

厌氧菌的两种简易培养方法

——铁丝圈厌氧法与催化剂厌氧法

朱匡速 董国宾

(遵义医学院, 贵州遵义)

现在临床标本中的厌氧菌主要是革兰氏阴性杆菌、阳性球菌和阳性无芽孢杆菌等^[1]。为解决这些菌分离培养的难题, 我们参考国外资

料, 发展出两种简单有效的厌氧培养法, 现报告如下。

一、铁丝圈厌氧法

先培养厌氧菌有用铁丝绒和钢丝绒厌氧方法的^[2-4]。我们也曾用国产细钢丝绒,得到良好效果。但钢丝绒不能重复使用,供应也不普遍,所以又改用铁丝。

(一) 器材与试剂

1. 培养罐: 用玻璃真空干燥器。

2. 铁丝圈: 该圈作除氧剂使用。取细铁丝(#22或更细些的市售铁丝或镀锌低碳钢丝——俗称铅丝)绕成连续而紧密的螺圈。直径以7—8mm, 每条长10—20cm为宜。使用前用稀盐酸洗净铁锈,可重复使用数十次。一个3.5L的真空干燥器约需#22铁丝绕成的圈800—1000g。临用前将已去锈的铁丝圈浸没于用浓硫酸酸化到pH1.5—2.0的1.5%硫酸铜溶液中,再加入吐温80(最后浓度约为0.1%)。每500g铁丝圈约需用硫酸铜溶液1000ml。浸后,铁丝圈变成赤铜色,极易氧化(呈黑色),用前从硫酸铜溶液中取出,稍沥干后速置入罐内。

3. 厌氧指示剂: 同时在培养罐中放入两种指示剂:(1)亚甲蓝-巯基乙酸-硼砂琼脂半固体指示剂^[7],隔水煮沸呈浅红色后放入。培养期间琼脂应保持浅红色(如酚红的颜色),如恢复为亚甲蓝的颜色,则表明厌氧失败。这种试剂的配制虽比常用的碱性美蓝葡萄糖溶液复杂,但是可以反复使用多次;(2)绿脓杆菌接种于西蒙氏枸橼酸盐琼脂斜面2支,1支培养物同时置入厌氧罐内培养,另1支置罐外培养作对照。此菌在罐内的斜面上应不生长,培养基保持绿色。如有生长,斜面变成蓝色,说明厌氧失败,用这种菌作厌氧指示剂比用厌氧菌更灵敏、方便^[6]。

4. 二氧化碳: 由高压钢瓶灌入较好。如无此条件,也可用化学试剂使在罐内产生。每升容积用枸橼酸0.3g,和碳酸氢钠1g,混匀,用吸水纸包好,置于罐底,水浸后即生出二氧化碳。浓度最高约为9.0±3.5%,随培养时间延长,浓度会逐渐降低。

(二) 装置方法

培养罐置37℃温箱中预热。装置次序是:罐底置入用于发生CO₂的药品包,再放入刚从

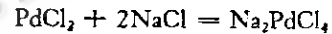
硫酸铜溶液中取出的铁丝圈,上面放置接种好的平皿或试管,在靠近管壁的空隙处置入指示剂管,迅即加盖封固(干燥器的活塞及盖缘需涂真空脂)。加盖前还可在罐内空隙处点燃一小段蜡烛(熄灭后,氧浓度降至17%)^[7]。培养2.5—4小时后,指示剂表层的蓝色应全退去,如有加深,说明漏气,应及时检查。培养24小时后,罐内形成100—150mm汞柱的负压。

二、自制钯(铂)冷催化剂厌氧法

钯“冷”催化剂系国外专利,能在常温下催化氢与氧化合成水,用于厌氧罐除氧既方便又安全。这是现在国外普遍采用的方法。我们参照这一作法,用较简单的方法自制成功。将作炊具的压力锅改装后用作厌氧培养罐,并用药品在罐内反应产生CO₂和H₂,与这种催化剂一起使用,结果良好。

(一) 催化剂制法

1. 钯催化剂: 先将氯化亚钯制成氯化钯钠(Na₂PdCl₄)溶液。化学反应式如下^[4]:



例如制备钯浓度为1%的氯化钯钠溶液50ml,可称取PdCl₂0.8322g(含钯约0.5g),NaCl0.5492g,加入50ml蒸馏水中加热即成。

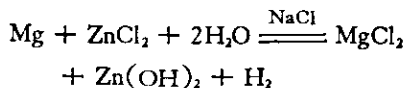
取硬硅胶粒50g,置入150ml1%NaHCO₃溶液中,再加吐温80数滴,稍煮后将硅胶滤出,用水稍加冲洗。然后,按每克硅胶加1ml氯化钯钠溶液(含钯约10mg)的比例缓缓加入。这时硅胶成为黑色。为还原硅胶粒上附着的钯,将其放入5%甲酸水溶液中煮沸,滤干,最后在160℃烘箱中干烤2小时即成。载体也可用高强度活性氧化铝小球(温州化工厂出品,φ3—5mm),比硅胶更耐用。制备时将其加在吐温80的水溶液中煮沸即可(不必加NaHCO₃),每克小球加0.5ml的氯化钯钠液(相当于钯5mg),其它步骤同硅胶粒。

2. 铂催化剂: 取活性氧化铝小球10g(约190粒),加入蒸馏水中,再加几滴吐温80,一起煮沸后,倾去液体,沥干。称取氯化铂钾(K₂PtCl₆)100mg溶于10ml热水中,然后放入处理过的小球,一起加热至沸。再把小球置入

5% 甲酸钠溶液中煮沸。最后在 160℃ 烤干 2 小时。

(二) 使用方法

用细铜丝网(或不锈钢丝网)做成一个四边折合的小袋,将催化剂 10g 严密包好,外面再套上一个同样的小袋,用时悬挂在罐盖内。所需氢气可用化学法在罐内生成^[9]。



称取镁粉 7.5g, ZnCl₂ 1.5g, NaCl 3.7g, 在研钵内轻轻磨匀,置一小三角瓶中放入罐内。盖严后用细胶管向瓶内注入 50ml 水(胶管一端伸向瓶内,另一端通过盖上的小孔达到罐外)便立即有氢生成,迅即以止血钳将胶管夹住。这时罐温升高。试剂反应完全后可产生 4,000ml 的氢。在 5 L 罐中,培养期间可保持 1kg/cm² 的正压,能避免空气漏入。如罐容积小,试剂量可酌减。

压力锅改装厌氧罐的方法很简单:用 20cm 直径的双喜牌压力锅,卸下阀座与易熔塞,在两个孔上各安装一个自行车气门嘴,套上一段厚壁胶管,用止血钳夹紧。原有的密封圈予以保留,盖好后,边缘再加 6 个螺栓,夹紧即成。

催化剂每次用后置 160℃ 烤箱中烤 2 小时,使之活化。不用时应贮存在干燥器内。

三、效果考察与讨论

以上两种方法均以绿脓杆菌不生长和亚甲

兰琼脂半固体退色作为厌氧常规指标。此外又在平板上培养破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、丁酸梭菌 (*C. butyricum*)、丙酮丁醇梭菌 (*C. acetobutylicum*)、巴氏梭菌 (*C. barkeri*)、乳酸乳杆菌 (*Lactobacillus lactis*)、保加利亚乳杆菌 (*L. bulgaricus*) 等均生长良好。并且用此厌氧法成功的从成人粪便中分出了拟杆菌属 (*Bacteroides*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 及真杆菌属 (*Eubacterium*) 的厌氧菌。如此证明了这两种方法可用于严格厌氧菌的培养。

参 考 文 献

- [1] Finegold, S. M.: *Anaerobic Bacteria in Human Disease*, Academic Press, New York, p. 71, p. 76, 1976.
- [2] Parker, C. A.: *Aust. J. Exp. Biol.*, 33: 33—38, 1955.
- [3] 东量三, 扇元敬司, 须藤恒二: 日本细菌学雜誌, 17: 802—806, 1962.
- [4] Atteberry, H. R. and S. M. Finegold: *Am. J. Clin. Path.* 53: 383—388, 1970.
- [5] Willis, A. T.: *Anaerobic Bacteriology*, 1st ed., Butterworth, London, pp. 12—14, 1960.
- [6] Gargan, R. A. and I. Phillips: *J. Clin. Path.* 31: 426—429, 1978.
- [7] Meynell, G. G. and E. Meynell: *Theory and Practice in Experimental Bacteriology*, 2nd ed., Cambridge University Press, London, p. 74, 1970.
- [8] Брауер, Г. (G. Brauer): *Руководство По Preparативной Неорганической Химии*, Изд. Иностранной Литературы, Москва, стр. 725, 1955.
- [9] Brewer, J. H. and D. L. Allgeier: *Science* 147: 1033—1034, 1965.