

食品微生物的厌氧培养法

施安辉

在食品酿造工业，主要是利用有益的微生物酿造、加工可口的种种食品，同时，又要限制、杀灭有害的微生物，以确保食品的风味、营养，并利于人体健康。在这些有益或有害的微生物中，除了需氧菌和兼性菌外，还有相当多的一部分是属于厌氧菌。例如，参入白酒酿造的丁酸菌、己酸菌等芽孢杆菌；能进行酪酸发酵的酪酸梭状芽孢杆菌；能引起食品罐头和炼乳罐头变质的嗜热性厌氧芽孢杆菌；能促使鲜肉变质的魏氏杆菌、水肿梭状芽孢杆菌，双酶梭状芽孢杆菌、溶组织梭状芽孢杆菌，以及引起毒素型食物中毒的内毒梭状芽孢杆菌和感染型食物中毒的沙门氏杆菌等等。对此，微生物工作者，必须要研究设计培育有益或有害的厌氧微生物的方法。

厌氧微生物由于菌体内缺少氧化酶系，而具有脱氢酶系，因此，必须在无游离氧的条件下才能正常生长繁殖；在有氧的情况下，一般生长受到阻抑，甚至死亡。其原因是：厌氧菌在有氧条件下进行呼吸时，可形成过氧化氢（ H_2O_2 ），而体内又缺少过氧化氢酶，不能把过氧化氢分解掉，最终菌体因过氧化氢中毒而受抑制或死亡。另外，厌氧菌的生长繁殖需要较低的氧化还原电位，而在有氧存在时，氧化还原电位较高，这在一定程度上，也抑制了厌氧菌的生长繁殖。

所以，在分离培养厌氧微生物时，必须要培养设备和容器内除掉氧气，或充以 CO_2 、 H_2 、 N_2 等惰性气体。目前，常用的厌氧培养法可分为在培养基内造成欠氧条件和造成无氧培养环境两大类。因在培养基内造成欠氧条件，方法简便、易于操作，所以在科学研究和生产中应用较为广泛。

一、在培养基内造成欠氧条件

1. 深层琼脂柱法：

把固体琼脂培养基装入试管（约占试管的2/3）或玻璃细管内，穿刺接种至琼脂柱底部。适温培养后，管底生长繁殖良好，由底部向上逐次减少。

2. 玻璃毛细吸管法：

在溶化冷至45℃的琼脂培养基内，接入稀释至一定浓度的菌悬液，混均。然后，吸入无菌的玻璃毛细管内，两端用无菌的棉花堵塞，让其自然凝固，或立即放入冷水内。经适温培养后，只计算管的中端的菌落。应用此法一般可得到单个菌落，因此适用于厌氧菌的分离纯化。

3. 凡士林隔绝空气法：

将培养基装入试管内（最好为20×1.3厘米的试管，装量为1/2），灭菌后，再放入蒸汽锅内加热半小时，或在沸水中煮沸5分钟，以完全排除培养基内的氧气。取少量无菌的溶化凡士林，放在培养基的表面，并迅速冷却，使其培养基与空气隔绝。接种时，把试管在火焰上均匀加热，使凡士林溶化，然后用无菌毛细吸管种入菌液。但产气的厌氧菌不宜用此法培养，因产生的气体可把凡士林冲破。

4. 液体深层静止培养法：

此法是利用深层的液体造成欠氧的条件。因操作简单方便，所以在生产中多用此法。通常发酵容器的装量系数以95%为宜，灭菌后即可接入菌种，适温静止培养。培养容器小至三角瓶，大至发酵罐。

5. 添加还原剂吸收氧：

（1）在半固体培养基中加入1~2%的葡萄糖，或0.1%的硫化甘醇酸钠、0.1%的抗坏血酸等还原剂。使用前应把培养基放在沸水中煮沸5~10分钟，以除去溶入的氧气。冷却后接种。

（2）碎肉培养基：

因为无菌组织碎肉中含有还原物质，所以装入试管后，管底可保持无氧状态。碎内组织还原作用的强弱，可由培养基下层变为粉红色的深浅而得知（是由于血红素还原的结果）。

（3）在培养基中添加薄铁片：在肉汁蛋白胨水培养基中加入薄铁片（还原剂），也可制成厌氧培养基。其薄铁片为含碳量0.25%以下的轻钢，大小为25×3毫米左右。接种前，将培养基放入沸水中煮沸5~10分钟，冷却后，再放入无菌的薄铁片。接种方法同前。

二、造成无氧环境

1. 吸收氧气法：

（1）黄磷法：

在可密封的玻璃容器底部装水，上放搁板一块，把已经接种的培养皿用纸包好，放在搁板上。在容器的上部放一个铺有硫酸钙的无盖培养皿，把黄磷放在里面，用烧红的接种针接触黄磷点燃，马上密封容器。黄磷燃烧吸收氧气，则使容器内造成无氧环境。生成的氧化磷（ P_2O_5 、 P_2O_3 ）被下面的水吸收，据计算，一升容积的厌气培养容器，约需黄磷1克。

（2）Buchner氏法：

此法是利用焦性没食子酸及氢氧化钠除去氧气。将焦性没食子酸与氢氧化钠混合后，立即吸收氧气成为深褐色的混合物。一般试管培养，可把试管直接装入Buchner管内（图1）。Buchner管是一种厚壁玻璃管，规格为22×2.5厘米，下端收缩，使装入的试管不致达到底部，管口有橡皮塞。在此管底部加入少许固体焦性没食子酸，然后加入氢氧化钠溶液，管口立即用橡皮塞塞好，即可进行厌氧培养。若用于培养皿平板培养，则可以干燥器代替Buch-

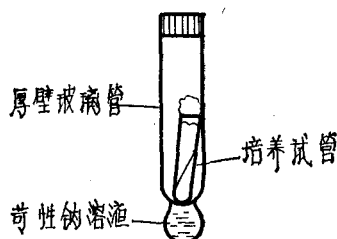


图1 Buchner氏管厌氧培养

ner氏管。在100ml的容器内，约需加焦性没食子酸和氢氧化钠各1克。

（3）Zinsser氏法：

此法适于进行培养皿的平板厌氧培养。用2个结晶皿，其直径一个为5厘米，另一个为9厘米，其高度约为2.5厘米。灭菌后，将含葡萄糖琼脂培养基倒入小皿内，冷凝后，将菌种接种在平板上。在大皿内加入少许固体焦性没食子酸，再将小皿倒盖其中，并迅速注入5%氢氧化钠于两个皿之间，直至高1.3厘米时为止。当焦性没食子酸溶解时，立即加入液体石蜡于氢氧化钠液体的面上，使之与空气迅速隔绝。

2. 氢气置换法：

此法主要是利用墨-菲(Meintosh-Fildes)二氏厌氧培养罐。操作简易，且可借次甲兰指示剂测知罐内厌氧的程度。罐内装有催化剂钯或铂，使氧与氢缓慢化合成水，以除去氧气，从而达到罐内无氧的环境。墨-菲二氏厌氧培养罐的装置如图2所示。

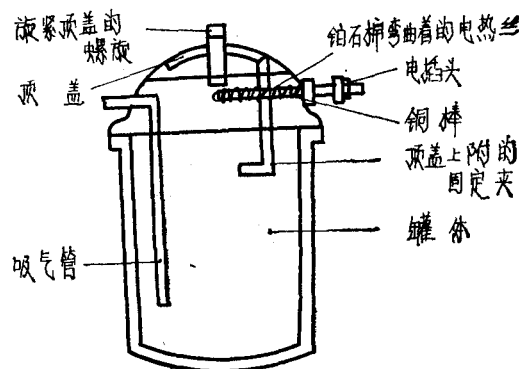


图2 厌氧培养罐构造示意图

罐体是由厚壁玻璃或金属制成，罐盖以螺旋夹夹紧，使之呈密闭容器，盖上有吸（进）气管一根，以备抽气或导入氢气。盖上还悬有玻璃或磁质中轴一个，两端用铜丝使之与盖上的电极相连，并在四周绕以海绵钯。

使用时，将平板或斜面培养物及指示剂放入罐内。

指示剂是由下列三种溶液混合而制成：0.1N的NaOH 6毫升，加水至10毫升；葡萄

糖 6 克，加水至 100 毫升，并加入结晶射香草酚一小块；0.5 % 次甲兰水溶液 3 毫升，加水至 100 毫升。

把以上三种溶液混合、煮沸，使呈无色，立即放入罐内。指示剂在罐内应始终保持无色，仅在液面上呈浅蓝色，但通电后蓝色又逐渐消失。

将罐盖向下夹紧（联同氢气供应装置），然后通入电流，使镀钨石棉炽热。罐内氢气和氧气即缓缓化合成水，而罐内被氢气所代替，大约 20 分钟后，罐内氧气已全部耗尽，关闭活门。若罐内次甲蓝指示剂保持无色，则表明罐内为完全无氧状态。最后，将罐置于适温中培养。

此外，为防止通电时玻璃罐爆炸，可将罐放入木箱内，再进行通电，以保证安全。

3. 抽真空法：

将平板培养物放入真空干燥器内，抽取最高度的真空，进行厌氧培养。此法虽然很简单，但在精密的实验中多不常用，原因是：经抽真空后，常常会使倒放在容器内的平板下坠，运动菌易产生游散生长；平板经长时间培养后，琼脂易干固；产气菌易使琼脂冲破。为了克服以上的缺点，抽真空后可充以惰性气体（如氢气、氮气等），但必须要把充入的惰性气体中的氧气除掉，如用焦性没食子酸除氧。

4. 生物学培养法

（1）厌氧菌与好氧菌共同培养

将固体培养基平板，用灭菌刀由中央沿直径切宽约 1 厘米的一条，一半接种好氧菌，另一半接种厌氧菌，盖好皿盖，以溶化石蜡封固边缘。利用好氧菌慢慢地把皿中的氧气耗掉，给厌氧菌造成无氧的环境。

（2）利用新鲜的植物组织：

在普通干燥器或带磨口塞的广口瓶内，放入切碎的新鲜生萝卜或土豆等植物组织。如果用土豆，每升容积约需 50 克。然后把接种的斜面或平板放入容器内，密封。利用新鲜植物组织的呼吸作用，吸收氧气，放出 CO_2 ，以造成无氧的环境。

火腿切片包装的研究

北京市食品研究所 火腿包装研究组

一、概述

食品包装不仅可以保鲜耐贮，而且还可以美化商品、宣传商品，起到无声推销员的作用。我们将北京火腿切成片状，分别以 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 以及 1 斤装进行包装试验，研究合理工艺条件，探索影响质量的因素，现将试验结果分述如下：

二、条件与设备

（一）试验条件

为确保产品切片、包装过程中不受污染，我们对操作间进行了严格控制：操作间用油漆粉刷；使用前用硫磺、甲醛熏蒸消毒；用甲酚皂消毒液对空气消毒；30W 紫外线灯照射 20~30 分钟；各种设备、器具用高温或酒精消毒；工作人员服装消毒。

经上述消毒处理后，包装间微生物基本控制住（详见表 1）。

包装间微生物情况 表 1

测定时间	测定位置	测定次数	每 M^3 细菌数
5分	操作台中间	4	0
10分	操作台中间	2	0
15分	操作台中间	2	1

注：包装间温度 20~27℃；
包装间相对湿度 75~80%。

（二）材料和设备

1. 紫外线杀菌灯 30W（室内空气消毒）；
2. 无臭氧紫外线灯 30W（食品消毒）；