

C型肉毒梭菌毒素杀灭高原鼠兔的研究*

沈世英

(青海省畜牧厅)

摘 要

本文报道用C型肉毒梭菌毒素杀灭高原鼠兔的试验, 冬季灭鼠效果达98%。作为一种新的杀鼠剂, 具有毒性强、用量少、成本低、残效期短、无二次中毒、不污染环境、对人畜安全、使用方便等优点。是我国首次用生物毒素灭鼠成功的试验, 打开了生物灭鼠的新途径。

关键词: (Key words): 肉毒梭菌(Botulinum), 肉毒梭菌毒素(Botulin), 外毒素(Exotoxin), 灭鼠(Deratization), 高原鼠兔(Plateau pika, *Ochotona curzoniae*)。

生物毒素灭鼠是值得探索的一条途径, 但目前研究甚少, 仅有一些采用植物中提取生物碱作为杀鼠剂的报道(施银柱, 1980; 樊乃昌, 1985), 利用微生物灭鼠, 国内外有许多研究(Прохоров, 1966; 青海省生物研究所微生物研究组, 1973; 梁俊勋, 1981), 但因易发生人畜感染事故(大神正德, 1926), 加之效果不稳定, 使用越来越少。用不带菌的外毒素作为杀鼠剂, 至今国内外未见报道。为寻求新的灭鼠途径, 我们于1985、1986年先后在青海省共和县铁卜加、甘德县、达日县、同德县等地, 用C型肉毒梭菌毒素对青藏高原的主要害鼠——高原鼠兔(*Ochotona curzoniae*)进行了毒力测定, 毒素的特性研究及野外大面积灭鼠试验, 为国内首次用生物毒素灭鼠获得成功, 现报道于下。

一、试验材料

1. 毒素 肉毒梭菌毒素分为A、B、C、D、E、F、G 7个型, 我们试验的毒素是C型, 菌种C₆₂₋₄, 由中监所供给。C型肉毒梭菌毒素由青海省兽医生物药品制造厂制造, 有两种供试毒素: 一为1983年11月用常规法生产的、经过滤除菌, 冻干的C型肉毒梭菌毒素, 其毒力为10万MLD小白鼠/毫升(静注); 另一为1985、1986年采用封闭式非循环透析培养器(张礼等, 1985)生产的经除菌的湿毒毒素, 其毒力为100万MLD小白鼠/毫升(静注)。

2. 试鼠 室内测定的高原鼠兔捕自青海省共和县海拔3240米的铁卜加草原试验站, 挑选健康无伤者, 经笼养3日后供试, 随机编组。不分雌雄,

二、毒力测定和中毒症状观察

为了确定C型肉毒梭菌毒素对高原鼠兔是否有感受性, 我们首先进行了C型肉毒梭菌对高原鼠兔的最小致死量(MLD)测定: 共分7个浓度、8个试验组, 每组试鼠5只,

*崔生发同志提供了第一次试验毒素, 先后参加过部分工作的有省草原总站的王桂林、郭树栋、王延宁、李宏、罗影和同德草工队的部分同志, 在此一并致谢。

本文于1986年5月18日收到, 修改稿于1987年1月15日收到。

试鼠体重120—130克，平均体重123克，给药途径采用口灌法。结果见表1。用常规法生产的C型肉毒梭菌毒素毒力为：口服650个MLD高原鼠兔/毫升，也就是静注154个MLD小白鼠等于口服一个高原鼠兔的MLD；用透析培养法生产的C型肉毒梭菌毒素对高原鼠兔的毒力为口服4000个高原鼠兔MLD/毫升。

表1 C型肉毒梭菌毒素对高原鼠兔最小致死量测定
Table 1 MLD test of botulin model C to pika.

毒素稀释倍数 Times of dilution	给毒方法与剂量 Given dosage	常规法生产的毒素死亡比 Mortality of botulin produced by routine method	透析培养法生产的 毒素死亡比 Mortality of botulin produced by permeation method	生理盐水死亡比 Mortality of normal saline
1000000	口服1毫升 Intubation oral 1 ml		0/5	
50000	"		1/5	
30000	"	0/5	4/5	
10000	"	1/5	4/5	
4000	"	3/5	5/5	
1800	"	4/5		
650	"	5/5		
对照组				0/5

注：分母为试验鼠，分子为死亡数。

Note: Denominator for no. of test pika, numerator for no. of the dead.

C型肉毒梭菌毒素对高原鼠兔的致死中量 (LD_{50}) 测定，用常规法生产的毒素作材料（毒力：10万MLD小白鼠/毫升，静注），1:2.5等比级数分成5个剂量组与1个对照组，每组鼠兔5只，经灌胃一次给毒后详细观察10天。用简化寇氏法（孙瑞元，1963）计算：常规法生产的毒素对高原鼠兔的 LD_{50} 为1.71微升/公斤（口服），标准误 SE_{50} 为0.8897， LD_{50} 的95%可信限 d_{95} 为 ± 0.6846 微升/公斤； LD_{95} 为6.34微升/公斤，标准误为 ± 4.475 微升/公斤。

在毒力测定过程中，观察了鼠兔的中毒症状和死鼠剖检，还用4个剂量组毒素灌服试鼠，试验表明：毒素剂量与给药至死亡时间关系密切，剂量大，死亡快；剂量小，死亡慢。剂量与死亡时间的相关系数： $r=0.966$ ， $p<0.01$ ，相关极显著。

肉毒梭菌毒素是一种嗜神经性毒素，经肠道吸收后作用于颅脑神经和外周神经—肌肉接头处和植物神经末梢。电镜生理研究证明，毒素阻碍了胆碱能神经末梢介质（乙酰胆碱）的释放，导致肌肉麻痹，引起运动神经末梢麻痹（上海第二医学院，1979）。高原鼠兔经口染毒后，剂量大者，一般3—6小时就出现症状，食欲废绝，嘴鼻流液，行走左右摇摆，继而四肢麻痹，全身瘫痪，最后死于呼吸麻痹。死亡前未发现驚叫、抽搐等症状，一般悄然死去。中毒轻者，发病较晚，24—48小时后出现症状，表现食欲不振，行动迟钝，少数3—6日后自愈。对中毒死亡的鼠兔剖检，大多数肺脏和实质器官没有异常变化，仅有个别死鼠脏器有不同程度的淤血、出血。

三、C型肉毒梭菌毒素对高原鼠兔的免疫和二次中毒试验

在进行最小致死量测定的活鼠兔中选出10只，再另选择10只未染毒的健康鼠兔作为对照，两组都灌服1个鼠兔的MLD，观察10天，结果接触过毒素的试鼠死亡2只，存活8只，存活率为80%；未接触过毒素的试鼠全部死亡。说明高原鼠兔对C型肉毒梭菌毒素有明显的免疫性（口服）。

用C型肉毒梭菌毒素（毒力：100万MLD小白鼠/毫升）1毫升灌服高原鼠兔，死亡后剥皮，不去头和内脏，整鼠投喂体重为5公斤和4.8公斤的2只雌性试验小狗，每天饲喂染毒鼠1只，4天后，转为正常饲养，观察7天，未见试验小狗有中毒症状。

在野外大面积的毒素灭鼠中，用中毒濒死的鼠兔饲喂体重为250克的雄性黄鼬，每日1只，3天后，亦未见中毒症状。

C型肉毒梭菌毒素进入机体后，机体就产生抗体——抗毒素，抗毒素中和毒素，便成为无毒，C型肉毒梭菌毒素为外毒素（Exotoxin），又可为蛋白酶分解。从中毒机制上看，毒素不会产生二次中毒，我们几次大面积的毒素灭鼠中，未见有二次中毒现象。

四、毒素毒饵适口性观察和毒力保存期试验

1. 适口性观察 采用选择性取食方法进行。鼠兔10只，分2组，每组5只，分笼饲养观察。每笼各放两个饵容器：一放浓度为0.1%（透析法生产的毒素）的毒饵；另一容器放无毒对照饵；毒饵和无毒饵皆为小麦，饵料一次各放10克（湿重）约200粒，任其自由选食，6小时检查一次，记下消耗，并补添消耗饵量，保持10克。同时更换饵料容器位置。24小时后分别计算饵容器内的毒饵、饵料消耗量，然后转为正常饲养，继续观察7天。结果表明，毒素毒饵摄食系数为0.86—1.24，毒饵消耗量超过无毒饵消耗量，毒素毒饵的适口性极好。

2. 毒素毒饵保存期试验 1985年9月，我们在共和县铁卜加地区对布放在野外灭鼠试验中的2日、3日、和6日的毒素毒饵检回，作失毒试验。当时的日平均气温10℃，日照时数9小时，日平均辐射量500卡/厘米²。试验结果：C型肉毒梭菌毒素毒饵在野外条件下，毒力能保持2日，3日后的死亡率下降20%，6日下降40%。

五、野外大面积灭鼠试验

用C型肉毒梭菌毒素灭鼠，在1985、1986年的秋、冬、春三季进行，累计灭鼠面积约20万亩，试验采用喷雾法和毒饵法。

1. 喷雾法 1985年9月，我们在海拔3240米的铁卜加草原草场进行，设3个样方。1个空白对照，2个试验样方面积各1亩，四周设20米宽的保护区，采用手持超低量喷雾器喷雾，用透析培养法生产的C型肉毒梭菌毒素稀释成0.05%的浓度，每亩喷雾毒素稀释200毫升。用开洞封洞法检查（施银柱等，1980），效果平均为52.5%，灭效不理想，尚待进一步试验。

2. 毒饵法 毒素毒饵配制采用浸泡法，亦采用开洞封洞法检查效果，共作5次试验。

（1）秋季灭鼠 1985年9月在铁卜加牧草试验站进行，灭鼠效果见表2。过去用毒饵杀灭高原鼠兔均在冬季或初春进行，一般灭效较好，秋季灭鼠从未试过，因为9月

表 2 C 型肉毒梭菌毒素毒饵秋季灭鼠试验
Table 2 The deratization test with botulin model C bait in autumn.

毒饵种类 Bait	样方编号 No. of plot	毒饵浓度 Bait concentration	灭前有效洞 No. of living burrows before killing	灭后有效洞 No. of living burrows after killing	灭洞率 % Percentage of dead burrows	平均灭洞率 % Average percentage of dead burrows
毒素小麦毒饵 Botulin wheat bait	A ₁	毒力100万 MLD小白鼠/毫升 毒素0.2% V. B ₂	150	73	56.3	67.4
	A ₂		260	58	77.7	
	A ₃		108	29	73.2	
毒素小麦毒饵 Botulin wheat bait	B ₁	毒力100万 MLD小白鼠/毫升 毒素0.1% V. B ₁	136	69	49.3	51.6
	B ₂		168	25	55.4	
	B ₃		241	120	50.2	
磷化锌小麦毒饵 Z ₂ P ₃ wheat bait	C ₁	磷化锌10% Z ₂ P ₃ 10%	149	77	48.3	55.6
	C ₂		175	61	65.1	
	C ₃		189	88	53.4	
毒鼠磷小麦毒饵 Gophacide wheat bait	D ₁	毒鼠磷0.5% Gophacide 0.5%	114	38	66.7	65.7
	D ₂		97	44	54.6	
	D ₃		136	33	75.7	
敌鼠钠盐小麦毒饵 Diphacinone wheat bait	E ₁	敌鼠钠盐1% Diphacinone 1%	98	40	59.2	59.9
	E ₂		174	80	54.0	
	E ₃		167	56	66.5	

注: 样方面积为1/4公顷。Note: The plot is 1/4 ha. V. B₁—Virulence:10⁶ MLD white mouse/ml, Botulin:0.1%, V. B₂—Virulence:10⁶MLD white mouse/ml, Botulin:0.2%.

表 3 达日县吉拉沟冬季用 C 型肉毒梭菌毒素毒饵灭鼠试验
Table 3 The deratization test with botulin model C bait at Darjilagou in winter.

样号 No. of plot	毒饵种类 Bait	浓度 concentration	灭前有效洞 No. of living burrows before killing	灭后有效洞 No. of living burrows after killing	效果 % Effect%	平均效果 % Average %	备注 Notes
1	毒素燕麦毒饵 Botulin oats bait	毒力100万 MLD小白鼠/毫升 毒素 0.1% V. B ₁	23	1	91.6	92.4	
2	毒素燕麦毒饵 Botulin oats bait		37	4	89.2		
对照 Control	甘氟燕麦毒饵 Gliflor oats bait	甘氟1% Gliflor 1%				93.2	大面积灭鼠 In big area

注: 样方面积为1/15公顷。Note: The plot is 1/15ha. V. B₁—Virulence:10⁶MLD white mouse/ml, Botulin:0.1%.

份牧草生长茂盛,以牧草为主要食物的鼠兔食物丰富,毒饵引诱力不强。这次试验用的所有药剂和毒素灭鼠,虽有一定的毒杀作用,但效果不够理想。进行方差分析, F 为 1.51, $F < F_{0.05} = 4.1$, 各药品间处理无差异。

(2) 冬季灭鼠 进行 3 次。1985 年 11 月份,在果洛州甘德县的东吉滩和达日县的吉拉沟进行,两地均为海拔 4300 米的高寒草甸草场,杀灭高原鼠兔和少量田鼠(*Microtus oeconomus*) 的结果见表 3、表 4。达日县吉拉沟的毒素灭鼠效果与用甘氟毒饵大面积灭鼠效果差异不显著,灭效均在 92% 以上。在甘德县东吉滩用 C 型肉毒梭菌毒素毒

表 4 甘德县东吉滩冬季用 C 型肉毒梭菌毒素毒饵灭鼠试验

Table 4 The deratization test with botulin model C bait at Dongjitan, Gzde county in winter.

毒饵种类 Bait	毒饵浓度 Bait concentration	样方编号 No. of plot	灭前有效洞 No. of living burrows before killing	灭后有效洞 No. of living burrows after killing	灭洞率 % Percent age of dead burrows	校正灭洞率 % Corrected percentage of dead burrows	平均灭洞率 % Mean percentage of dead burrows
毒素燕麦毒饵 Botulin oats bait	100 万 MLD 小白鼠/毫升 毒素 0.1% V.B ₁	A ₁	57	9	84.2	81.0	89.3
		A ₂	101	2	98.0	97.6	
毒素燕麦毒饵 Botulin oats bait	100 万 MLD 小白鼠/毫升 毒素 0.5% V.B ₅	B ₁	62	11	82.3	78.7	86.7
		B ₂	202	9	95.5	94.6	
毒鼠磷燕麦毒饵 Gophacide oats bait	毒鼠磷 0.5% Gophacide 0.5%	C ₁	43	2	95.3	94.4	91.2
		C ₂	60	6	90.0	88.0	
甘氟燕麦毒饵 Gliflor oats bait	甘氟 0.5% Gliflor 0.5%	D ₁	67	11	83.6	80.3	79.2
		D ₂	44	8	81.8	78.1	
对 照 Control		E ₁	522	434	16.8		

注:样方面积为 1 亩。

进行 t 检验比较: C 型肉毒梭菌毒素与毒鼠磷毒饵灭鼠比较, $t = 0.044 < t_{0.05} = 1.96$ 差异不显著, C 型肉毒梭菌毒素与甘氟毒饵比较: $t = 3.15 > t_{0.01} = 2.58$ 差异极显著。

Note: The plot is 1/15ha.

V. B₁—Virulence:10⁶MLD white mouse/ml. Botulin:0.1%

V. B₅—Virulence:10⁶MLD white mouse/ml. Botulin:0.5%.

T test comparison: Comparison of the deratization effect between botulin model C bait and Gophacide bait. $t = 0.044 < t_{0.05} = 1.96$, No significant difference, between botulin model C bait and Gliflor bait. $t = 3.15 > t_{0.01} = 2.58$, the most significant difference.

饵与毒鼠磷毒饵灭鼠 t 检验比较, 差异不显著, 与甘氟毒饵比较 t 检验差异极显著。C 型肉毒梭菌毒素毒饵灭鼠比甘氟毒饵灭鼠效果要好。

1986 年 12 月份, 在海拔 3500 米的同德县北巴滩的草甸草场上用毒力 100 万 MLD 小白鼠/毫升的毒素 0.1% 的浓度配制燕麦、青稞毒饵, 进行 108200 亩的试验, 其中施毒素毒饵面积 90200 亩, 灭效为 98%。用 1% 甘氟的灭效为 85.5%, 用 0.1% 敌鼠钠盐的灭效为 91%。进行毒素毒饵最适浓度试验 (表 5), 表明浓度间差异不显著。在大面积灭鼠中, 我们认为用毒力 100 万 MLD 小白鼠/毫升的毒素 0.1% 浓度配制成的燕麦毒饵较好, 4 粒燕麦毒饵就含 1 个高原鼠兔 MLD 的毒力, 鼠兔一次采食毒饵都在 4 粒以上, 这就保证了毒杀效果。

(3) 春季灭鼠 1986 年 3—4 月, 在海拔 3800 米的同德县果什布滩高寒草场进

表 5 毒素毒饵灭鼠最适浓度试验

Table 5 Test of the optimum concentration with botulin bait to kill pika.

毒饵浓度% 毒素毒力: 100万 MLD小白鼠/毫升 Bait concentration % Virulence: 10 ⁶ MLD white mouse /ml	样方编号 No. of plot	灭前有效洞 No. of living burrows before killing	灭后有效洞 No. of living burrows after killing	灭洞率% Percentage of dead burrows	平均灭洞率% Mean percent- age of dead burrows
0.1	A ₁	46	0	100.0	98.3
	A ₂	29	1	96.6	
0.2	B ₁	61	0	100.0	100.0
	B ₂	40	0	100.0	
0.5	C ₁	58	0	100.0	100.0
	C ₂	47	0	100.0	
0.7	D ₁	53	0	100.0	99.1
	D ₂	53	1	98.2	
1.0	E ₁	40	0	100.0	100.0
	E ₂	51	0	100.0	

注: 饵料均为燕麦, 样方面积为1/15公顷。

Note: All the baits are oats. The plot is 1/15 ha.

行, 灭鼠91000亩, 其中1%甘氟燕麦毒饵灭鼠70000亩, 平均灭效90%; 用0.5%敌鼠纳盐燕麦毒饵灭鼠19740亩, 平均效果85%; 用1% C型肉毒梭菌毒素(毒力: 10万MLD小白鼠/毫升)燕麦毒饵灭鼠1260亩。平均效果90.05%。

六、讨论与小结

1. C型肉毒梭菌毒素对鼠类有极高的毒力: 以常规法生产的毒素对高原鼠兔的口服毒力可达650MLD/毫升; 致死中量为1.71微升/公斤(口服), 其毒力为甘氟的2.36倍(高原鼠兔对甘氟的LD₅₀为3.377毫克/公斤), 采用透析培养法生产毒素, 其毒力比常规法生产毒素可提高30—50倍, 纯度可提高80—160倍(张礼等, 1985)。以透析培养法生产的C型肉毒梭菌毒素1985年8月通过了鉴定, 目前已投入生产, 若批量生产, 将比其他常用灭鼠剂便宜。

2. 经20万亩大面积多次灭鼠试验表明: 冬季(12月)采用C型肉毒梭菌毒素毒饵的灭效高达98%, 远远高于常用杀鼠剂。高原鼠兔对毒素毒饵适口性好、毒饵残效期短、不污染环境, 对倒场困难的冬春草场灭鼠, 非常有利; 无二次中毒, 保护了害鼠天敌, 保持生态平衡, 这些优点是其他化学杀鼠剂所不及的。

3. C型肉毒梭菌毒素性质较稳定, 保存方便: 在-15℃冰箱中三年的湿毒, 无显著变化, 在-4℃冰箱中, 一年无显著变化, 四年降低50%左右。但毒素对温度抵抗力较小, 仅在100℃2分钟、80℃20分钟、60℃30分钟情况下可使毒素破坏; 对酸的抵抗力较强, 毒素在pH3.5—6.8时毒性稳定, 正常胃液在24小时内不能将其破坏, 毒素可被肠道吸收, 但在pH10—11时, 减毒较快(夏宏器, 1982; 青海牧科院, 1975), 因而, 只要我们掌握上述毒素特性, 运输中有简易保温箱, 使用时防碱防热, 毒素毒饵现配现

用,保持新鲜,在大面积灭鼠实际应用中,也是比较方便的。

4. 因 C 型肉毒梭菌毒素,已进行了除菌过滤处理,不致造成人畜细菌感染;对非靶动物的试验表明:口服 5 毫升毒素(每毫升含 6 万 MLD)海猪,羊未死亡,口服 10 毫升方见死亡,牛的致死量是羊的 10 倍(青海省牧科院,1975)。在大面积灭鼠时,工作人员也可先注射 C 型肉毒梭菌疫苗进行免疫;如万一不慎,误食毒素,可用 C 型肉毒梭菌抗血清治疗。因此, C 型肉毒梭菌毒素灭鼠对人畜比较安全。

5. 鼠兔对毒素能很快出现免疫,连续使用,可能会降低灭效,尚需进一步研究。

总之,用 C 型肉毒梭菌毒素毒饵杀灭高原鼠兔与目前其他化学杀鼠剂比较,有其较大的优点,可以在灭鼠中应用。近年来,我们仅仅做了一种毒素、一种鼠类的杀灭试验,今后我们将继续进行多种毒素、多种鼠类感受性的探索、提高毒素毒饵保持期的研究,使毒素灭效更加稳妥。

参考文献

- 上海第二医学院 1979 医用微生物学 人民卫生出版社。
大神正德 1926 鼠族驱除法 成美堂书店 147—157
青海省生物研究所微生物灭鼠研究组 1973 鼠痘病毒灭鼠的研究 灭鼠和鼠类生物学研究报告第 1 集, 46—60 页。
青海省畜牧兽医科学研究所、兽医生物药品制造厂 1975 肉毒梭菌病的调查研究与防治 青海省畜牧兽医科学院研究资料汇编第 5 集 123—137 页。
孙瑞元 1963 简捷实用的半数致死量综合计算法, 药学报 10(2) 65—74。
张礼、崔生发 1985 提高 C 型肉毒梭菌疫苗的效力 中国兽医科技 85(1) 20—22。
夏宏器 1982 肉毒中毒 新疆人民出版社
梁俊勋 1981 灰仓鼠、柞柳沙鼠和草原兔尾鼠对沙门氏菌的感受性试验, 灭鼠和鼠类生物学研究报告第 4 集 35—42 页
施银柱、樊乃昌 1980 草原鼠害及其防治 青海人民出版社
施银柱、樊乃昌、潘金洲、李继明 1984 杜鼠灵作为杀鼠剂的初步研究 兽类学报 4(1): 61—67
樊乃昌、景增春、王权业、1985 土的宁杀灭高原鼠兔的试验研究 兽类学报 5(4): 311—315
Прохоров М.И. 1966 Микробиологический Метод борьбы с вредными грызунами Изд Колос Ленинград.

外文摘要(Abtract)

A PRELIMINARY STUDY ON BOTULIN MODEL C FOR KILLING PIKA

SHEN Shiyin

(Animal Husbandry Department of Qinghai Province)

We determined the virulence of botulin model C with no germ for Plateau pika, characterization of toxin and killing test in vast area. The botulin model C has a strong virulence to pika, the main pest in Qinghai-Tibetan Plateau. Produced by routine method, it is one hundred thousand MLD white mouse/ml. The LD_{50} is $1.71\mu\text{l/kg}$ (intubation oral) to pika. The dosage of botulin has a close relation to death time. Heavy dosage makes pika die rapidly while light slowly. After taking it, pika show immuno-reaction quickly, secondary poisoning will not happen. Make the botulin poison bait and it is palatable to pika. In natural environment it lose its virulence rapidly.

We had deratization tests in Tie-bujia of Gonghe county, Gade county, Darlag county and Tongde county of Qinghai Province in autumn, winter and spring for two years. The test area added up to more than 13,334 ha. By testing in large wild area, using the botulin poison bait to kill pika in winter, it had a powerful poison effect, coming up to 98%.

As a new rodenticide, it has many advantages of being convenient in use, in safety to man or animal, without environmental pollution and so on, and may be put into use to a great extent.