加试 37℃ 培养。

7.5 毛发穿孔试验 (hair penetration test *in vitro*)

用途 主要用于鉴别红色毛癣菌和须癣毛癣菌。须癣毛癣菌能使毛发形成楔形缺损,红色毛癣菌则没有这种穿孔能力。毛发穿孔试验也用于其他一些皮肤癣菌的辅助鉴定。毛发穿孔试验阳性的皮肤癣菌所引起的头发感染可能时发内型的,也可能是发外型的。实验所需的头发无性别、年龄和人种的差别,但一般选用儿童的头发,因为较少含有洗发、染发所残留的化学物质。

方法 取一束清洁头发,剪成 1 cm 长短,置于已加入 25 mL 蒸馏水和 2~3 滴 10% 酵母浸膏的平皿中,高压灭菌,121℃ 6.18 kg (15 磅) 10 min。平

皿中加入 25 mL 无菌蒸馏水和 2~3 滴 10% 无菌酵母浸膏。将待鉴定菌种接种于发干上,置 25℃ 培养 4 周。每周检查 1 次。每次取数根头发,置载玻片上,加一滴乳酸酚棉蓝。稍加热,但不得破坏头发结构。然后置低倍镜下检查。若发干上有与发

轴垂直的楔形缺损为阳性,否则判为阴性。

[收稿日期] 2010-06-15

[本文编辑] 卫凤莲

· 消息 ·

黄山归来不看岳,华山归来究真菌 ——“医学真菌进展学习班”散记

安徽中医学院第一附属医院皮肤性病实验室 刘小平

2010 年 9 月 9 日下午我乘车去黄山市华山宾馆,参加由第二军医大长征医院皮肤科主办的《医学真菌进展学习班》。18:00 多到达,匆匆吃完晚餐便马不停蹄赶往会场。20:00 温海教授准时开讲。在短短 2 小时内我了解了真菌的命名、分类,知道真菌名后缀 .sp 为属,.ver 为变种,.never 为新变种,知道了利用曲霉头、帚状枝及足细胞等特征性结构以及菌丝的夹角是 45°角还是直角初步判断菌种。这些知识点对初学者及非专业人士起到了抛砖引玉的作用,对专业人士有提高知识层次和研究能力的作用。

9 月 10 日廖万清院士给我们讲医学真菌研究进展情况,展示了他及他的团队勤奋努力、打破砂锅问到底的精神及取得的累累硕果。在精神和学术上给我们树立了榜样。非常年轻的教授朱红梅给我的印象很深刻,她讲了许多她亲自处理的临床病例,从简单的真菌镜检、真菌培养形态鉴定、真菌病理到真菌影像学等都一一娓娓道来,并不时地提问互动。更为了不起的是作为临床医生她能教大家纯实验技术,如何调整显微镜光的强弱使直接镜检更加清楚。

9 月 11 日陈江汉教授给我们授课,解决了很多困惑我的问题。如总有人把真菌分为皮肤癣菌、丝状菌和酵母菌,我曾为这问题问了不少学者,没有让我信服的答案。他讲课的幻灯片将真菌分为皮肤癣菌、其他丝状菌和酵母菌,并给予详尽的解释。对于念珠菌究竟是不是双相菌,他给出了肯定的答案,念珠菌有四个不同的阶段包括孢子、芽生孢子、假菌丝和真菌丝,37℃ 情况下只有孢子,25℃ 可产生菌丝,符合双相菌的特征。我还知道了臀部、手足、甲等身体部位的真菌感染不能都称癣,只有皮肤癣菌感染的才能称癣,热带念珠菌就是酿酒酵母菌,星型念珠菌 II 实际上是白念珠菌的变种。

这次学习班受益匪浅,不能一一列举。我会像真菌的孢子一样把你们传授的知识传播开去。仅以《黄山归来不看岳,华山归来究真菌》随感,感谢所有老师的付出。