

几种厌氧菌的培养方法

诸 葛 健

(无锡轻工业学院, 无锡)

在发酵工业中常需培养厌氧细菌, 如生产丙酮丁醇的梭状芽孢杆菌, 白酒生产中与产酯香关系密切的丁酸菌和己酸菌等。由于许多专性厌氧菌最初仅能生长在氧化还原电位较低(约 150 毫伏或更低)的培养基中, 它们与分子氧接触会很快死亡, 因此, 在培养厌氧菌时, 应尽可能减少与分子氧接触的机会。这里介绍几种厌氧菌的培养方法。

一、培养基预先还原法

在培养基中预先加入对微生物生长发育无害的还原剂, 如半胱氨酸、巯基化合物、硫化钠或抗坏血酸等, 使培养基预先被还原, 使氧化还原电位降低到一定程度, 然后在隔绝空气的条件下存放培养基备用。

二、琼脂管培养法(图 1)

首先在一根两端开口的无菌玻璃管的一端塞入一无菌橡皮塞, 然后从另一端注入融化的无菌培养基, 装量占管的大部分, 使琼脂面离顶端 2.5 厘米, 用无菌橡皮塞塞紧并用塑料盖盖紧。待其冷却凝固, 再穿刺接种厌氧菌。在菌落长出后, 用无菌玻棒将琼脂柱挤出, 培养物供试验用。

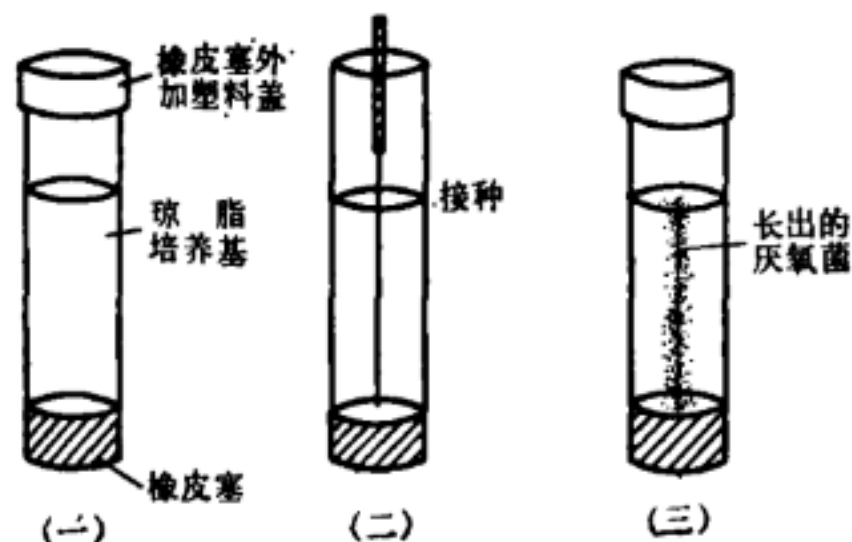


图 1 琼脂管培养法

三、加吸氧剂法(图 2)

用“二”法之玻管装琼脂培养基, 装量仅为玻管高度之半, 接种后, 从琼脂表面往上逐层

加入未脱脂棉、脱脂棉和结晶焦性没食子酸及 10% 的 NaOH 溶液, 最后用橡皮塞塞满空间并盖紧塑料盖。为防止 NaOH 溶液漏入培养基中, 可先将玻管倒置使琼脂层在上层。

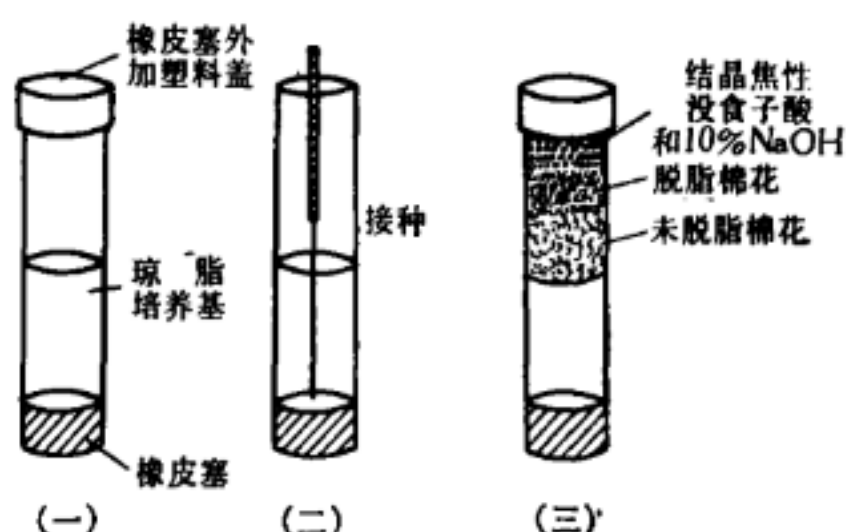


图 2 加吸氧剂法

四、双层试管培养法(图 3)

将穿刺接种后的小试管放在盛有结晶焦性没食子酸的较长大的试管中, 再加入 10% NaOH 溶液, 立即塞上无菌橡皮塞并加塑料盖盖紧进行培养。

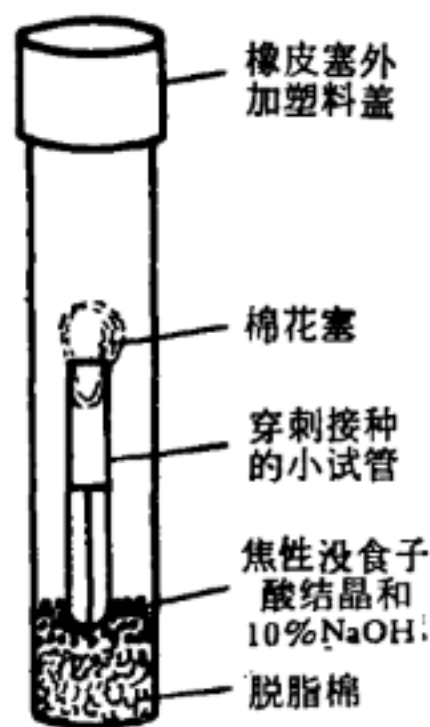


图 3 双层试管培养法

五、缺氧培养皿培养法

在培养皿盖上铺上琼脂培养基; 在皿底一侧放上结晶焦性没食子酸, 另一层注入 10% 的

NaOH 溶液,勿使二者混合。待将菌划线接种在皿盖的琼脂培养基上以后,立即将盖与底合在一起并用石蜡将盖与底之间的缝隙密封。然后将皿底之两种化合物混合以吸除氧气,进行厌氧培养。

为了更好地隔绝空气,上述各法中所用琼

脂培养基表面可覆盖一层凡士林与石蜡的混合物。如条件许可,用氮气或二氧化碳气排除空气,效果更好。吸氧剂的添加量,一般可按每 100 毫升空气中的氧需用 1 克结晶焦性没食子酸和 10 毫升 10% NaOH 溶液来估计。

发酵液中丁二酸的分析

林应锐*

(中国科学院微生物研究所,北京)

分析与其它二元酸混杂着的丁二酸时,多用气相色谱法^[1]。但该法必须先除去其它杂质,然后经过定量酯化才能进行分析,操作颇繁杂。近年采用液体色谱法^[2],较为方便。但该法所需仪器目前尚未普及。我们在工作中设计了不必先分离掉反丁烯二酸, α -酮戊二酸和苹果酸等杂质,直接分析发酵液中丁二酸的方法,较为简捷,可用于处理大量样品的常规分析,准确性在 90% 以上。

一、原理

在酸性高锰酸钾的沸腾溶液中,丁二酸不受氧化,而反丁烯二酸和苹果酸则被氧化掉^[3], α -酮戊二酸可以定量地被氧化为丁二酸^[4]。如此,可于酸性条件下加入高锰酸钾至发酵液中一起煮沸进行氧化,使之只留下丁二酸,再将反应液调至中性,加入硝酸银,过滤除去丁二酸银沉淀,再用氯化钠回滴过量的银盐,由此得出丁二酸总量^[5,6],然后减去由比色法测定之发酵液中 α -酮戊二酸含量^[7],即能获得原来发酵液中丁二酸的真正含量。

二、操作方法

将 20 毫升 10% 硫酸溶液加至 20 毫升含上述有机酸钙盐沉淀的发酵液样品中,搅拌数分钟后,过滤,用 25 毫升量筒收集 20 毫升滤液。将滤液转至 50 毫升三角瓶中,用少量水洗量筒,洗液合并至三角瓶中,小心加入高锰酸钾粉末,待反应缓和之后,在加热条件下继续加入

高锰酸钾,至煮沸条件下出现极少棕色沉淀且在 2—3 分钟内不消失为止。煮沸浓缩至体积为 10 毫升左右。冷却后,滴加 30% 氢氧化钠至碱性(用酚酞指示剂或 pH 试纸测定)。将样品转移至量筒内,用少量水洗三角瓶,洗液合并并在量筒内,定容至 20 毫升。过滤除去氢氧化物沉淀,在另一 25 毫升量筒里收集 10 毫升滤液,加入一滴 0.1N 硝酸溶液使酚酞褪色(pH6—7)。滤液移至三角瓶中,再用盛此滤液的量筒量取 20 毫升 0.2N 硝酸银溶液加入三角瓶中,随后用 20 毫升水洗涤量筒,洗液并入三角瓶中,摇荡均匀,静置片刻,过滤除去银盐沉淀,用量筒收集 25 毫升滤液倒至三角瓶中,再用少量水洗量筒,洗液合并并在三角瓶里,加入 4—6 滴 2% 重铬酸钾溶液,用标准的 0.1N 氯化钠溶液滴定至红棕色褪去呈淡黄色为止。

三、结果计算

按以下公式计算丁二酸含量:

丁二酸(毫克/毫升) = $(A - V)59.1N/S - 0.8C\alpha$

A: 滴定 10 毫升硝酸银溶液所用去之氯化钠溶液毫升数;

V: 滴定样品所用去之氯化钠溶液毫升数;

N: 氯化钠溶液的实际当量浓度;

S: 最终用于滴定时所用原发酵液样品毫升数(2.5 毫升);

* 田静同志提供 α -酮戊二酸比色分析结果。