

自动控制培养基 pH 提高 D 型产气荚膜梭菌产毒素能力的研究

文希喆 丘惠深 王泰健 佐继荣

(农业部兽医药品监察所,北京)

参考 H. Pivnick 等^[1]的报告,用自动控制培养基 pH (以下简称自控 pH) 的方法,培养 D 型产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*, 魏氏梭菌), 以期提高毒素产量, 增强肠毒血症菌苗的效力。

材 料 和 方 法

1. 培养基: 含 1% 糊精(工业用或化学纯)的肉肝胃酶消化汤, 或再加入 1% 葡萄糖。

2. 菌株: 产气荚膜梭菌 C₆₀₋₂。用上述培养基培养 16—20h, 作为种子液。

3. 培养装置: 5L 玻璃发酵罐(见图 1)。

电极采用 305-2 玻璃电极和 330 甘汞电极, 显示控制仪表为 G-21B 型酸度计和 XWC-101 型自动平衡记录仪, 对 pH 值连续自动测量、控制及记录。由受控的电磁阀自动向培养

液中加 NaOH, 调节 pH。

4. 培养条件: 温度 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 搅拌速度 160 转/分, pH 7.0 ± 0.1 , 时间 16—20h。

5. 菌液浓度: 用生理盐水将菌液稀释 4 倍。72 型分光光度计, 650nm 波长测定 O.D 值。

6. 毒素测定: 菌液加 1% 胰酶, 37°C 活化 60 分钟, 3000 转/分离心 30 分钟, 取上清液用生理盐水稀释, 静脉注射小白鼠, 测定 MLD。毒素的毒价用小白鼠的 MLD 的倒数表示。

试 验 结 果

1. 自动控制培养基 pH 提高毒素产量: 通过 15 批培养试验, 自控 pH 比不自控 pH (以下简称对照), 均显著地提高了产气荚膜梭菌的毒素产量, 低者为 2 倍, 最高的达 100 倍, 平均

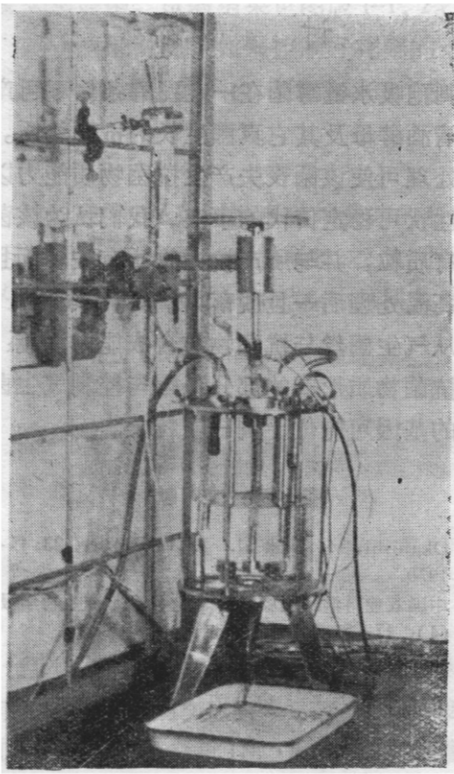


图1 自动控制的发酵罐

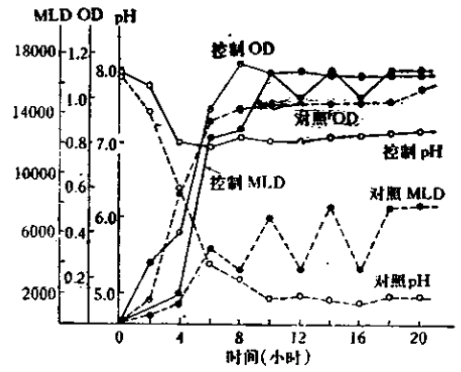


图2 自控 pH 和对照的培养结果

提高 5.6 倍。

2. 培养过程中培养基 pH 的变化: 接种后 3h, 培养基的 pH 由开始的 7.8 下降至 7.0, 即开始自动加碱, 调节并维持 pH 在 7.0—7.2。

对照在接种后 2h pH 开始下降, 2—6h 迅速下降, 由开始培养的 pH 7.8 降至 5.5, 10h 下降至 5.0, 一直至培养结束不变。结果见图 2。

3. 细菌的生长浓度: 图 2 表明, 培养液的

浓度, 不论自控 pH 或对照, 在接种后约 2h 迅速增加, 7h 达高峰, 然后基本保持同一水平, 直至培养结束。从菌液浓度看, 自控 pH 比对照并没有显著增加, 但毒素的产量却相差很大。表明毒素的产量与细菌的生长浓度关系不大。本试验中使用的糊精, 工业的比化学纯的更适合于产气荚膜梭菌产生毒素。试验中的 4 批含工业糊精的培养基, 自控 pH 平均产毒素 20000 MLD, 对照产毒素 7550MLD。而 6 批含化学纯糊精的培养基, 自控 pH 的平均产毒素 13333 MLD, 对照产毒素 600MLD。不论是自控 pH 或对照, 含工业糊精培养基产生的毒素均比含化学纯糊精的培养基滴度高, 对照相差更大。自控 pH 培养时, 含工业糊精的培养基产毒素比较稳定, 而含化学纯糊精的培养基产毒素不够稳定。见表 1。

4. 葡萄糖与产生毒素的关系: 在含糊精的

表1 自控 pH 时毒素的产生水平

培养次数	培养基中主要成分	毒素产量		
		自控 pH	对 照	提高倍数
1	工业糊精	20000	10000	2
4	工业糊精	20000	200	100
5	化学纯糊精	40000	1000	40
7	化学纯糊精	2000	1000	2
11	工业糊精加葡萄糖	10000	100	100
12	化学纯糊精加葡萄糖	10000	400	25

培养基中加 1% 葡萄糖, 共试验 5 批, 平均自控 pH 条件的产毒素 8800MLD, 对照为 300MLD。而只含糊精的培养基, 自控 pH 条件平均产毒

素 8800 MLD, 对照为 480MLD。自控 pH 时, 两种培养基产生的毒素相等。在对照中, 证明葡萄糖无助于毒素的产生反而不利于产生毒素。

讨 论

试验表明,工业糊精比化学纯糊精更适合于产气荚膜梭菌产生毒素,这可能是使用的化学纯糊精的差别所致。其原因有待探讨。

对照中,产气荚膜梭菌产生的毒素平均滴度,含工业糊精的培养基为 7550MLD,含化学纯糊精的培养基为 600MLD,含糊精和葡萄糖的培养基为 300MLD。自控 pH 时,毒素的平均滴度分别为 20000, 13333 和 8800MLD。自控 pH 比对照分别提高 2.56, 20.65 和 29.33 倍。

由此可看出对照的产生毒素滴度越低的培养基,自控 pH 培养收到的效果越好,如在大生产中应用此法,可能对提高菌苗效力更为有利。

对照和加葡萄糖的培养基,从在培养过程中 pH 的变化看,毒素产量的提高,主要在于控制 pH, pH 值低阻碍毒素的产生。培养基成分与产生毒素有关。因此改变其他条件,可能进一步提高毒素产量。

参 考 文 献

- [1] Hilliard Pivnick et al.: *Canadian Journal of Microbiology*, 11: 45—55, 1965