

一株 A 型肉毒梭状芽孢杆菌的分离与鉴定

刘世贵 伍铁桥 杨志荣 袁 涛

(四川大学生物工程研究所, 成都 610064)

从四川成都、重庆、若尔盖, 新疆乌鲁木齐, 宁夏固原共采集土样 319 份进行肉毒梭状芽孢杆菌的分离。在若尔盖土样中分离到一株厌氧芽孢杆菌, 按《伯杰细菌鉴定手册》(第八版) 的方法进行了生物学测定、生理生化试验, 并测定了其 DNA 中 G+C mol 为 24.9%, 鉴定为肉毒梭状芽孢杆菌, 经血清学试验进一步鉴定为 A 型肉毒梭菌, 编号为 As-3。

关键词 肉毒梭状芽孢杆菌; 分离与鉴定

肉毒梭状芽孢杆菌 (*Clostridium botulinum* 以下简称肉毒梭菌) 的分离与鉴定是“生化灭鼠剂研制与应用”课题 * 的主要内容。“生化灭鼠剂”是以 A 型肉毒毒素为主体成分而研制成功的一种新型灭鼠剂。本所从成都、重庆、若尔盖、乌鲁木齐及固原地区采集了 319 份土样, 经初检和确证试验, 检验出肉毒梭菌阳性样品 17 份。经反复分离、纯化, 得到一株纯化的肉毒梭菌, 经生物学、生理生化及血清学试验, 鉴定为 A 型肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum* serotype A), 编号为 As-3。现将其分离鉴定过程以及与参考菌株 C 型肉毒梭菌 CMCC(CB)-64402(6514) 的有关比较结果, 报告如下。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 土样: 成都、重庆、若尔盖、乌鲁木齐、固原采集土样 319 份。
2. 参考菌株: 由卫生部兰州生物制品研究所提供。
3. 标准诊断血清: 卫生部兰州生物制品研究所生产。
4. 昆明系小白鼠: 由成都华西医科大学、卫生部成都生物制品研究所提供。
5. 培养基:

(1) 半固体庖肉培养基 (SSCM)(%): 牛肉汁 50, 葡萄糖 0.5, 明胶 0.4, 琼脂 0.1, 牛肉胰酶消化液 50, pH 8.2, 分装于装有新鲜牛肉块的试管中, 凡士林封口, 112 °C 灭菌 30 分钟。

(2) TYG 培养基 (%): 胰酶解酪蛋白 (Trypticase) 3, 酵母提取物 (Yeast extract) 2, 葡萄糖 0.5, 盐酸半胱氨酸 0.1, pH 7.4, 液体石蜡封口, 112 °C 灭菌 30 分钟。

(3) 卵黄琼脂培养基 (%): 蛋白胨 1.5, NaCl 0.5, 琼脂粉 2.0, 牛肉汁 100, pH 7.5, 112 °C 灭菌 15 分钟, 临用时加入已灭菌的 50% 葡萄糖溶液 0.2, 50% 卵黄盐水悬液 1.5。

(4) 葡萄糖血琼脂培养基 (%): 蛋白胨 1.0, 牛肉膏 0.3, NaCl 0.5, 琼脂 0.3, pH 7.4, 121 °C 灭菌 15 分钟, 临用时加入 50% 已灭菌的葡萄糖液 4, 新鲜兔血或羊血 25。

本文于 1992 年 1 月 21 日收到。

* 国家教育委员会资助课题

(二) 方法

增菌及产毒采用 SSCM 和 TYG 培养基, 分离菌株采用葡萄糖血平板和卵黄琼脂平板, 抽气法或碱性焦性没食子酸吸氧, 34 °C 培养 2—4 天。

1. 菌种分离: 将每份土壤样品充分混匀研碎, 称取约 25g, 加入 100ml 生理盐水, 充分振荡, 静置数小时, 取上清液 6000r/min 离心 15 分钟, 收集沉淀物接种 SSCM 或 TYG 试管。每份样品接种三支, 第一支煮沸 10 分钟, 迅速冷却; 第二支 60 °C 加热 10 分钟, 迅速冷却; 第三支不处理。34 °C 培养 4—5 天, 取生长的培养液离心, 上清液用于毒素检测, 沉淀留作细菌分离。

2. 菌种纯化: 将用肉毒诊断血清和动物试验证明为阳性的培养物沉淀于 100 °C 加热 10 分钟以除去非芽孢菌, 然后用划线法和涂布法分别接种卵黄琼脂和葡萄糖血琼脂分离培养基, 于 34 °C 厌氧培养 48 小时, 并设需氧空白对照。根据菌落特征及镜检菌体形态挑选菌落, 反复接种分离平板和增菌试管, 直到镜检菌体形状、大小均一为止。

3. 培养特征观察: 将纯化的 As-3 菌株接种在卵黄平板和葡萄糖血平板上, 34 °C 培养 24 小时和 48 小时后观察菌落特征, 观察在 SSCM 和 TYG 培养基中的生长情况。

4. 芽孢耐热试验: 用增菌培养物的菌体沉淀定量接种 TYG 试管, 煮沸不同时间, 取出冷却, 于 34 °C 培养 7 天, 观察生长情况。

5. 生理生化试验: 碳水化合物发酵试验按周德庆等^[1]的方法进行, 其它生理生化试验按熊德鑫^[2]、王大帮^[3]、范秀容^[4]等的方法进行。

6. 细菌形态的电镜观察: 电镜标本的制备参照王鲁平^[5]的方法进行。

7. DNA 中 G+C 含量测定: DNA 提取参照吴鹤龄^[6]、Leonard^[7]、Michael^[8]、Mark^[9]的方法, 菌悬液中加入溶菌酶, 37 °C 处理 30 分钟, 然后加入 RNase 37 °C 处理 30 分钟, 用酚、氯仿抽提 DNA, 加入 3 mol/L NaAc, 95% 冷乙醇沉淀 DNA, 溶解于 1× SSC 缓冲液中, 检查纯度合格后热变性法测定 DNA 中 G+C 含量。

8. 毒素定型和毒力效价测定: 用标准诊断血清进行小白鼠中和试验^[10,11]对毒素定型; 将毒素用 0.2% 明胶 PBS10 倍梯度稀释, 小白鼠腹腔注射测定效价。

9. 免疫血清学试验: 参照范香容^[4]的方法, 毒素采用增菌上清液, 抗毒素采用卫生部兰州生物制品研究所生产的精制 A、B、C 型抗毒素, 扩散后的琼脂用氨基黑染色观察, 染色方法参照陈兆云^[12]等的方法。

结 果 和 讨 论

(一) 分离株的生物学特性

1. 培养特征: 在卵黄平板上 34 °C 厌氧培养 48 小时其菌落圆形, 直径约 2—5mm, 乳白色, 稍有隆起, 边缘不整齐, 呈绒毛网状, 其表面及周围有彩虹薄层。在血平板上 34 °C 厌氧培养 48 小时其菌落圆形, 直径约 2—3mm, 灰白色, 扁平, 周围有溶血环。

2. 菌体形状大小: 生长初期菌体呈杆状, 两端钝圆, 两侧平行, 菌体长 4.20—4.70 μm, 宽 1.05—1.15 μm。生长后期的菌体呈梭状, 芽孢位于次极端, 比菌体宽, 菌体长 3.50—3.67 μm, 宽 0.83—1.17 μm, 具有少量周生鞭毛, 能运动, 幼嫩菌体为革兰氏染色阳性(图 1)。

3. 芽孢耐热性: 分离株 As-3 能耐受 100 °C 煮沸 30 分钟及加热至 80 °C 60 分钟。

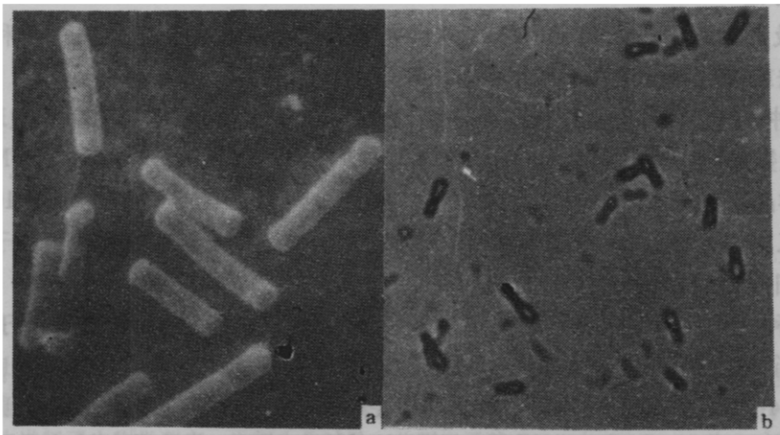


图1 分离株形态
a. 扫描电镜形态(培养 12h)(6000×) b. 光镜形态(示芽孢)(1500×)
Fig. 1 The shape of isolated strain
a. The shape under scanning electron microscope (incubated 12 h)
b. The shape under optic microscope (shows spore)

(二) 分离株的生理生化特征

1. 碳水化合物发酵：As-3 株与参考株 C6514 均能利用供试的 29 种碳水化合物中的果糖、麦芽糖、葡萄糖和甘油，参考株 C6514 还能发酵甘露糖。
2. 生化反应：As-3 株除与 C6514 株一样能产生脂酶，液化明胶，产生毒素及溶血外，还能消化酪蛋白，产生脲酶及 H₂S。

(三)DNA 中 G+C 含量测定

热变性温度法测定 As-3 株 DNA 在 25—98 ℃范围内的 A₂₆₀ 值，作图法求出 T_m 值为 79.5 ℃，据 Madel 公式计算出 G+C 含量为 24.9 mol %。

根据以上 As-3 菌株的生物学特性、生理生化特性，以及 DNA 的 G+C 百分含量，参照《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)，将 As-3 菌体鉴定为肉毒梭状芽孢杆菌 (*Clostridium botulinum*)。

(四) 分离株毒素的特性

1. 毒素定型试验：用小白鼠腹腔注射所做毒素抗毒素中和法定型结果见表 1。

表 1 As-3 菌株的定型试验结果
Table 1 The result of determination type test for As-3 strain

毒素类型 Type of toxin	毒素对照 Check of using toxin	毒素灭活对照 Check of using inactive toxin	诊断血清 Serum for diagnosis					PBS 稀释对照 Check of PBS buffer
			混合型 Type mixture	A 型 Type A	B 型 Type B	C 型 Type C	E 型 Type E	
As-3 毒素 As-3 toxin	死 D*	生 S	生 S	生 S	死 D	死 D	死 D	生 S
C6514 毒素 C6514 toxin	死 D	生 S	生 S	死 D	死 D	生 S	死 D	生 S

* D represents death ,while S represents survival.

结果表明,分离株 As-3 为肉毒梭菌,试验动物出现典型肉毒中毒症状,As-3 株产生毒素能被精制 A 型抗毒素和混合型诊断血清完全中和。As-3 株产毒能力为每毫升培养液 $7.66 \times 10^5 \text{LD}_{50}$ (腹腔注射)。

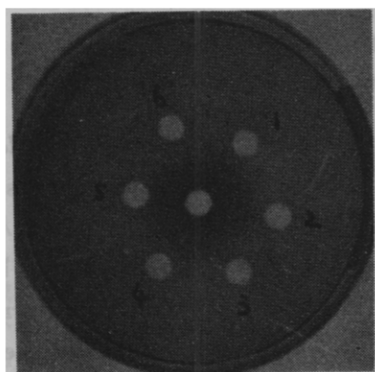


图 2 琼脂双向扩散结果 (氨基黑染色)

中孔:精制 A 型抗毒素 (1:16)

1. As-3 原毒素 2. As-3 10 倍稀释液
3. As-3 100 倍稀释液 4. C6514 原毒素
5. C6514 10 倍稀释液 6. C6514 100 倍稀释液

Fig. 2 The result of double diffusion in agar

Center spot: refined type A antiserum (1:16)

1. As-3 original toxin
- 2,3. As-3 10 and 100 times diluted toxin
4. C6514 original toxin
- 5,6. C6514 10 and 100 times diluted toxin

2. 双向琼脂扩散试验:结果见图 2,精制的 A 型抗毒素与分离株的毒素形成一条清晰的沉淀线,而不能与参考株 C6514 的毒素形成沉淀线。精制 B、E 型抗毒素也不能与 As-3 株的毒素产生沉淀线。能产生沉淀线的 A 型抗毒素最高效价为 1:16,即为 625 单位。

根据定型试验和双向琼脂扩散试验结果将 As-3 菌株鉴定为 A 型肉毒梭状芽孢杆菌 (*Clostridium botulinum* serotype A)。

肉毒梭菌的生理生化反应变化很大,不仅型间有差别,同一型不同株之间也不完全一致,本结果基本与《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)所列 A 型肉毒梭菌的生理生化特性相符。

鉴定结果表明 As-3 菌株是一株产生 A 型肉毒毒素的梭状芽孢杆菌,其产毒能力较强,是一株有较高价值的毒蛋白生产菌株。

参 考 文 献

- [1] 周德庆编:微生物实验手册,上海科学技术出版社,上海,1983 年。
- [2] 熊德鑫等:厌氧菌分离和鉴定方法,江西科学技术出版社,南昌,1985 年。
- [3] E 大相:细菌分类基础,科学出版社,北京,1977 年。
- [4] 范秀容等:微生物学实验方法,高等教育出版社,北京,1980 年。
- [5] 上鲁平等:中华微生物学和免疫学杂志,9(2):132—136,1989。
- [6] 吴鹤龄等:遗传学实验方法与技术,高等教育出版社,北京,1983 年。
- [7] Leoard, G. D. (田勇泉等译):分子生物学方法,湖南科学技术出版社,长沙,1990 年。
- [8] Micdael, J. et al.: *Appl. & Environ. Microbiol.*, 51 (1):52—56, 1986。
- [9] Mark, S. S. et al.: *ibid.*, 48(5):956—963, 1984。
- [10] 中华人民共和国卫生部:中华人民共和国国家标准,食品卫生检验方法(微生物学部分),第 1—6, 66—69 页,北京,1985 年。
- [11] 夏宏器等:肉毒中毒,新疆人民出版社,乌鲁木齐,1982 年。
- [12] 陈兆云等:微生物学通报,13 (3):141—143, 1986。
- [13] Buchanan, R. E. et al.(ed.): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974。

THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF A *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* SEROTYPE A STRAIN

Liu Shigui Wu Tieqiao Yang Zhirong Yuan Tao

(Institute of Biotechnology, Sichuan University, Chengdu 610064)

319 soil specimens were collected from different places of China for isolating *Clostridium botulinum*. A strain of *Clostridium botulinum* was isolated from a culture of soil specimens in Ruogai of Sichuan Province, the strain was called As-3.

The As-3 was identified as *Clostridium botulinum* serotype A according to its biological properties, biochemical serological and toxicological characteristics and DNA determination. Its DNA G+C mol is 24.9%. The toxin produced by As-3 strain can only be neutralized by type A antiserum.

Key words *Clostridium botulinum*; Isolation and identification