

## 严格厌氧技术

刘聿太

(中国科学院微生物研究所,北京)

**摘要** 本文介绍当前研究严格厌氧菌用的厌氧技术和经典的 Hungate 厌氧技术的原理及操作,并立足国内介绍了所需器材。还阐述了厌氧箱的原理及使用。

**关键词** 厌氧技术;亨盖特厌氧技术;厌氧箱。

由于严格厌氧菌易被氧杀死,只能在氧化还原电位很低的环境中生长,所以这些菌的分离、培养及某些生理生化特性的研究都要在绝对无氧的条件下进行。严格的厌氧要求使人们对这些细菌的研究造成了极大的困难。

1950年,美国微生物学家亨盖特(R. E. Hungate)<sup>[1]</sup>首先提出了一套有效的厌氧技术,并使许多严格厌氧细菌分离培养成功。经过近20年的实践和改进,1969年,亨盖特使改进后的厌氧技术更趋于完善<sup>[2]</sup>。使厌氧菌的研究进入了一个飞速发展的时期。

本文介绍厌氧操作的基本原理及操作方法,并立足国内,介绍所需的有关器材。

### 一、厌氧系统

严格的厌氧操作必须在绝对无氧的环境中进行。目前用于提供无氧环境的系统有两个:铜柱除氧系统和厌氧箱除氧系统。

#### (一) 铜柱除氧系统

由气钢瓶出来的气体( $N_2$ 、 $CO_2$ 、 $H_2$ 等)经过一高温铜柱,除去其中所含的微量氧气。用此无氧气流可创造无氧小环境,使培养物与含氧的空气隔绝,以获得厌氧菌生长所必须的条件。

1. 原理:来自钢瓶的气体通过高温( $350^\circ C$ )的铜柱时,高温的铜与气体中的氧化合生成氧化铜,铜柱由明亮的紫铜色变成黑色。向已氧化的铜柱中通入氢气,氧化铜被还原生成铜,铜

柱又呈明亮的紫铜色,因而又可继续除氧。

2. 铜柱的结构(图1):直径30—35mm、长300—350mm的硬质玻璃管,两端加工成漏斗状,以便连接胶管。玻管中装入剪短的(10—20mm)细铜丝(直径约0.5mm)或细铜屑,并尽量压实。铜丝部分大约250—300mm。铜丝的下面垫以玻璃纤维。铜丝层的上端留50mm左右的空间,以防上部管口过热损伤胶管。这样装好铜丝的玻管即为“铜柱”。沿着装有铜丝的柱体外壁绕上加热带。如无加热带,可用500瓦的电炉丝代替。电炉丝之间绕上石棉绳,以防电炉丝短路并保温。外边最好再套一个大玻管,以防止触电,铜柱竖直地固定在架台上,加热带或电炉丝的两端与可调变压器(500至1000瓦)的输出接头相连,铜柱下端用耐压胶管与装有压力表头的气体钢瓶相连。铜柱上端通过胶管与分枝玻管连接,分枝玻管的枝管接胶管,胶管的另一端通过盐水接头(或截去后端的1毫升注射器)与长针头(9号或大于9号)相连。如希望由针头出来的气体既无氧又无菌,可在盐水接头内装棉花,灭菌后使用。

3. 铜柱温度的调控:铜柱的工作温度是 $350^\circ C$ 左右。可调变压器与电源接通后,由变压器的工作电压控制铜柱的温度。较简便的方法是间隔地转动变压器旋钮,使铜柱逐步升温。每转动一次变压器旋钮(升压)后,10至15分钟铜柱温度可趋稳定。向铜柱内吹入空气时铜

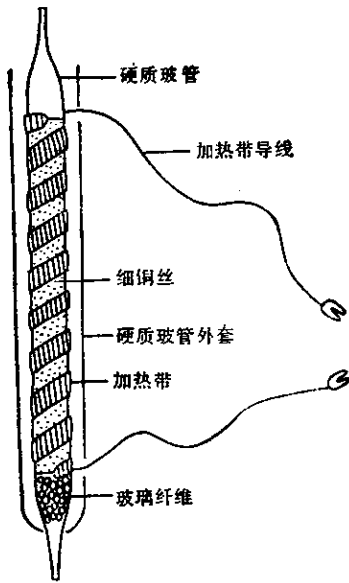


图1 铜柱的结构

丝变黑(铜被氧化), 通入氢气, 铜丝由黑变亮(铜被还原), 此温度为所需之温度。工作电压是70—90V(加热带)。

4. 铜柱的使用: 处于工作状态的铜柱, 能不断地除去流经它的气体所含的氧。铜柱由底部向上逐渐变黑。一般铜柱下部1/3到1/2变黑时, 就须通氢还原。如果钢瓶中的气体含氧太多, 通气后几分钟铜柱变黑, 可让少量氢气与所使用的气体同时流经铜柱, 以保持铜柱的还原状态。当热铜柱中含有大量空气时, 须先用氮或二氧化碳把空气排除, 再通入氢, 以防爆炸。

#### 5. 安全问题

①固定钢瓶: 钢瓶要固定在适当的位置, 以防倾倒, 瓶口脆弱部分摔坏将是很危险的, 特别是氢气钢瓶。

②检漏: 安装后, 在钢瓶口部、气压表连接处, 用肥皂水检查有无漏气之处。如漏气, 将有关部件拧紧, 或垫上尼龙薄膜后再拧紧。工作完毕应关闭所有气阀门。

③室内经常通风换气。

④若使用的无氧气体需要一定的压力(如两个以上的大气压), 要适当注意铜柱玻璃管的厚度。用铜或钢的容器装铜丝能耐更高的压力,

但看不到里边铜丝颜色的变化, 只能用来处理氢气或含有氢气的混合气。

#### (二) 厌氧箱

1975年爱德华等<sup>[1]</sup>在已有厌氧箱基础上加以改进, 成为今天适于严格厌氧菌研究用的厌氧箱。虽型号不断更新, 由原来的手动操作发展到由电脑控制的自动操作, 但其基本结构及原理是一致的。

1. 原理: 厌氧箱内有催化剂钯, 箱内含有适量的氢气, 常温下钯可催化氢与氧结合生成水, 达到除去箱内氧的目的, 形成的水再被干燥剂吸收。

2. 结构: 厌氧箱可分为操作室和交换室两部分, 交换室又与真空泵及气钢瓶相连。

①操作室: 前面塑料膜上有一对塑料套袖及胶皮手套, 供操作用。操作室内有用钢丝网装着的黑色钯粒以及干燥剂, 它们与电风扇组装在一起, 使箱内的气体不断通过钯粒和干燥剂, 除去操作室内的氧及所形成的水份。操作室内还备有接种针及供接种针灭菌用的电热器。有的操作室内装有培养箱, 有的还可把显微镜放到里边。

②交换室: 用于操作室外的物品的放入和箱内物品的取出。有可严密封闭的内外两个门。内门与操作室相通, 外门与外界相通。交换室有2—3个开口, 分别与真空泵及气钢瓶相连。

#### 3. 使用

①手动厌氧箱: 其操作步骤是, 在交换室内门严密关闭的情况下, 打开外门, 将要放入操作室的物品(如试管、注射器、培养基等)放入交换室, 关闭外门。启动抽气泵并打开气泵与交换室之间的阀门, 交换室抽真空直到交换室压力计指针接近不动。关闭抽气阀门, 打开交换室与氮钢瓶之间的阀门, 再抽气。这样重复3—5次, 关闭气钢瓶阀门, 停止抽气。此时可打开交换室内门, 将交换室内的物品放入操作室, 关闭内门。试管、培养瓶等在操作室放置2—3小时后才能达到理想的无氧状态。操作完毕后, 打开内门(交换室处于无氧状态), 物品

放入交换室,关闭内门,打开外门,取出物品。

使用注意事项: (i) 经常检查操作室内氨的含量,及时补充,使其维持在5%左右; (ii) 经常更换干燥剂,以维持操作室内的干燥; (iii) 尽量避免硫化氢气体进入操作室,如不可避免,要经常(1—2周)烘烤(160℃)钯粒,除去附着的硫化氢,否则附着的硫化氢会抑制钯的催化活性。

②自动厌氧箱: 一旦安装完毕,使用操作极为简单,只要按一下启动按钮,交换室的换气操作可自动进行。但安装时要严格按照说明书进行。

## 二、培养基的制备

### (一) 器材

1. 铁架台和烧瓶: 用于煮培养基,根据培养基的量,可选用200至1000ml的圆烧瓶或三角烧瓶。

2. 厌氧培养用的试管和小瓶: 现国内没有统一的产品。有的实验室直接从国外引进<sup>[4]</sup>,有的是国内自己设计的。试管和培养瓶要求耐压,以便充气培养和加压灭菌。容积要一致,便于气体含量的测定。

3. 注射器或移液管: 用于分装培养基。用配以长针头(20号以上)的普通注射器(10至30ml)或定量注射器分装培养基最为方便。也可用与一段乳胶管(约70cm)相连的吸管或移液管,即亨盖特厌氧技术中的口吸管分装<sup>[4]</sup>。

### (二) 培养基的制备

1. 培养基的组成及指示剂: 厌氧菌培养基成份因菌而异,但基本成份与好氧菌类似,可由以下五部分组成; ①碳源: 如糖、醇、酸等含碳水化合物; ②氮源: 各种含氮的有机无机化合物,如蛋白胨、酪素水解物(也可作为有机生长因子)、铵盐; ③无机盐: 含有K、Na、Ca、Mg、P、S等元素的无机盐; ④有机生长因子: 酵母膏、各种浸液等; ⑤还原剂: 常用的有半胱氨酸、硫化钠和抗坏血酸等。另外还要加入氧化还原电位指示剂,常用的有刃天青和美蓝。

培养基中加入氧化还原电位指示剂的目的是为了为了使操作者知道自己的无氧操作是否完

善,培养基能否应用。常用的指示剂是刃天青,用量通常是0.0001%,它是一个双重用途的指示剂。有氧时指示酸碱度,碱性蓝色,酸性红色。有氧无氧情况下指示氧化还原电位,有氧时,依据pH可为蓝、紫或红色,无氧时无色。褪色的氧化还原电位为-40mV<sup>[5]</sup>,无色的培养基不一定能满足所有厌氧菌氧化还原电位的要求<sup>[6,7]</sup>。培养基煮沸除氧时可出现蓝→红→无色的变化过程。当变为无色时,其结构发生了不可逆的变化,刃天青变成了9-羟基异吩噻啉(resorufin),只是一个氧化还原电位指示剂,还原时无色,氧化时红色,不能再变为蓝色。

2. 培养基煮沸驱氧: 首先加入一定量的蒸馏水于烧瓶中,然后依次加入各种药品(最好以浓的贮液形式加入)。将N<sub>2</sub>(或CO<sub>2</sub>)气针头插入烧瓶中,加热煮沸20—30分钟(也可在停止加热之前插入气针头)。如瓶口较大,最好塞一打孔的胶塞,确保煮沸和分装过程中无对流空气进入瓶中。如培养基中有机物较多,加热时能产生较多的还原性物质,培养基可变为无色;有机物少则只能到红色。停止加热后,加入0.02—0.05%的半胱氨酸。待冷却到50℃以下进行分装。分装前将培养基调为中性,以减少加压灭菌时营养成分破坏。

3. 培养基的分装: 以分装试管为例,用2至3个气针头分别插入干的试管中驱赶空气。气针头气流的强弱要适中,对着脸,明显感到气流即可。气流过大,在管内易形成涡流,把空气带入管内。驱赶空气20—30秒即可,但经验更为重要。然后用适当的注射器或移液管吸取培养基进行分装。吸取培养基前,将注射器针头插入已驱赶过空气的试管中抽注几次,以保证注射器内无任何空气。然后移入培养基烧瓶中,同样用气冲洗几次,然后吸取培养基,注入已驱过氧的试管中。注射器返回烧瓶之前,用一干净纱布将注射器针头上的培养基擦掉,以防把溶于其中的氧带入烧瓶培养基中。塞试管前,将气针头插入培养基中冒泡(几秒),将胶塞轻插入管口,停几秒,拔出气针头的同时,将塞子塞紧。如用移液管分装,先将移液管插入烧瓶气

相中,缓缓吸气,用无氧气体替换移液管中的空气,再吸取培养基。分装时,让培养基自行流入试管,不可用嘴吹,以防空气进入。分装完毕,旋上螺帽,灭菌备用。如在厌氧箱内分装,则各管(瓶)的厌氧状态更为一致。

4. 无氧无菌贮液的制备:培养基接种之前,可能要加入一到几种补加物,如还原剂  $\text{Na}_2\text{S}$ 、pH 调节剂、某些生长底物等。这些补加物均须制备成一定浓度的无氧无菌贮液。制备方法是称取一定量的药品放入试管或培养瓶中,用无氧气针头驱赶空气,然后用无氧分装方法(同培养基分装)加入定量的经煮沸除氧并冷却的蒸馏水。如贮液的浓度要求精确,须用容量瓶配制,再以无氧操作转入试管或培养瓶中,灭菌备用。

无论培养基或贮液都不可久放,一般 2—3 周之后,须重新配制。

### 三、菌的分离纯化

#### (一) 取样

为了避免与氧接触造成样品中厌氧菌死亡,需要用无氧操作取样。首先准备无氧无菌试管及无菌注射器。取样之前最好用无氧气体(可用无氧无菌试管内气体)洗注射器 2—3 次,把注射器针头刺入取样部位取样,将样品注入无氧无菌试管中。

#### (二) 滚管

为了避免样品中厌氧菌因取样后时间过久而死亡,取样后,最好立即滚管分离。滚管之前,先取样进行显微镜观察,了解样品中细菌的主要形态及其大概比例,作为分离结果的参考。

1. 准备培养基:取 12—16 支盛有 4.5ml 固体培养基的试管,加热融化,置于 45—47℃ 水浴中,加入  $\text{Na}_2\text{S}$  的无氧无菌贮液(终浓度 0.02—0.05%)及其他补加物,每一稀释度用两支试管共 6—8 个稀释度。

2. 样品稀释:取 6—8 支盛有 4.5ml 液体培养基的试管,用无菌注射器无氧地加入  $\text{Na}_2\text{S}$  贮液,取 0.2—0.5ml 样品进行 10 倍系列稀释,作为滚管接种物。

3. 滚管:用注射器吸取一定量的样品稀释液到融化的固体培养基中,立即使其在冷水(或冰水)中迅速滚动,培养基可在试管内壁凝成一层均匀薄层。在适当温度下培养,可在琼脂层上长出菌落。滚管可用手滚,也可用滚管机滚。

① 手滚管法:搪瓷盘中放入冰水,将已接种的、培养基尚未凝固的试管平放在搪瓷盘中,用手使其迅速滚动,培养基在试管内壁凝成一层。

② 滚管机:现国内无产品可售,现有的滚管机都是自己设计制造的。如浙江农业大学环保系,成都生物研究所,清华大学环境工程系等。滚管机的结构很简单,一可调速的小马达带动一水平的包有橡皮的滚轴(可用油印机的滚轴代替)。滚轴下部与冷水接触,滚轴转动时带动躺在滚轴和两个光滑支点间的试管滚动,滚轴带上的冷水使试管冷却。

#### (三) 菌种纯化

菌种纯化过程是多次挑取单菌落,稀释滚管的过程。

首先拉制挑取菌落的弯头毛细管。将滴管的细口端在火焰上拉成毛细管,并使末端弯成近 90° 的角,截掉部分末端,使弯曲部分保留 2—3mm,端部内径约 0.5mm。

挑取菌落前,准备好滚管用琼脂培养基及稀释用液体培养基。

用适当的架台和夹子把要挑取菌落的试管固定于解剖镜下,去掉试管胶塞的同时,将气流适当、用火焰灭过菌的气针头迅速插入管内。将一液体培养基试管胶塞去掉,迅速插入另一用火焰灭过菌的气针头。在解剖镜下找到要挑取的菌落。弯头毛细管粗口端接一乳胶管,用嘴咬住胶管的末端,小心地把毛细管插入挑取菌落的试管中。注意不要碰到管壁,以防接触杂菌。毛细管口停于要挑取的菌落附近,眼睛移到解剖镜上,缓缓吸气,让无氧气体充满毛细管及胶管,然后吸取菌落,并用无杂菌的固体培养基封闭毛细管口,慢慢抽出毛细管,移入液体管并插入液体中,轻挤胶管,挤出菌落,并洗几次,移出毛细管,塞上胶塞的同时抽出气针头。如

果菌落大,并且管内杂菌很少,也可不用解剖镜。但最好练习在解剖镜下挑取,可减少杂菌污染的机会,缩短纯化过程。

将已挑入菌落的液体管适当摇振,使菌落散开,用液体管进行适当的稀释作为接种物进行滚管。这样滚管几次,直到滚管中菌落形态一致,显微镜检查,细胞形态一致,液体培养无杂菌生长,即为纯菌。用解剖镜检查菌落形态时,应注意到琼脂内部与表面菌落形态的差异。有的工作者把培养物接种到含有葡萄糖的有氧及无氧肉汤培养基中培养,以检查有无一般异养菌的污染。

## 参 考 文 献

- [1] Hungate, R. E.: *Bacteriol. Rev.*, 14: 1—49, 1950.
- [2] Hungate, R. E.: *Methods in Microbiology*, Norris, J. R. and D. W. Ribbons (eds), Vol. 3B, p. 117—132, Academic Press Inc. New York, 1969.
- [3] Edwards, T. and B. C. McBride: *Appl. Microbiol.*, 29: 542—545, 1975.
- [4] 钱泽树, 闵航: 沼气发酵微生物学, 浙江科学技术出版社, 1986。
- [5] Hungate, R. E.: *The rumen and its microbes*, New York, London, Academic Press, 1966.
- [6] Balch et al.: *Microbiol. Rev.*, 43: 260—296, 1979.
- [7] Mah, R. A. and M. R. Smith: in *The Prokaryotes*, Starr M. P. et al. (eds), p. 948—977, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1981.