

# 全脂奶粉可改变生孢梭菌孢子的耐热性

蒋宝芳,葛爱丹,裘泽娥,黄晓珍(浙江康莱特药业有限公司,浙江 杭州 310018)

中图分类号:R927.3

文献标识码:A

文章编号:1007-7693(2005)09-0855-02

生孢梭菌孢子液可作为灭菌效力相对较低(较低的灭菌温度或较短的灭菌时间; $F_0$ 值一般控制在 $8 \sim 12$  min)的生物指示剂。商购的普通生物指示剂耐热性较高,最常见的是嗜热脂肪芽孢杆菌孢子液,一般用于验证 $F_0$ 值大于等于15 min的灭菌工艺。生孢梭菌孢子液在同等条件(相同介质和温度)下,耐热性较嗜热脂肪芽孢杆菌孢子液低, $D_{121}$ 值在 $0.8 \sim 1.5$ 分之间,而嗜热脂肪芽孢杆菌孢子液可达 $1.5 \sim 2.4$  min。所以象脂肪乳注射液等遇热不稳定的产品采用较低温度( $115 \sim 117^\circ\text{C}$ )灭菌效果验证时,可采用象生孢梭菌孢子液作为生物指示剂,单位验证产品中的孢子数量可控制在 $10^6$ 个以上,因而较直观反映实际灭菌工艺的可靠性和稳定性。

生孢梭菌作为生物指示剂时因制备要求高很难商购且用量较大,必须自己学会制备基准芽孢悬浮液,且浓度要达到 $10^8/\text{mL}$ 以上。本文以商购生孢梭菌(ATCC 7955)菌种采用自配的培养基进行培养来制备基准孢子液。通过培养液中分别用全脂或脱脂奶粉而其它培养成份均相同,利用残存概率灭菌法对所培养的孢子液在PBS及脂肪乳注射液中测D值,发现因培养基奶粉的不同,培养出的孢子液耐热性相差很大。

## 1 材料和试验设备

生孢梭菌菌种(ATCC 7955);PBS(pH7.0,磷酸二氢钾0.58g,磷酸氢二钠1.02g,氯化钠9.0g,水1000mL);20%脂肪乳注射液(浙江康莱特药业有限公司提供);大豆胰蛋白胨培养基(TSA,法国OXOID);离心机(Sigma,2K15C);恒温油浴(Fisher,3016H);厌氧罐(BBL);甲基硅油;毛细管(PY-REX);生物安全柜(日本三洋);水浴锅等。

## 2 实验方法

### 2.1 生孢梭菌孢子液的制备

2.1.1 称取清洗干净的牛心1400g,用搅拌机搅碎,加纯化水3000mL,煮沸,用无菌纱布过滤,增补纯化水将牛心液补至3000mL。

2.1.2 在3000mL牛心液中加入下列物质:蛋白胨1%,明胶1%,葡萄糖0.05%,磷酸二氢钾0.4%g,柠檬酸钠0.3%g,奶粉90g。将上述物质溶解,搅拌均匀,用5%氢氧化钠溶液调培养基的pH至 $8 \sim 9$ 。将滤渣分为10等份加入10只瓶子内,同时将配制好的培养基分装到瓶子内,每瓶为300mL,加塞轧盖(可用500 mL生理盐水瓶制备), $121^\circ\text{C}$ 灭菌20 min,室温放置一天。

2.1.3 将菌种接入每瓶培养基内,接种后的培养基先在  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  下培养 2 周,然后再放在  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  下培养 9 天。

2.1.4 培养结束后,振摇培养液,用无菌四层纱布过滤,滤除牛心渣,留取滤液。

2.1.5 将滤液在常温 2000rpm 下离心,去除沉淀,留取上清液。

2.1.6 取上清液,在离心速度为 8000 rpm,离心 5 min,去除上清液,用无菌 PBS 稀释沉淀物,再离心,反复操作几次,去除上清液,并刮去沉降物表面的黑色物质(为牛心渣),最后用 PBS 稀释沉降物得到孢子液。

2.1.7 将孢子液分装至小瓶中,  $90 \sim 95^{\circ}\text{C}$  水浴中热处理 15 min,冷却后放置  $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$  下冷藏待用。

2.2 用全脂或脱脂分别制备孢子液。

2.2.1 用荷兰乳牛全脂奶粉制备孢子液(制备三次)。

2.2.2 用安怡牌脱脂奶粉制备孢子液(制备三次)。

2.3 对用不同奶粉制备的孢子液进行 D 值(耐热性)测定,结果如表。

### 3 结果分析

3.1 相同的制备程序,两种奶粉培养的孢子液浓度都可达  $10^8/\text{mL}$ ,且在 TSA 培养基上厌氧培养菌落形态相似,看不出两者培养物的不同。

表 1 在全脂奶粉中培养的孢子液的耐热性(D 值)

Tab 1 List about dynamic adsorption experiment

| 试验溶液       | D <sub>121℃</sub> |     |     | D <sub>116℃</sub> |      |      |
|------------|-------------------|-----|-----|-------------------|------|------|
|            | 第一次               | 第二次 | 第三次 | 第一次               | 第二次  | 第三次  |
| 20% 脂肪乳注射液 | 0                 | 0   | 0   | 1.10              | 1.08 | 1.06 |
| PBS        | 0                 | 0   | 0   | 1.52              | 1.48 | 1.50 |

表 2 在脱脂奶粉中培养的孢子液的耐热性(D 值)

Tab 1 List about dynamic adsorption experiment

| 试验溶液       | D <sub>121℃</sub> |      |      | D <sub>116℃</sub> |      |      |
|------------|-------------------|------|------|-------------------|------|------|
|            | 第一次               | 第二次  | 第三次  | 第一次               | 第二次  | 第三次  |
| 20% 脂肪乳注射液 | 1.06              | 1.12 | 1.08 | 2.42              | 2.46 | 2.52 |
| PBS        | 1.46              | 1.55 | 1.48 | 3.12              | 3.15 | 3.10 |

3.2 从以上两表所测数据看,耐热性有很大差别。

### 4 结论

这是实验中的一个偶然发现,全脂奶粉可改变生孢梭菌的耐热性,使生孢梭菌孢子发生了变异,而且实验重现性好。希望此结果可应用于其它领域(医药业),通过改变细菌培养物的一种或几种成份而改变细菌性质,达到治疗目的。

收稿日期:2005-04-30