



厌氧菌的培养方法

- **物理方法**包括遮断空气法、煮沸法、真空法、空气置换法、气体喷射法或转管法等
- **化学方法**包括焦性没食子酸法、铁丝绒法、保险粉法等
- **生物学方法**包括与需氧菌共生好氧法、燕麦发芽法等
- **混合法**包括厌氧罐（袋）法、厌氧手套箱法或厌氧室法、空气置换铁丝绒法、空气置换钯粒法等。

1 液体培养基的厌氧培养法

- 培养基煮沸：驱气后置流水中急速冷却

- 添加还原剂：

 - 0.03~0.05% L-盐酸半胱氨酸

 - 0.01~0.02% 硫乙醇钠

 - 0.5~1% 葡萄糖

 - 0.1% 抗坏血酸

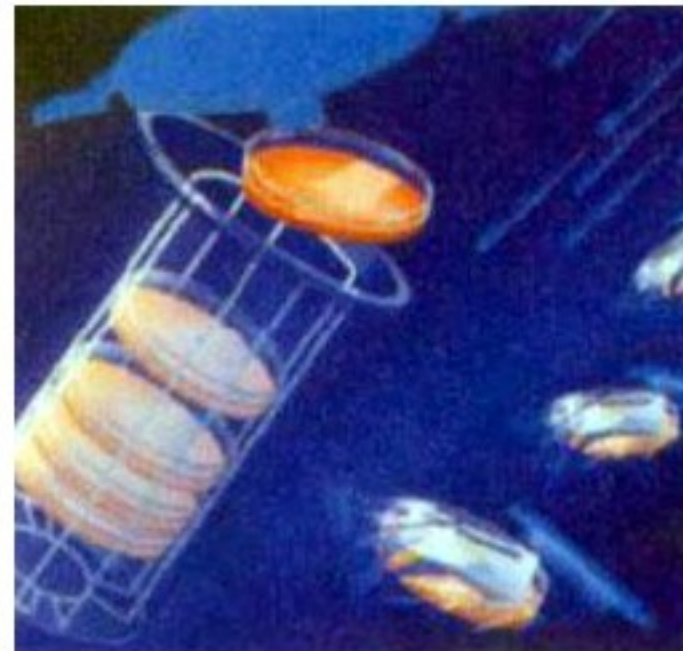
 - 其它还原剂

- 添加琼脂

2 固体培养基的厌氧培养法

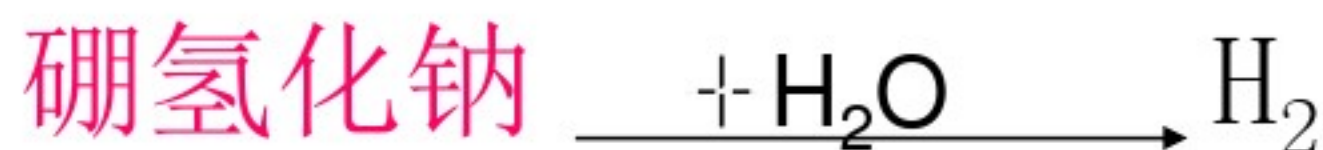
- 厌氧罐法
- 简易厌氧罐和厌氧袋法
- 钢丝绒法
- 焦性没食子酸法
- 抽气换气厌氧培养法
- 生物好氧厌氧培养法
- 转管技术和气体喷射培养法
- 厌氧手套箱法（又称厌氧室法）

2.1 Gas-pak法



原理

气体发生袋：



触媒：

钯粒

厌氧罐中的 O_2
↑

H_2O

厌氧指示剂

厌氧指示剂

- 亚甲基兰 指示剂
- 卢卡斯固体厌氧指示剂
- 布鲁氏指示剂

亚甲基兰 指示剂

- 6% 葡萄糖水溶液 2
- 0.1N 氢氧化钠水溶液 0.1
- 0.05% 亚甲基兰水溶液 0.2

厌氧	无色
残存有氧气	蓝色

卢卡斯固体厌氧指示剂

- | | |
|--------------|-----------|
| ■ 2% 硼砂溶液 | 5毫升 |
| ■ 9% 硫乙醇酸 | 1毫升 |
| ■ 酚红溶液 | 0.1~0.2毫升 |
| ■ 0.02% 美兰溶液 | 10毫升 |
| ■ 琼脂 | 1% |

厌氧	无色
残存有氧气	蓝色

布鲁氏指示剂

- 60% 羟甲基氨基甲酯 1
- 4% 葡萄糖 1
- 0.02% 美蓝 1

厌氧	无色
残存有氧气	蓝色

Gas-Pak法的使用操作程序

- 平皿培养基装入平皿架中置厌氧罐内；
- 打开内盖居中金属网袋，装入触媒钯粒；
- 打开锡箔纸袋，取出厌氧指示剂片；
- 剪开气体发生袋一角，注入10毫升水，迅速紧闭罐盖，置培养箱中培养。
- 约经5~10分钟后，放入厌氧指示剂片。
- 注：操作较复杂，需注入水作为触媒。

2.2.1 简易厌氧罐

干燥器容内径（厘米） 容积（毫升）	容器1	容器2	容器3
15cm（约2150毫升）	硼氢钠 0.6克	氯化钴 0.2克 或 钯粒1.5克	柠檬酸0.6克 和 碳酸氢钠0.7克
18cm（约3500毫升）	硼氢钠 1克	氯化钴0.33克 或 钯粒2克	柠檬酸1克 和 碳酸氢钠1.15克

2.2.2 厌氧袋法（三菱瓦斯化学株式会社）

聚碳酸酯（复合塑料膜）制厌氧袋

- 产气袋：2.5L、3.5L、350ml；
- 厌氧指示剂
- 厌氧培养罐：2.5L、7L、15x30cm培养袋、立式培养袋；
- 微需氧产气袋





适合嗜二氧化碳菌培养



适合厌氧菌的培养



适合兼性厌氧菌的培养

培养容器系列产品

Example of cultivation

Examples of cultivation using rectangular jars with compartment
rectangular jars for AnastroPack can be piled, need no unnecessary space



Thin-Type :
for 2 petri dishes



Standard-Type
for 12 petri dishes



Large-Type : for 42 petri dishes

Example of cultivation
using pouch



Pouch

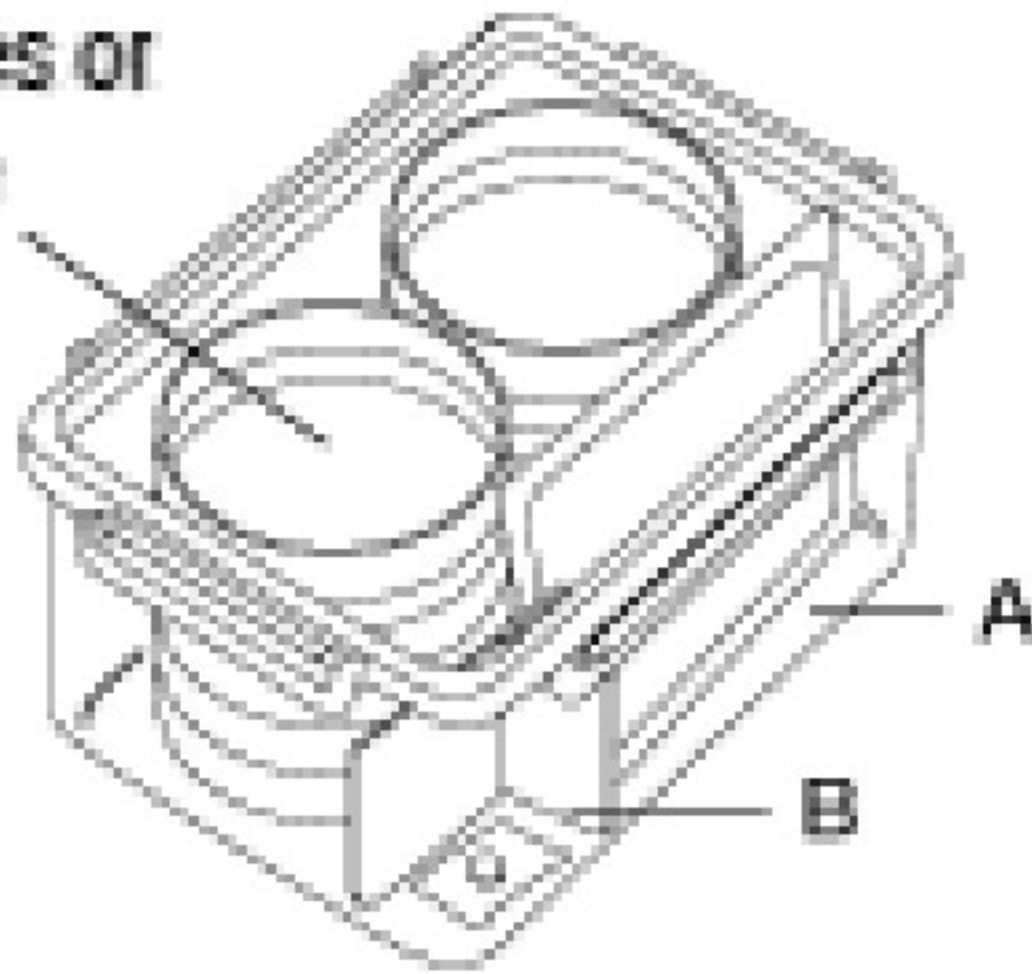


W-Zipper Pouch

Example of cultivation using
Standing-Pouch



Petri dishes or
Microplate



MGC厌氧培养产品信息列表

耗材类产品名称		编号
 AnaeroPack (安宁包)	厌氧产气袋	C-1
	微需氧产气袋	C-2
	CO ₂ 产气袋	C-3
Oxygen-Ind	氧气指示剂	C-22
AnaeroPouch (安宁包)	厌氧产气袋	C-11

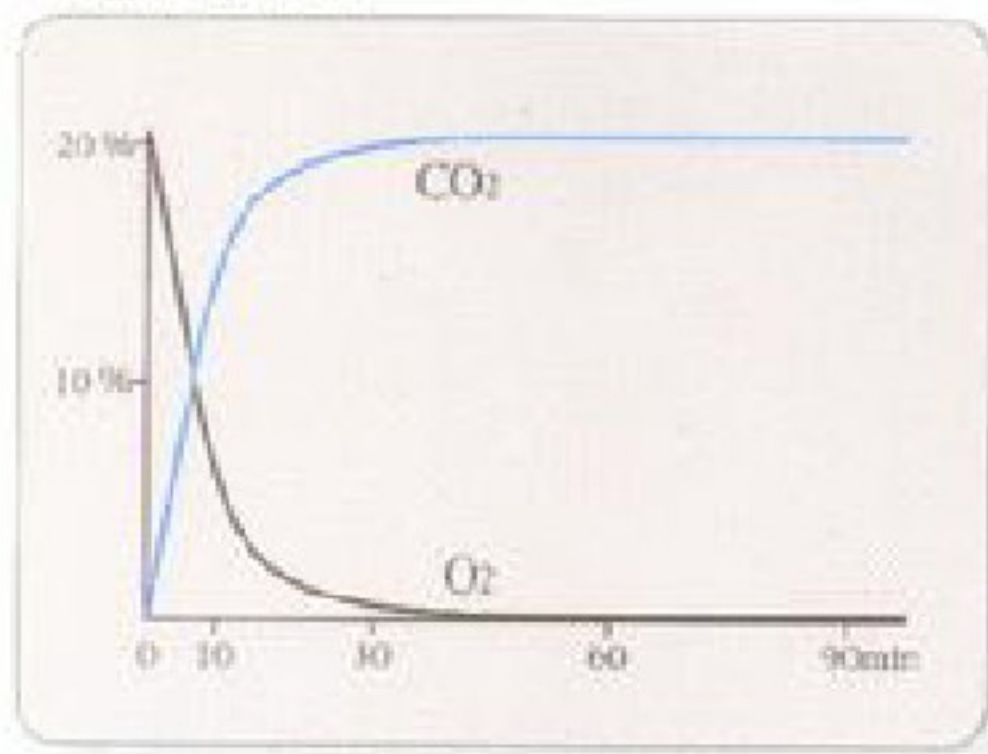
相应培养容器	编号
2.5L密封盒	C-31
7.0L密封盒	C-32
立式培养袋	C-43
通用	
15×30cm 培养袋	C-41

备注：少量样品培养选用AnaeroPouch系列产品（2-4皿/次）；
常规及大量培养选用AnaeroPack系列产品（10培养皿以上）。

厌氧培养气体变化曲线图



Composition change of the gas caused by AnaeroPack-Anaero

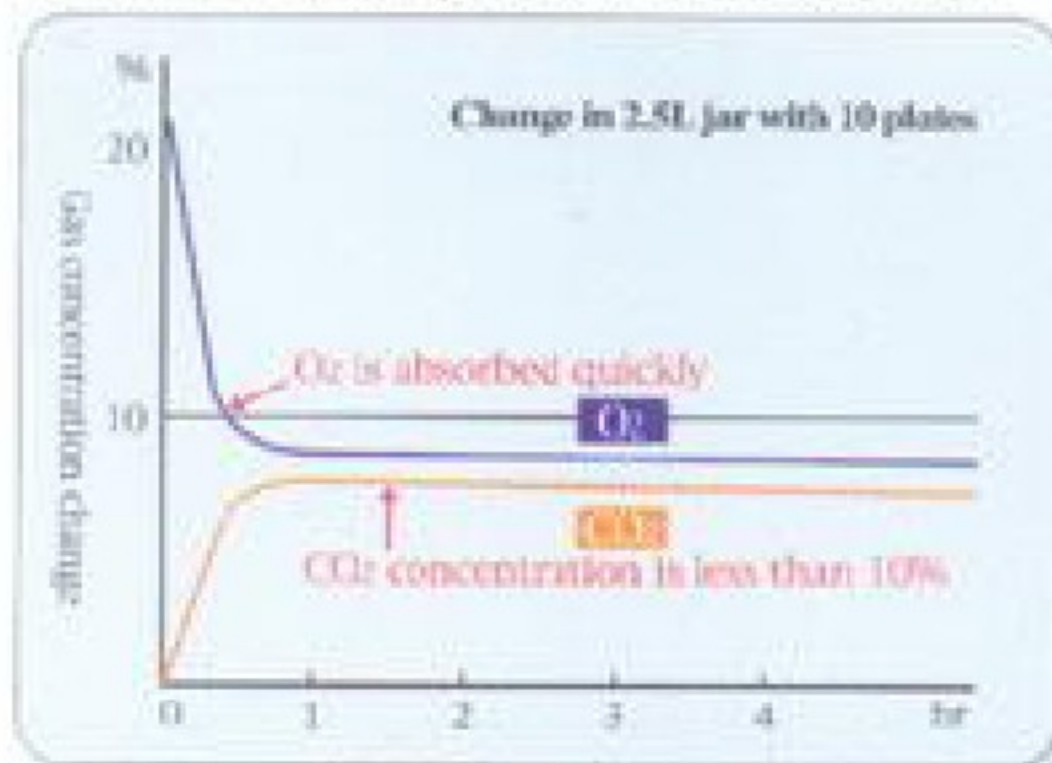


AnaeroPack-Anaero吸收容器中的氧气，产生二氧化碳，30-60分钟内氧气被完全吸收，产生21%左右的二氧化碳。

微需氧培养气体变化曲线图



Gas concentration change by AnaeroPack-MicroAero

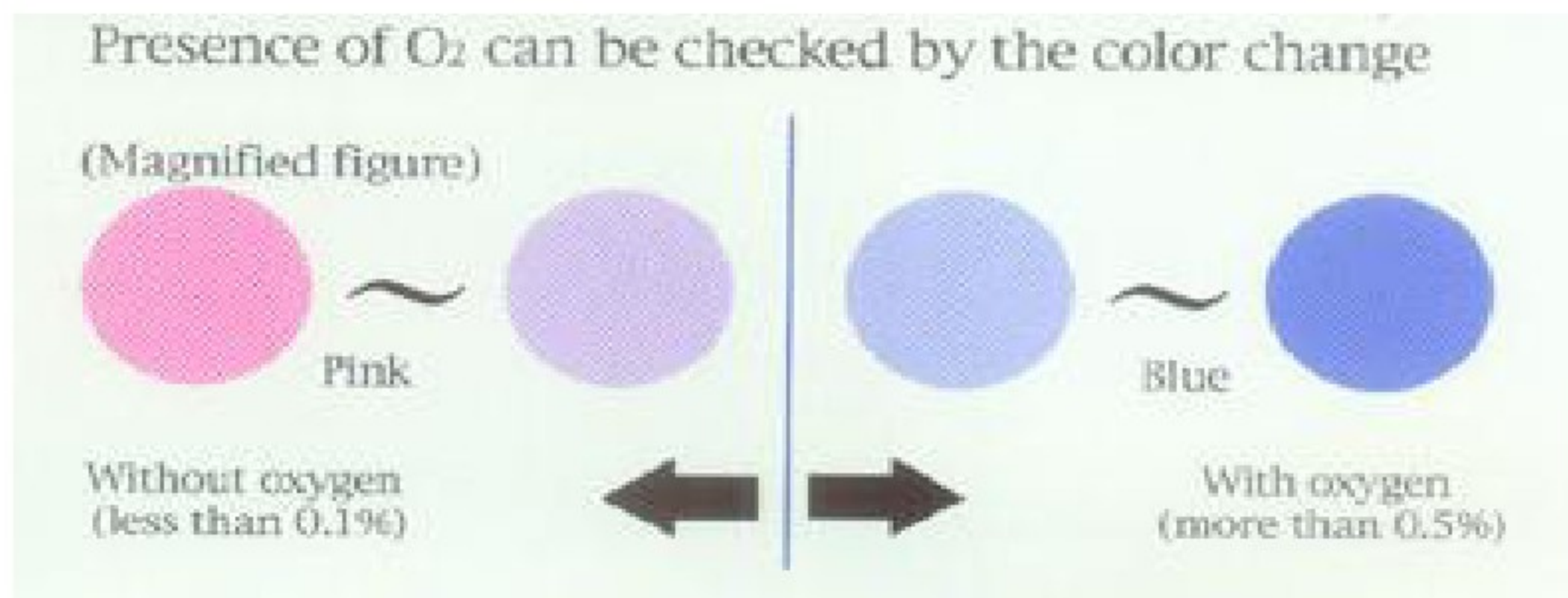


Caution

Do not use AnaeroPack-MicroAero for the cultivation of obligate anaerobes. Do not use AnaeroPack-MicroAero for the cultivation of microaerophilic bacteria.

AnaeroPack-MicroAero吸收容器中的氧气，产生二氧化碳，在一小时内氧气浓度变为8-9%，二氧化碳浓度变为7-8%。

氧气指示剂颜色变化图解



- 1.新鲜指示剂为粉红色（无氧，左）和蓝色（有氧，右），重复使用后受环境影响，反应减弱，指示剂变为浅紫色（无氧，中左）和淡蓝色（有氧，中右）。
- 2.厌氧培养2-3小时后指示剂颜色变化稳定。

2.2.3 保险粉的厌氧罐培养法

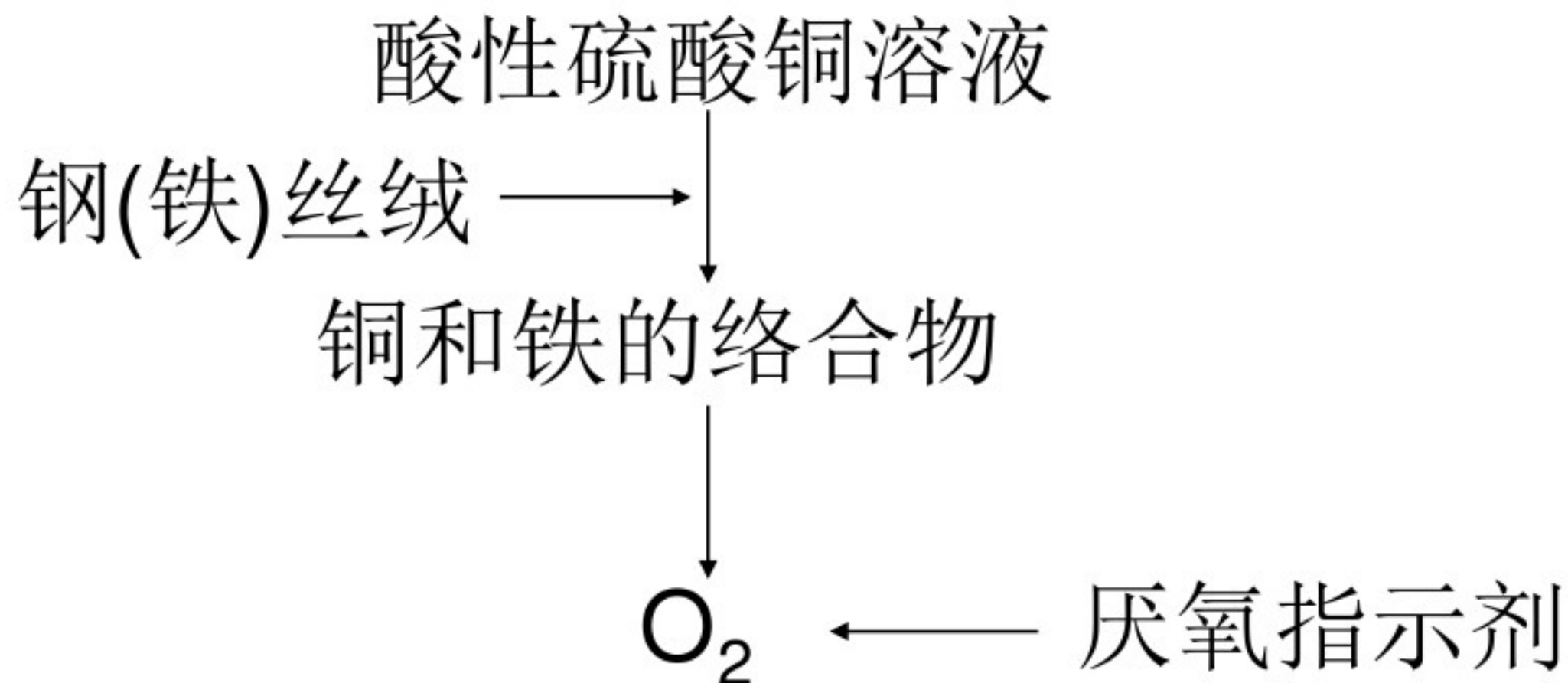
- 二亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)

碳酸氢钠

无水硫酸钠

- 不用触媒

2.3 钢丝绒法



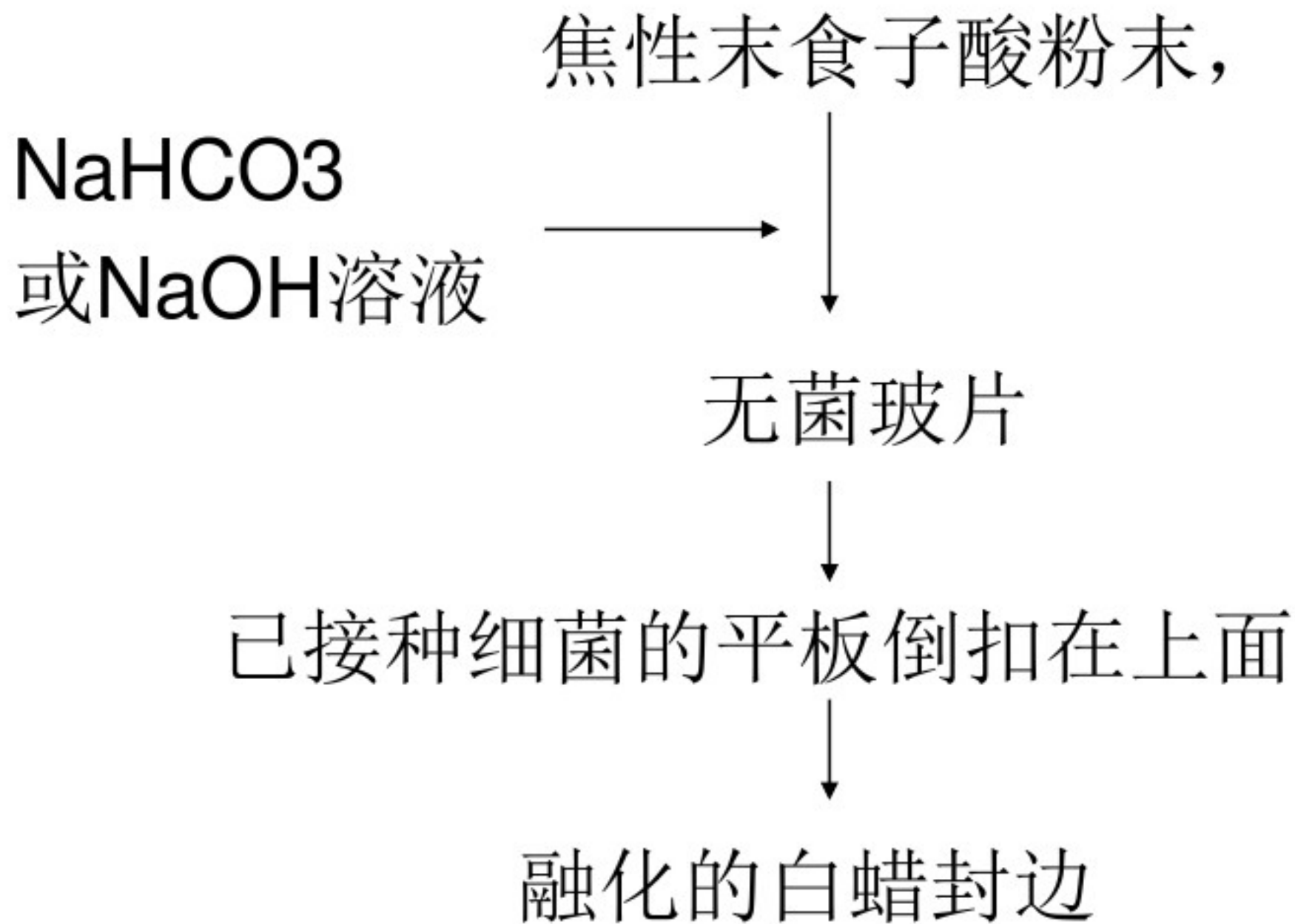
■ 酸性硫酸铜溶液：

将自来水1升加硫酸铜60g，吐温-80 20ml，加热溶解后，又加入2N的硫酸90ml，最后加水至6升；

■ 方法：

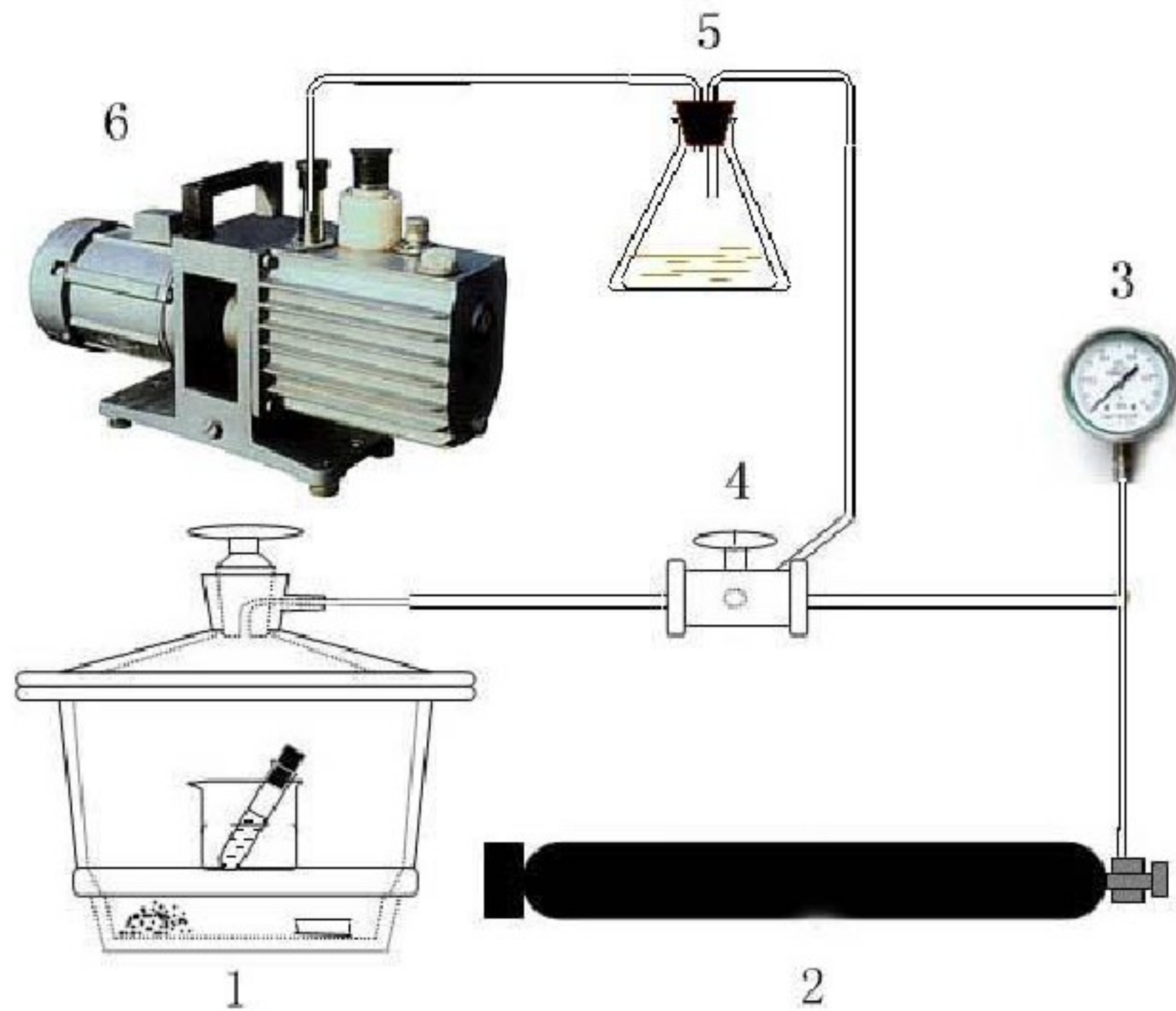
取5~6g钢丝绒/ L，于1~1.5升酸性硫酸铜溶液浸泡30~60s，钢丝绒变成红铜色，挤净液体置铝质或玻璃容器中，放入厌氧罐内。随后将厌氧指示剂放入，密封厌氧罐，1~4h后可达厌氧状态

2.4 焦性没食子酸法



2.5 抽气换气厌氧培养法

- 玻璃干燥罐
- 混合气钢瓶：
10%二氧化碳、10%的氢气、80%的氮气
- 三通阀
- 触媒：钯粒 / 浸泡钢丝绒 / 氯化钴
- 厌氧指示剂



1: 厌氧培养罐 2: 混合气体 (CO₂: H₂: N₂=1: 1: 8) 钢瓶

3: 压力表 4: 三通阀 5: 缓冲瓶 6: 真空泵

2.6 生物好氧厌氧培养法

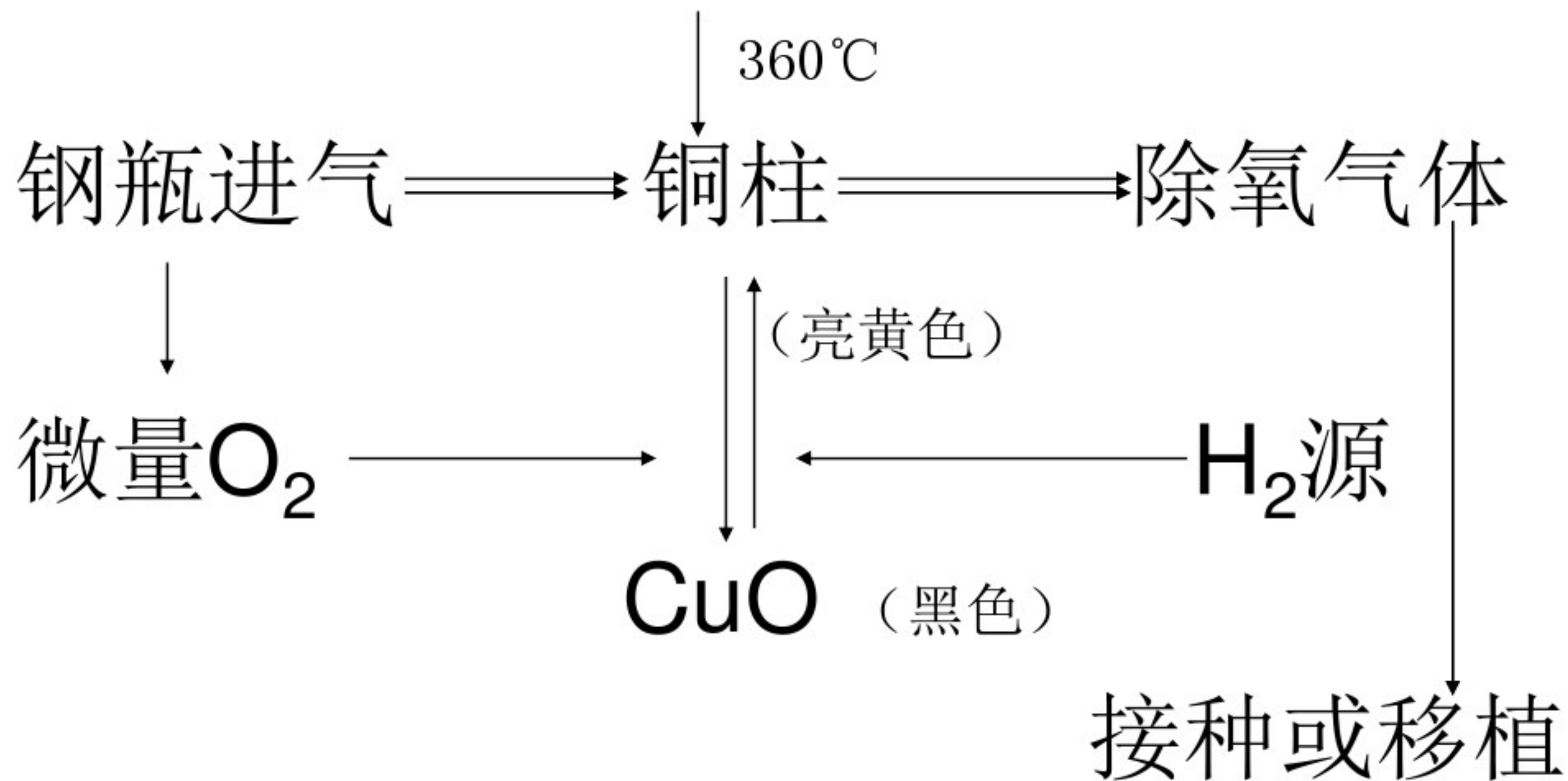
- 庖肉培养基：

牛肉渣	0.5g
牛肉浸液	7ml

液面上加盖3~4mm厚的融化凡士林，灭菌。

- 生物好氧厌氧培养方法

2.7 转管技术和气体喷射培养法



2.8 厌氧手套箱法

- 又称厌氧室法





3 厌氧培养方法的选择

- 亨格特的预还原灭菌厌氧培养基的转管技术、气体喷射培养法
- 厌氧手套箱培养法
用于要求严格的厌氧培养法的微生物生态学（正常菌群）的研究工作
- 厌氧罐(袋)法结合其它厌氧培养方法
适用于对氧极其敏感的厌氧菌。在临床细菌的检验工作中，可以充分使用此法分离感染症中的厌氧病原菌。

4 厌氧菌的保存

4.1 继代保存:

以**GAM**半固体流动培养基和**TEP**半固体培养基作传代培养保存。用毛细吸管吸菌进行继代培养，使用白金接种环移菌接种，可以避免有的菌在操作中接触空气或氧化物而死亡。数周作一次继代培养。新分离的的菌种，在几个月内，每**3~4**星期传代一次。被保存的菌种，放室温下暗处。最好是不同菌用不同培养基保存。

4.2 冷冻保存:

20%脱脂牛奶0.5ml分注在带螺旋塞的玻璃瓶中，经110℃、15分钟高压灭菌，冷却后，先用毛细吸管取半固体高层培养基24~48h生长茂盛部位的厌氧菌液0.5ml，加入玻璃瓶中，直接置于一80℃冰库中保存。

厌氧菌较理想的保存方法是液氮保存法。将 10^8 以上浓菌液置脱纤维羊血、脱纤维兔血或羊血牛奶各半的分散剂中，先在干冰中预冻，然后连容器一起放入液氮罐中。