

在厌氧菌中, 有一类是近年来在理论和实践上日益引起重视的专性厌氧菌。目前认为, 主要由于在其体内缺乏超氧化物歧化酶(super-oxide dismutase, SOD)去分解有毒的氧化产物, 故即使短暂地把它们暴露于空气中, 也会引起损伤致死^[1]。因此, 对它们进行分离、培养和研究时, 就必须有一套相应的技术和装备。

一种理想的厌氧培养法, 应满足三项基本要求^[2]: (1)在制备培养基的过程中, 氧的接触不致形成对微生物有毒的氧化产物; (2)在接种与培养时, 能避免培养物接触氧气; (3)整个培养系统始终能维持一个有利于厌氧菌生长繁殖的低氧化还原势。

厌氧培养的方法很多, 其中最具有代表性和应用最广的, 当推厌氧罐(anaerobic jar)技术。

厌氧罐的原理十分简单, 即采用某种方法(如氢或磷的“燃烧”去氧法, 用氮驱氧法, 焦性没食子酸吸氧法或生物耗氧法等), 去除密闭培养罐中的氧, 从而为厌氧菌创造一个合适的生长繁殖条件。其中获得迅速发展的是利用氢“燃烧”去氧的方法。McIntosh 和 Fildes^[3]最早应用此法于厌氧培养罐中。此后, 在氢源的提供, 催化剂的改进, CO₂ 的加入, 厌氧度指示剂的应用以及罐型的革新等方面, 都取得一系列的成就。目前, 厌氧罐培养技术已成为厌氧菌研究中一种不可缺少的装备。下面从四个方面来简介有关的研究概况。

氢和二氧化碳的供应

供氢是厌氧罐技术的最基本要求。在供氢过程中, 适量的 CO₂ 不仅对任何厌氧菌无不良影响, 而且还可促进某些革兰氏阴性厌氧菌的生长, 提高检出率^[4]。因此, 在供氢的同时, 加入 5—10% (V/V) 的 CO₂, 已成为厌氧罐技术中的常规方法了。

氢和 CO₂ 的来源都经历了一个从外源到内源的发展过程, CO₂ 的提供方式一般随氢来源的不同而异。

一、外源氢和 CO₂^[5]

可以由启发生器供应。如使用 25% 硫酸与锌反应产氢, 则须通过 10% 醋酸铅溶液和 10% 硝酸银溶液这样两个洗气瓶, 以除去 H₂S 和砷化物, 保护催化剂, 还可通过气泡来估计气体的流速。

现在更多的是使用钢瓶。如利用球胆、麻醉袋或呼吸瓶系统作为低压氢源, 则更为方便。减压后的氢也可通过洗气瓶后再入罐。

外源氢的使用方式基本上有两种, 都要求有相应的罐型设计、催化剂和一些辅助设备。

1. 直接法: 早期出现的使用“热式”催化剂的罐多用直接法加氢。例如, McIntosh 和 Fildes 罐就是让氢在 5 磅/吋² 压力下直接进罐的^[6]。

2. 真空取代法: 即抽气换气法^[7]。这是目前普遍使用的一种加氢方法, 它对“热式”或“冷式”催化剂都适用, 并可配合外源 CO₂ 的加入, 但需使用真空泵或“室内真空系统”及“U”型水银气压计、气压表等辅助设备。应用此法先将罐抽真空再补入氢或 CO₂, 如此重复二至四次, 最后充入氢气和适量的 CO₂, 即可培养厌氧菌了。

二、内源氢和 CO₂

这是一类利用放入罐内的化学试剂发生反应而自行产氢和 CO₂ 的方法。它省略了钢瓶、阀门和测压计等附件, 使用时既方便又安全。产氢反应主要有以下两种:

1. 利用氢硼化钠(或氢硼化钾)与水反应产氢^[8]: 使用 0.6g NaBH₄ 和 40ml 水反应, 并以 0.2g CoCl₂ 作催化剂, 可缓缓产生大量氢(半小时内约产 500ml, 1 小时约可产 1250ml), 足以满足一个容积为 2500ml 的厌氧罐的需要。如让上述试剂在试管中发生反应, 可加入少量辛醇消泡。

2. 利用镁与氯化铵反应产氢^[9]: 用外镀铝膜的聚乙烯制成套袋, 两端各嵌入一片滤纸, 并在其对角线处热封, 使之形成两个体积相等的小隔。取 5g 镁粉, 2.5g NaCl 和 1g ZnCl₂, 充分研细混合后, 用吸水纸包裹, 放入下半隔袋中。使用时, 剪去袋的一个上角, 注入 10ml 水至上隔中, 使之通过吸水纸而缓缓流入下隔中, 约经 1 分钟后, 就有氢慢慢放出。在最初 35 分钟内产 1400—1800ml, 至 4 小时末时, 可达 2000ml。

产 CO₂, 一般是利用碳酸氢钠加柠檬酸, 也有用碳酸氢钠加碳酸镁的。

利用以上原理设计的 H₂-CO₂ 产生袋早有商品生产。如“GasPak”、“Gaskit”和“Gas Generating Kit”等。但是, 某些产气袋(如“GasPak”)有一个明显缺点, 即 CO₂ 的产量不很稳定, 且有时变化幅度相当大^[10]。原因可能是: (1)产氢片的碱性残余物污染了 CO₂ 片; (2)碱性的 NaBH₄ 残余会吸收 CO₂, 以致造

成在培养后期 CO_2 大量被吸收,因此,建议加入 KH_2PO_4 来中和产氢片。总之,当遇到要求严格控制罐内气体浓度的实验时,使用这样的内源 CO_2 就不太合适。

“Gaskit”是用柠檬酸活化的,所以不仅保证不污染产 CO_2 片,而且在反应结束时,其残余物的 pH 还略带酸性^[1]。

此外,在 Marshall^[11] 的工作中,曾利用金属锌粒与含有硫酸铬的硫酸作用产氢并吸氧,而用粉状 CaCO_3 与 H_2SO_4 作用以产生 CO_2 (每升容器中放 0.23g CaCO_3 ,即可产约 5% [V/V] 的 CO_2)。

催 化 剂

利用氢的“燃烧”除氧时所使用的催化剂,一般是铂或钯。据在使用时是否需直接加热活化,可分为“热法”和“冷法”两种。

一、热法

热法催化剂基本上都用铂化或钯化石棉。早期曾采用煤气灯灼烧活化法,如 Wright 催化剂。以后改为电热法,它具有在厌氧罐的使用过程中始终保持催化活性的明显优点。由于严格按 Dary 安全灯原理设计催化器的结构,并改进了罐体材料,故这种厌氧罐的安全性大为提高。其具体设计形式多样,较新的装置可参阅文献 12。

二、冷法

1933 年, Eggerth 等^[13]发现松散的、呈碎片状的钯化石棉丝,无需加热就有催化活力。Weiss 等^[14]首先配合真空取代操作将它应用于厌氧罐中。以后, Heller 提出用钯粉包裹的小铝丸制成常温催化剂,并随即投入商品生产,名为“除氧丸”(Deoxo pellets)或“冷催化剂 D”。Watt^[4]提出,在 BTL 罐中放置 2—3 个催化剂网袋或在网袋中增加“D”催化剂的用量,均可提高工作效率,因此,以后就有比原来多装四倍催化剂的网袋出现^[15]。

在微生物培养过程中,由于会产生大量水分和一些有毒物质(H_2S 和砷化物等),故“D”催化剂在每次使用后都应加热活化(160—170℃, 2 小时)。

由于冷催化剂具有简便、安全和有效等优点,因此早被广泛地应用了。

厌氧度的指示

厌氧罐中设法指示出厌氧度是极其必要的。常用的有化学、物理和生物三种方法,也有将几种方法结合在一起使用的。

一、化学指示剂

最广泛应用的化学指示剂是美蓝,其氧化态为蓝色,还原态为无色。

1. Fildes 和 McIntosh 指示剂:这是一种早年设计并被广泛应用的指示剂,其成分为: A. 6ml 0.1N NaOH 用蒸馏水稀释至 100ml; B. 3ml 0.5% 美蓝水溶液用蒸馏水稀释至 100ml; C. 6g 葡萄糖用蒸馏水稀释至 100ml (其中可加少量麝香草酚结晶作防腐剂)。使用前,将以上三种原液在试管中等量混和,沸水浴加热使成无色,立即应用。它适用于透明的玻璃罐或聚碳酸酯罐。

2. 美蓝半固体指示剂:文献中有 Marshall^[11] 和 Lucas^[16] 两种配方。

3. 袋装美蓝指示剂:原由 Brewer 等人设计^[17]。现国外一种称为“BBL”的指示袋商品系由含果糖 1.8%, KH_2PO_4 1.53%, NaOH 0.35% 和美蓝 0.025% 的水溶液吸在厚滤纸上制成,适用于各种透明罐型中。

此外,有的报道也用刃天青(resazurin)等氧化还原势指示剂加入培养基中,以指示其厌氧度^[18]。

二、物理指示法

对于一些不透明且不带侧臂的罐型来说,罐内厌氧条件的建立主要通过其中气压有规律的变化而显示的。若使用“GasPak”等内源氢,罐内的气压一般有“正—负—正”^[19,20]或“上升—下降”^[21]的变化。若使用真空取代操作,则在加氢后,很快(约在 10 分钟内)会出现“第二次负压”^[20],这是氢与氧化合的结果。如果使用高真空多次换气,则这个负压变化只有约 20mmHg,常用“U”型水银气压计来显示。

此外,由于氢和氧的化合是放热反应,并有水形成,因此在充氢后数分钟,用手摸罐盖如不觉得发热,或经 30 分钟后透明罐的内壁上无冷凝水产生,都说明厌氧条件未能建立。

三、生物指示法

利用生物指示法,可以发现厌氧罐中是否存在非常缓慢而微小的漏气现象。具体方法很多。Gargan 等^[22]报道了一套十分灵敏的生物指示系统,它由三种指示菌构成:(1)培养在 Simman's 柠檬酸盐琼脂培养基上的好氧菌——绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。它有两个优点:一是在有氧条件下该菌生长良好,而在无氧条件下绝对不长;二是即使有极少量的生长,也可从培养基由绿变蓝而指示出来。(2)高度严格厌氧菌——产黑素拟杆菌非解糖亚种(*Bacteroides melaninogenicus* subsp. *saccharolyticus*)。(3)较不严格的厌氧菌——脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)。利用这一指示系统可以知道受检罐的厌氧度。

罐 体 类 型

罐型的变化基本上随着氢源和催化剂的改进而向着安全有效、使用简便和商品化的方向发展的。

一、电热式厌氧培养罐

这是直接从早期的 McIntosh-Fildes 罐的基础上发展起来的一类罐型。后经 Brown^[6]、Brewer^[23] 和 Evens^[44] 等人的改进,故文献上有时也称为 Brown 罐或 Brewer 罐。其共同特点是:(1)除早期型外,都使用电热(一般为 12V)钽化石棉丝作催化剂;(2)在盖上配有阀或通气管,适合使用外源氢(也可改用内源氢);(3)罐体一般是钢制的。

二、“冷式”厌氧培养罐

1. 外源氢型(都可使用内源氢):如 Tobal 罐和 BTL 罐(图 1),它们都是钢制的罐体,罐壁上有一个按指示剂玻管的侧壁。有的罐还装有压力表(如“Tobal”)。由于侧管易漏气失效,故 Burt 等^[23]创制了一种不带侧管的“Don Whitley”厌氧罐,其特点是:(1)罐体用抗腐蚀的铝合金铸成,内外敷以环氧树脂。

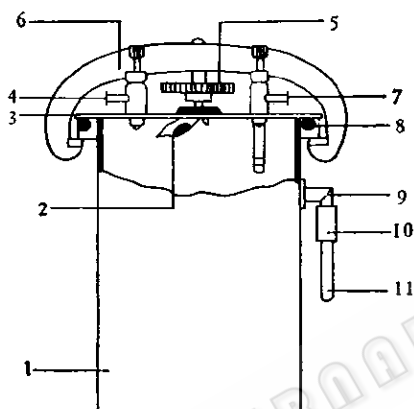


图 1 BTL 厌氧罐^[16]

1.罐体 2.催化剂袋 3.罐盖 4.真空阀门 5.螺旋 6.夹子
7.通气阀门 8.O 环 9.侧臂 10.橡皮套管 11.指示剂管

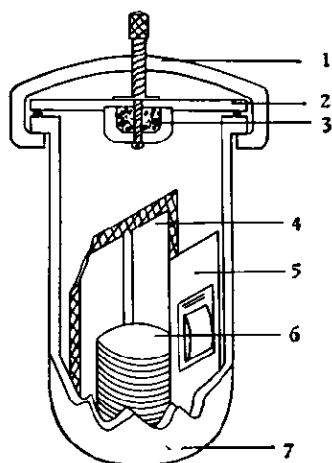


图 2 GasPak 厌氧罐^[19]

1.螺旋夹 2.罐盖 3.催化剂丸 4. H_2-CO_2 产生袋 5.厌氧度指示剂 6.培养皿 7.玻璃罐体

盖子周围有凸缘,可嵌入“O”环使之密闭。盖子呈圆穹形,其下可装催化剂网袋而不占空间。全罐可放 11 个标准(9cm)培养皿。(2)使用飞机轮胎上的 Schrader 阀以代替针阀,用夹头(chuck)开闭,十分方便。(3)用不锈钢丝制的双联网袋(twin capsules)装 4g 催化剂,故催化效率极高。

2. 内源氢型:这类罐是适应使用内源 H_2-CO_2 产生袋如“GasPak”等袋而设计的。罐体由透明的聚碳酸酯制成,罐口有“O”环密闭。“D”催化剂均装在盖下。使用时,罐内放入产气袋和美蓝指示袋。这类装置一般就称为“GasPak”罐(图 2)。它在美国的临床实验室已普遍使用,主要优点是轻便、简单、安全和便于观察;其缺点则是气体成分不够稳定,罐内过于潮湿等。

3. 装配式厌氧培养器:为适应野外和实验室工作的需要,Brewer 等设计了一种装配式厌氧培养器^[24]。这一外壁由三层不同塑料膜和可褶皱的涂蜡硬纸板制成的装置,集中了上述多种设计的优点,特别是结构简单、附属装置少、外形适当可变、安全防爆、可褶皱保藏、轻便(装满 8 个培养皿后还不足半公斤)耐用(可重复使用 30 次以上),且经多种厌氧菌的培养试验后,证明性能良好,故是一种简便易行的小型厌氧培养装置。

4. 利用压力锅改制厌氧罐:Gargan 等^[22]曾提出过一种改装压力锅(6—8L)的方法:(1)在排气口上接一段橡皮管,并用夹钳夹住;(2)把安全阀换成橡皮塞子塞紧;(3)用 39 号不锈钢网制成 80 目催化剂网袋,内装 10 克“D”催化剂,或放入三个“BTL”催化剂网袋,并用一金属带栓在排气孔的下方。

5. 厌氧袋:性能与厌氧罐相似。国外的商品名为“Bio-Bag”,为一透明的不透气塑料袋,内装产气安瓿和指示剂安瓿。可于 1.5 小时内建立厌氧条件,并能保持一周。上海第一医学院吴怀瑛、陈聪敏等^[27]设计了与此类似的厌氧袋。

近年来,由于在厌氧菌的研究中多种厌氧技术普遍应用,使得设备简繁、价格高低、操作难易与分离培养效果优劣间的矛盾突出起来,因此促使不少学者对有关技术作了一些比较研究^[5,20]或总结^[11]。结果指出,厌氧罐方法对常见医学上重要厌氧菌的分离培养是合适的。

厌氧罐培养技术自 1916 年间世至今,已有六十多年的历史,其间大体经历了一个简便化、高效化、安全化、规格化和商品化的演变过程。为了更好地适应对厌氧菌的生理、生化和生态研究的需要,厌氧罐的结构还在向多功能化和系列化的方向发展。

参 考 文 献

[1] Morris, J. G.: The Physiology of Obligate Anaer-

- robiosis, *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 12, (ed. by A. H. Rose and D. W. Tempest), Academic Press, London, 1975, pp. 169—233.
- [2] Pelczar, M. J. and E. C. S. Chan: *Laboratory Exercises in Microbiology*, 4th edition, McGraw-Hill Inc., New York, 1977, pp. 111—113.
- [3] McIntosh, J. and P. Fildes: *The Lancet*, 190: 768—770, 1916.
- [4] Watt, B. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 77: 447—454, 1973.
- [5] Willis, A. T.: *Anaerobic Bacteriology: Clinical and Laboratory Practice*, 3rd edition, Butterworths and Co. (Publishers) Ltd, London-Boston, 1977, pp. 1—18.
- [6] Brown, J. H.: *J. Exper. Med.*, 33: 677—681, 1921.
- [7] Whaley, D. N. and G. W. Gorman: *J. Clin. Microbiol.*, 5: 668—669, 1977.
- [8] Brewer, J. H. et al.: *Appl. Microbiol.*, 3: 136, 1955.
- [9] Brewer, J. H. and D. L. Allgeier: *Science*, 147: 1033—1034, 1965.
- [10] Ferguson, I. R. et al.: *J. Appl. Bact.*, 39: 167—173, 1975.
- [11] Marshall, J. H.: *J. Gen. Microbiol.* 22 (3): 645—648, 1960.
- [12] Gillies, R. R. and T. C. Dodds: *Bacteriology Illustrated*, 4th edition, Churchill Livingstone, Edinburgh-London-New York, 1976, pp. 21—26.
- [13] Eggerth, A. H. and B. H. Gagnon: *J. Bact.*, 25: 389, 1933.
- [14] Weiss, J. E. and E. H. Spaulding: *J. Lab. Clin. Med.*, 22: 726—728, 1936.
- [15] Baldwin, A. W. F.: *Med. Lab. Tech.*, 32: 329—330, 1975.
- [16] Willis, A. T.: Techniques for the Study of Anaerobic Spore-forming Bacteria, *Methods in Microbiology*, Vol. 3B, (ed. by J. N. Norris et al.), Academic Press, London and New York, 1969, pp. 79—115.
- [17] Brewer, J. H. et al.: *Appl. Microbiol.*, 14: 135, 1966.
- [18] Hungate, R. E.: A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes, *Methods in Microbiology*, Vol. 3B, (ed. by J. N. Norris et al.), Academic Press, London and New York, 1969, pp. 117—132.
- [19] Brewer, J. H. and D. L. Allgeier: *Appl. Microbiol.*, 14: 985—988, 1966.
- [20] Collee, J. G. et al.: *J. Appl. Bact.*, 35 (1): 71—82, 1972.
- [21] Ferguson, I. R. et al.: *J. Appl. Bact.*, 41: 433—437, 1976.
- [22] Gargan, R. A. and I. Phillips: *J. Clin. Path.*, 31: 426—429, 1978.
- [23] Brewer, J. H.: *J. Lab. Clin. Med.*, 24: 1190—1192, 1938.
- [24] Evans, J. M. et al.: *Am. J. Clin. Pathol.*, 18: 745—747, 1948.
- [25] Burt, R. and K. D. Phillips: *J. Clin. Path.*, 30: 1082—1084, 1977.
- [26] Brewer, J. H. and D. L. Allgeier: *Appl. Microbiol.*, 16: 848, 1968.
- [27] 吴怀瑛等: 中华医学检验杂志, 4 (4): 198—200, 1981.
- [28] Sutter, V. L. et al.: *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*, 3rd edition, The C. V. Mosby Company, St. Louis-Toronto-London, 1980.