

腐败梭菌产生毒素的初步试验

文希喆 王太健

(农业部兽医药品监察所, 北京)

据报道^[1], 腐败梭菌 (*Clostridium septicum*) 产生 α 、 β 、 γ 和 δ 四种毒素, 其中以 α 毒素为主。在使用厌气肉肝汤和肉肝胃酶消化汤培养时所产毒素甚微^[2]。为了增加毒素的毒性, 提高快疫苗苗的效力, 试用胰酶消化汤培养, 结果每毫升该菌培养物的离心上清液, 毒性可达小白鼠最小致死量的 1 千倍。

材料和方法

1. 菌种: 腐败梭菌 C55-1, 将冻干保存的菌种接种于厌气肉肝汤中, 37°C 培养 24 小时。

2. 培养基: 胰酶消化汤为基础培养基。

(1) 胨水: 碎牛肉 180 克加蒸馏水 500 毫

升, 加温至 80°C, 再加 500 毫升蒸馏水, 降温至 50°C 左右, 调 pH 8.2—8.4, 加足胰酶粉或胰浸液, 置 48—50°C 水浴中, 第 1 小时每 15 分钟调 pH 一次, 第 2 小时每隔 30 分钟调 pH 一次, 至 pH 稳定在 8.0 左右, 消化 5.5 小时后, 加 1% 冰醋酸, 加热 95°C 以上停止消化。过滤。

(2) 牛肉水: 碎牛肉 500 克加蒸馏水 1000 毫升, 置 5—10°C 浸泡 15—18 小时, 煮沸 20—30 分钟, 过滤。

培养基配制: 将胨水加温至 80°C, 调 pH 7—7.2 (B. T. B.), 加热 100°C 5 分钟, 加等量牛肉水混合, 按总量加 0.5% Na_2HPO_4 及 KH_2PO_4 , 加热 100°C 1 分钟, 调 pH 8—8.2, 再加

热 100℃20 分钟, 过滤加 0.1% 活性炭。分装, 灭菌。

另配 25% 葡萄糖溶液, 灭菌, 在接种前加入培养基内, 使其最终浓度为 1%。

3. 试验动物: 体重 16—20 克的小白鼠。

4. 毒素测定: 培养菌液用 3000 转/分, 离心 30 分钟, 取上清液用生理盐水稀释, 每稀释度取 0.2 毫升静脉注射小白鼠, 观察 2 天, 计算毒素的最小致死量 (MLD)。毒素的毒力以最小致死量的倒数表示。

试验结果

一、几种常用培养基对产生毒素的作用

腐败梭菌 C55-1 在厌氧肉肝汤和肉肝胃酶消化汤中产生的毒素一般在 10 MLD/毫升水平。在胰酶消化汤中则产生 200 MLD/毫升上下, 比前两种培养基产生更强的毒素。

二、葡萄糖对菌生长的作用

在基础胰酶消化汤中加 1% 葡萄糖, 于 37℃ 培养 8 小时生长产气, 20 小时生长良好产气旺盛; 不加葡萄糖时, 培养 20 小时刚刚生长, 不产气。说明葡萄糖对腐败梭菌的生长是很重要的。

三、硫酸锌和蛋白胨对产生毒素的作用

腐败梭菌在基础胰酶消化汤中产生的毒素, 一般为每毫升 200 MLD, 少数为 100 或 400 MLD。在培养基中加入 1.4 微克/毫升硫酸锌, 产生的毒素每毫升上清液可达 1000 MLD, 比不加硫酸锌的培养基提高 2.5—10 倍。在基础胰酶消化汤中加入 1% 蛋白胨, 其作用与前者基本相同, 说明两者均有增强腐败梭菌产生毒素的作用。

将 1.4 微克/毫升硫酸锌和 1% 蛋白胨同时加入基础胰酶消化汤中, 结果, 每毫升培养物上清液的毒素仍在 1000 MLD 上下, 说明两者同时加入对此菌产生毒素没有协同作用。

四、肝对产生毒素的作用

在制造胰酶消化汤时加入 5% 肝脏同时消化, 结果与无肝的基础胰酶消化汤产生的毒素相似, 均为 400 MLD/毫升, 看来肝消化成分未

提高本菌产生毒素的作用。

五、pH、温度、时间对腐败梭菌产生毒素的作用(见图 1)

1. pH: 调含 1.4 微克/毫升硫酸锌的胰酶消化汤 pH 为 7.2, 7.6, 8.0, 8.4 和 8.8 等五种, 试验结果, 本菌在 pH 7.2, 7.6 和 8.0 的培养基中生长较快, 9—10 小时已开始生长, pH 8.4 生长略迟, pH 8.8 在 20 小时刚见生长。pH 8.0 产毒素最高。

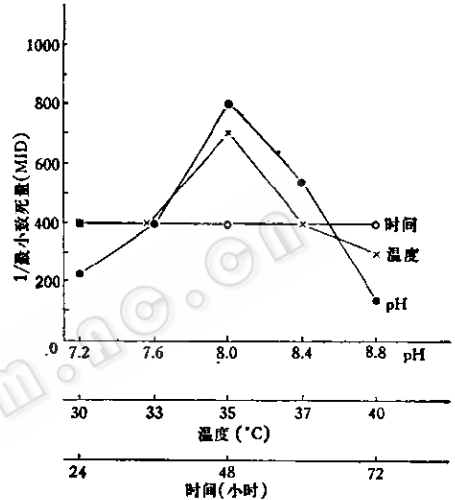


图 1 pH、温度、时间对腐败梭菌产生毒素的作用

2. 温度: 在 pH 8.0 含 1.4 微克/毫升硫酸锌的胰酶消化汤中, 接种腐败梭菌后, 分别放 30、33、35、37 和 40℃ 温箱中培养。结果, 30℃ 培养的 24 小时刚见生长, 33℃ 培养的生长略快, 35 和 37℃ 培养的 12 小时开始生长, 40℃ 培养的生长更早些, 在产毒素方面, 以 35℃ 最合适。

3. 时间: 腐败梭菌接种后, 37℃ 培养 24、48、72 小时, 取出测毒素。结果产毒素相差不大, 但培养在 48 和 72 小时有偏高的趋势。

六、毒素的保存

腐败梭菌胰酶消化汤培养物滤液, 置普通冰箱保存 280 天后, 静脉注射小白鼠和家兔, 测毒。结果对两种动物的最小致死量 (MLD) 与开始试验时大致相同。毒力变化不大。腐败梭菌所产毒素被胰酶灭活。

讨 论

1. 本试验结果说明, 在胰酶消化汤中加入硫酸锌和蛋白胨均有提高腐败梭菌产生毒素的作用, 从经济价值和使用方便考虑, 以用硫酸锌最好, 其作用很可能与 Sato, H. 等^[3]报道的相似。

2. 腐败梭菌产生毒素的适宜温度, 以 35℃ 最好, 有时在 37℃ 培养相差也不大, 在培养时间方面, 虽然经 24, 48 和 72 小时培养产生毒

素无明显差别, 但 48 和 72 小时有略高的趋势, 故初步认为 35℃ 培养 48 小时会更适合本菌产生毒素。

参 考 文 献

- [1] Buxton, A. and G. Fraser: *Animal Microbiology*, vol. 1 Immunol. Bacteriol. Mycology Diseases of Fish and Laboratory Methods, Oxford, Eng., Blackwell, 1977, pp. 214—216.
- [2] 房晓文, 文希喆, 张宗礼: 畜牧兽医学报, 7 (2): 135—142, 1964.
- [3] Sato, H. et al.: *Infection and Immunity*, 20: 325—333, 1978.