

PDA 培养基的微波灭菌研究

董洪梅,王新风

(江苏淮阴师范学院生物系, 淮安 223300)

摘要:微波灭菌具有低成本、短时间、高效率、处理后无污染等优点。采用微波间隙灭菌法,在微波强度 P50, 灭菌时间 10 min(分钟), 载量为 200 ml(毫升)培养基的情况下,可有效地解决目前微波灭菌存在的灭菌不彻底现象。且灭菌后的培养基 pH 变化较小,营养成分破坏很少,有利于菌丝的生长。

关键词: PDA; 培养基; 微波; 灭菌
中图分类号: S603.6 **文献标识码:** B
文章编号: 1001-0009(2005)01-0071-02

PDA 培养基是实验室里使用最普遍的真菌培养基。它也被广泛应用在食用菌母种的分离和培养上。众所周知,培养基的灭菌效果会直接影响到食用菌母种的分离和培养。一般情况下,实验室里均采用高压蒸汽灭菌法,其法灭菌彻底,不易污染,但却费工、费时,特别是许多栽培户,因无高压蒸汽灭菌锅而无法进行上述操作。为寻找方便、快捷、可靠和低成本的方法,我们在王鲁嘉^[1]、谢昌华^[2]等人的研究基础上,采用家用微波炉对培养基进行灭菌,并与高压蒸汽灭菌法比较,探讨了微波灭菌对 PDA 培养基的灭菌效果和对培养基温度、pH、失水率及菌丝生长的影响。

微波灭菌的原理是利用微波的介质加热特性,对非金属材料物品进行短时辐射(非电离辐射)处理以达到灭菌目的。据 Olsen 报道,在面包上发育的霉菌孢子(黑曲霉、青霉、镰刀霉),经微波照射 2 min(分钟)后,温度升至 65℃,接种的孢子全部死亡。而用一般的加热处理方法,即使在升到 65℃之后再加热 2 min(分钟),也看不到同样的效果^[1]。H. Jory 和 C. Will 指出曲霉和青霉的热死点为 68℃~71℃范围内保持 20 min(分钟),微波处理面包 5 min(分钟)最高温度达 68℃左右,可以在相当长的保存期内不生霉^[1]。但王鲁嘉等也报道,微波低温短时辐射(几十秒钟),对细菌、霉菌、放线菌、酵母菌较敏感,对高温细菌芽孢杀灭效果较差^[1]。实验中我们发现采用间隙微波灭菌法,在微波强度 P50 灭菌时间 10 min(分钟)或微波强度 P30 灭菌时间 16 min(分钟)后,可达到最佳的灭菌效果。

1 材料和方法

1.1 菌种

平菇、秀珍菇、杏鲍菇、白灵菇(本室保藏,购自华中农业大学菌种实验中心)。

1.2 PDA 固体培养基的配制

配方: 去皮新鲜马铃薯 200 g(克),蔗糖 20 g(克),琼脂 15 g(克),水 1 000 ml(毫升),pH 自然。将配好的培养基趁热分装于 250 ml(毫升)锥形瓶中,每只 100 ml(毫升),塞好棉塞,用报纸扎好瓶口,备用。

* 基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金资助项目(02KJD10008)
收稿日期: 2004-09-30

1.3 仪器

KTP21B-AE, 2450MHE, 800W 美的微波炉(广东顺德); PHS-3C 精密 pH 计(雷磁); Sartorius BL310 电子天平, YXQ-SG46-280S 手提压力蒸汽灭菌器, HZQ-F160 全温震荡培养箱(哈东联), 温度计。

1.4 试验方法

将分装于锥形瓶中供试用的培养基分两种方法灭菌。对照组: 用高压灭菌器于 0.1035 MPa, 121℃ 灭菌 20 min(分钟); 实验组: 两只一组置于微波炉内, 采用间隙灭菌法(参照常温间隙灭菌法), 在微波强度 P50 和 P30 两种条件下, 分别灭菌 8 min, 10 min, 12 min, 14 min, 16 min, 18 min(分钟)。灭菌后立即取出, 各处理组取 3 瓶培养基, 迅速用温度计测定其温度, 在培养基温度降至 55℃ 时称重, 计算失水率并用酸度计测定其酸碱度, 另取上述灭菌处理各组 3 瓶在 37℃ 条件下培养 24 h(小时)观察并记录其灭菌效果。微波灭菌培养基对常见食用菌菌丝生长的影响实验采用平板测菌丝生长速率法, 既在平板中央接上相同生长势的 5 mm×5 mm(毫米)大小的菌种, 25℃ 培养 3 天后, 每天都测其菌落的直径, 实验重复 3 次, 统计其平均值与标准偏差(X±sd)。

2 结果

2.1 微波强度和作用时间对培养基灭菌效果的影响

由表 1 可知, 在经微波强度 P50 灭菌时间 10 min(分钟)和微波强度 P30 灭菌时间 16 min(分钟)的间隙灭菌后, 经 37℃ 培养 24 h(小时)观察发现培养基表面无杂菌生长, 室温放置 7 d(天)也无杂菌生长。

表 1 微波强度和作用时间对培养基灭菌效果的影响

微波强度	8min			10min			12min			14min			16min			18min		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
P=50	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P=30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-

注: “+”: 培养基灭菌不彻底, 有杂菌生长; “-”: 培养基灭菌彻底, 无杂菌生长。

2.2 微波强度和作用时间对培养基温度的影响

由图 1 可知, 在微波强度 P50 灭菌时间 8 min~16 min(分钟)的情况下, 测得实验组微波灭菌处理后每次培养基的平均温度分别为 96.5℃、97.3℃、98℃、99℃和 99.3℃; 在微波强度 P30 灭菌时间 10 min~18 min(分钟)的情况下, 测得实验组微波灭菌处理后培养基的每次平均温度分别为 81.3℃、91.3℃、95.7℃、97.3℃和 98.8℃。

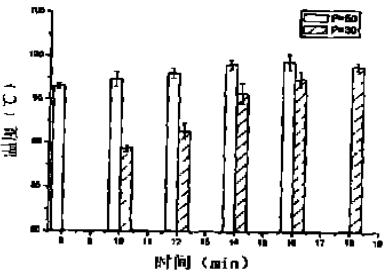


图 1 微波强度和作用时间对培养基温度的影响

2.3 微波强度和作用时间对培养基 pH 值的影响

由图 2 可知, 在微波强度 P50 灭菌时间 8 min~16 min(分钟)的情况下, 用酸度计测得实验组微波灭菌处理后培养基的平均 pH 随着灭菌时间的延长呈负相关, 其 pH 分别为 7.54、7.45、7.43、7.42 和 7.38; 在微波强度 P30 灭菌时间为

10 min~18 min(分钟)的情况下,测得实验组微波灭菌处理后培养基的平均 pH 也呈下降趋势,分别为 7.50、7.49、7.48、7.46 和 7.42。而对照组在 0.1035 MP 121 °C 高压蒸汽灭菌和培养基的 pH 为 6.9~7.0。

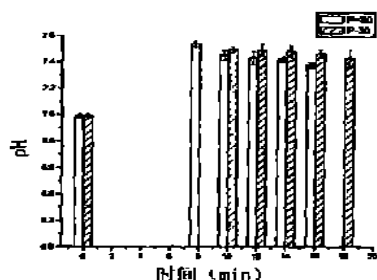


图2 微波强度和作用时间对培养基 pH 值的影响(0 为对照组)

2.4 微波强度和作用时间对培养基失水率的影响

由图 3 可知,在微波强度 P50 灭菌 8 min~16 min(分钟)后,自然冷却到室温的情况下,每次测得实验组微波灭菌处理后培养基的平均失水率与灭菌时间呈正相关,分别为 1.8%、5.6%、10.1%、12.6% 和 15.9%;在微波强度 P30 灭菌时间 10 min~18 min(分钟)时,每次测得实验组微波灭菌处理后

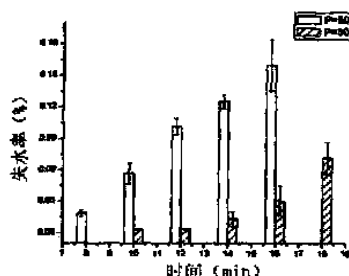


图3 微波强度和作用时间对培养基失水率的影响

2.5 微波灭菌的培养基与对照组的生长试验

取 P50, 10 min(分钟)采用间隙灭菌的处理组培养基加热融化,无菌条件下倒平板(培养皿为直径 90 mm(毫米)),待其冷却后接上 5 mm×5 mm(毫米)大小的菌种块(平菇、袖珍菇、大球盖菇和杏鲍菇),置 25 °C 培养箱中培养,以高压蒸汽灭菌为对照。3 d(天)后,每隔 24 h(小时)测其菌落的直径(做 3 组重复,取 $\bar{X} \pm sd$),结果见表 2。

不同菌种在两种灭菌处理的培养基上生长时菌落直径(mm)比较($\bar{X} \pm sd$)

菌种	3d		4d		5d		6d		7d	
	高压灭菌	微波灭菌	高压灭菌	微波灭菌	高压灭菌	微波灭菌	高压灭菌	微波灭菌	高压灭菌	微波灭菌
杏鲍菇	23.83±4.65	22.83±3.01	33.83±4.01	35.5±3.28	43.33±2.84	44.3±3.22	55.67±5.03	57.67±3.51	66±2	70.67±2.52
大球盖菇	17.17±0.29	17.5±0.5	23.67±1.53	24±1	32.67±1.54	33.33±1.53	39.33±3.51	40±1.73	46.83±4.65	49.33±3.51
平菇	21±1	22.33±0.58	34.5±1.5	36.33±1.53	46.33±2.52	48.33±1.15	62.67±2.52	64.67±1.53	73±2.65	74.83±0.76
秀珍菇	20.67±3.21	20.83±2.47	34.83±1.04	35.33±0.58	45±2.65	48.33±1.15	61.33±1.53	64.17±1.26	76.33±2.52	78.67±2.52

3 讨论

PDA 培养基采用微波灭菌,可在较短的时间内达到高效的灭菌效果(表 1)。在实验中我们也发现,通常情况下,采用微波强度 P50 灭菌时间 10 min(分钟)或 P30 灭菌时间 16 min(分钟)就可达到满意的灭菌效果,但在多次重复中也出现了一些实验组灭菌不彻底的现象,分析原因可能是因为芽孢存在,影响了灭菌效果。我们采用间歇微波灭菌法后,取得了较理想的灭菌效果。建议接种前检验灭菌效果。

高压蒸汽灭菌,会引起培养基的 pH 值出现较大幅度的下降,Ball 认为在高温灭菌时,培养基中蔗糖会水解成果糖和葡萄糖,而葡萄糖进一步变成葡萄糖酸,从而导致了培养基 pH 值的下降^[4,5]。实验中我们测得经高压蒸汽灭菌,培养基的 pH 值由未灭菌前的 pH7.68 降至 6.97 至 7.01,降幅 pH 达 0.67~0.71。由图 2 可知,微波灭菌前后的 PDA 培养基的 pH 值变化不大,实验中在达到完全灭菌时(P50 10 min(分钟)或 P30 16 min(分钟)),其 pH 为 7.45~7.46,降幅(pH)只为 0.13~0.2。因此我们认为采用微波灭菌对培养基的 pH 值影响较小,可不考虑灭菌对 pH 值影响。

PDA 培养基采用微波灭菌后,有利于菌丝的萌发和生长(表 2)。这是因为高压蒸汽灭菌的过程中,高温破坏了 PDA 培养基里的蔗糖或葡萄糖等营养成分以及维生素等生长因子,甚至还会产生对培养物有害的酚类物质^[6]。而微波灭菌除了热效应外还有非热效应作用^[7],因而其灭菌时升温时间短,灭菌温度低,从而减低了培养基内各种营养成份的热破坏,有利于促进微生物的生长^[2]。

微波灭菌的效果与炉内培养基的载量有直接的影响,实

验中我们分别采用 1 瓶、2 瓶、3 瓶以及每瓶装入培养基量为 100 ml、150 ml 和 200 ml(毫升),重复 3 次,灭菌时间同表 1,具灭菌效果差异很大,载量越大其灭菌效果越差。这是因为微波辐射能虽然能直接进入样品内部,但进入内部的深度并非是有限的,电磁波在穿透样品的过程中能量被不断的吸收并被转化为热能,场强和功率逐渐减弱的缘故。载量太少时,培养基会出现爆沸现象,导致棉塞污染,失水率增加。

微波灭菌与常规的高压蒸汽灭菌相比,其培养基的水分散失率要高许多,且失水率与灭菌时间呈正相关。采用间隙灭菌法时,在 P50 灭菌时间 10 min(分钟)情况下,每灭菌一次的水分散失率最高可达 10% 左右。因此,在采用微波灭菌时,在配制培养基过程中可根据需要提前补充足够的水分,以维持正常的水分需求。

参考文献:

- [1] 王鲁嘉.微波灭菌试验及分析[J].云南大学学报(自然科学版),1998,20(1):34~36.
- [2] 谢吕华,李凤英,孔祥华等.微波炉用于培养基灭菌研究[J].滨州医学院学报,1998,21(4):330.
- [3] 姚开,武丽荣,谭敏.微波加热条件下的细菌死亡特性值研究[J].食品科学,1999,(4):20~23.
- [4] 陈永勤.MS 培养基凝固效果和高温灭菌后 pH 值变化的研究[J].湖北大学学报(自然科学版),2001,23(3):280~283.
- [5] Ball E.Hydrolysis of sucros by autoclaving media—aneglected aspect in the technique of culture of plant tissues[J].Bell Torrey Bot Club,1953,80:409~411.
- [6] 梁海曼.高压灭菌对培养基成分的影响[J].植物生理学通讯,1995,31(5):389~392.
- [7] 金钦汉.微波化学[M].北京:科学出版社,1999,320~321.