

# 通气培养法生产无毒炭疽芽孢苗

成都兽医生物制品厂

1973年兰州兽医生物制品厂采用2%蛋白胨作培养基,用通气培养方法,可获得3.4亿—9亿/毫升芽孢的芽孢液。这是无毒炭疽芽孢苗生产的重大改革。

我厂在研究通气培养法生产无毒炭疽芽孢苗的过程中,对无毒炭疽芽孢生长发育情况进行了探索,并对原料来源和培养方法也作了一些试验。用马丁汤加入少量琼脂生产出无毒炭疽芽孢液,从菌体形态上观察,蛋白胨培养的菌体和芽孢都比较小,而马丁半固体培养基培养的菌体和芽孢形态与固体培养的接近。

## 一、对无毒炭疽芽孢的生长发育过程的观察

将芽孢悬液或芽孢甘油液浓苗接入0.2%马丁半固体培养基中,使培养基含芽孢为3万个/毫升,培养3—4小时后,即可观察到芽孢已发芽,产生半圆形的和长椭圆形的芽突,几个或十几个以上的芽突成块状聚合在一起,称为小芽生体。革兰氏染色为阳性。在第5—6小时左右,小芽生体先后变大变长,革兰氏染色仍为阳性,但变成较浅色的细小杆状,静置至第7小时测菌数为300万个/毫升,给予大的通气量时菌数为30万个/毫升,小通气量时为280万个/毫升,试验证明,在培养初期以静置为佳。培养到第7小时以后,进入对数生长期,每小时菌量增长一倍,此时典型炭疽杆菌形态的菌数已较小芽生体为多,菌体多呈短分节,长宽比约为1:2.5左右。到第14小时30分以后进入平衡期,此时每增菌一倍需1.5小时。在涂片上可以见到营养体逐渐又形成短链开始形成芽孢。18—21小时以后进入芽孢形成期,每一长分节的营养体形成4个芽孢,每二个长分节和随后成链的芽孢往往连在一起,成4—8个芽孢连在一起。第44小时以后芽孢开始脱链,进入脱链期。单个芽孢在芽孢液中游离,其菌体外壳被溶解,此时培养液将产生很多细泡沫,这种泡沫加入大量豆油时仍不易消除,有时因加入豆油过多,反而将已脱链的芽孢吸附于油滴,粘成大的芽孢团块,或粘附于瓶壁,很难摇散。培养过程的温度应控制在25—36℃。

## 二、培养方法的改进

1974年的培养方法是:用2万毫升培养瓶,放入6,000毫升0.2%马丁半固体培养基,接入芽孢悬液,通气搅匀后,静置12小时,再通气2小时后加培养基

至16,000毫升,静置3小时后给予1:1(体积/体积/分)的通气量,这样芽孢脱链最快要58小时,有时长达72小时,芽孢数在10亿/毫升以上。

为了提高每毫升芽孢数和缩短培养周期,我们于1975年在操作上和培养基上进行了改进,培养瓶采用1万毫升玻璃瓶作了如下三个试验:

### (一) 缩短培养周期的试验

取0.2%马丁半固体培养基6,500毫升,接入1.6亿/毫升芽孢甘油液浓苗1毫升,静置7小时后,给予1:1(体积/体积/分)的通气量,48小时分别获得每毫升20.2亿、19.68亿、18.3亿芽孢的结果。

### (二) 探讨培养基潜力的试验

将0.2%马丁半固体培养基加入等量水稀释,然后按上述方法进行培养,依照未稀释培养基收获时的体积折算,每毫升芽孢数为24.3亿、20.77亿/毫升,说明在等量冲稀以后培养基中营养成分能较多地被细菌利用,因此考虑为节约培养基中的氮,若补加适量的蔗糖,可能会提高每毫升的芽孢数。

### (三) 蔗糖添加量与添加时间的选择

在通气量、接种量、静置时间固定的情况下,采用加等量水稀释的0.2%马丁半固体培养基,用1万毫升培养瓶,每瓶培养基6500毫升,接种1.6亿芽孢/毫升的甘油液浓苗1毫升,进行了蔗糖添加量和添加时间的选择试验,结果见表1。

表1 蔗糖添加量和添加时间的选择

芽孢苗批号	添加糖量 (%)	添加时间 (接种后)	芽孢数 (亿/毫升)	备 注
757-1	0.6	7小时	14.77	对照
757-2	—	—	11.4	
757-3	0.4	7小时	13	
757-4	0.4	9小时	20	
757-5	0.4	7小时	18.3	因通气装置发生故障,通气量小。
757-6	0.4	9小时	18.67	
757-7	0.2	9小时	10.0	
757-8	0.2	11小时	25.1	

根据表1结果,可知最优方案是用1万毫升培养

瓶装 6500 毫升培养基, 接入 1.6 亿芽孢/毫升甘油液浓苗 1 毫升 (每毫升培养基接入芽孢数约 3 万个), 通气搅匀, 静置 7 小时后液温 28—36℃, 给予 1:1 (体积/体积/分) 的通气量, 培养过程中分次加入 7 毫升豆油消沫, 在第 11 小时加入 0.2% 蔗糖, 到第 48 小时可获得芽孢数为 25.1 亿/毫升的芽孢液。用 2 万毫升瓶, 按比例放大可得芽孢数为 19 亿/毫升的芽孢液。

1976 年我们又将酵母水改为 10% 酵母浸膏液, 将蔗糖改为 10% 葡萄糖, 在试验中发现因加糖产酸, 所以用尿素中和。加入尿素不仅起调节 pH 值的作用, 而且可以代替一部份氮源。另外, 又将添加营养液改为每小时一次, 连续 2—4 次。培养结果一般比 1975 年好, 芽孢液含芽孢最高可达 36 亿个/毫升。其方法是: 用加等量水稀释的 0.2% 马丁半固体。接入芽孢搅匀后, 静置 10 小时, 给予 1:3 (体积/体积/分) 的通气量, 3 小时后, 每小时补加 10% 葡萄糖 150 毫升、酵母浸膏 75 毫升、50% 尿素 60 毫升, 共 4 次。通气时间缩短为 36—37 小时。

### 三、动物试验

#### (一) 安全试验

将通气培养的芽孢液配制成芽孢苗, 用兔作安全检查试验, 结果见表 2。

表 2 通气培养无毒炭疽芽孢苗的安全试验

芽孢苗批号	芽孢数 (亿/毫升)	皮下注射量 (毫升)	注射兔数 (只)	结 果
746-1-2	0.2675	1	4	注射后观察 15 天, 局部和精神食欲均无异常
747-1-2	0.2255	1	4	注射后观察 15 天, 局部和精神食欲均无异常
741-1-1	0.2440	1	4	注射后观察 15 天, 局部和精神食欲均无异常
741-2-2	0.2465	1	4	注射后观察 15 天, 局部和精神食欲均无异常
744-1	0.2340	1	4	注射后观察 15 天, 局部和精神食欲均无异常
747-2-1	0.2387	1	4	注射后观察 15 天, 局部和精神食欲均无异常
7411-3	0.2190	1	4	注射后观察 15 天, 局部和精神食欲均无异常
746-2-1	0.2485	1	4	注射后观察 15 天, 局部和精神食欲均无异常

在规定的活芽孢数内, 各批芽孢苗安全试验均符

合规定。

#### (二) 安全限度试验

结合将来采用芽孢甘油液浓苗加 20% 铝胶水稀释后注射的方案 (可节约 9/10 的甘油), 故用芽孢甘油液浓苗和用 20% 铝胶水稀释后试验, 找出每毫升含多少活芽孢为其最大安全限度。试验结果见表 3。

表 3 通气培养无毒炭疽芽孢苗的安全限度试验

芽孢苗批号	稀释情况	皮下注射量 (毫升)	注入芽孢数 (亿)	注射兔数 (只)	注射后情况
747-2-2	铝胶水稀释	1	0.16	4	安全, 4/4 健活
747-2-2	铝胶水稀释	1	0.3	4	安全, 4/4 健活
747-2-2	浓苗内芽孢沉淀铝胶水稀释	1	2.0	2	一头死亡, 但未水肿
741-1-1	浓苗内芽孢沉淀铝胶水稀释	1	0.945	2	安全, 2/2 健活
746-1-2	浓苗内芽孢沉淀铝胶水稀释	1	0.97	2	安全, 2/2 健活
741-2-3	浓苗内芽孢沉淀铝胶水稀释	1	0.732	2	安全, 2/2 健活

注: 表中死亡一头, 心血培养证明不是无毒炭疽致死。

从表 3 可看出, 用 20% 铝胶水稀释的芽孢苗每毫升含活芽孢 0.97 亿以下者完全安全, 未产生死亡或水肿, 故 0.97 亿/毫升可能为 20% 铝胶水稀释的芽孢苗最大安全限度。

#### (三) 用黄牛作安全试验的情况

将 746-1-2 批液体培养甘油芽孢苗, 经用兔安全检查后, 注射黄牛进行安全试验。黄牛系本厂新购健康牛, 第一次试验注射 4 头, 第二次试验注射 18 头, 共注射 22 头, 每头皮下注射 1 毫升, 每毫升含活芽孢 0.2675 亿个, 注射后观察 14 天, 精神食欲均无明显的变化。

#### (四) 效力试验

将 7424、7425、7426 三批通气培养的芽孢苗请兰州兽医生物药品厂代作效力试验 (简称效检)。效检动物为绵羊, 第一次效检, 7424 批芽孢苗动物 3/4 保护, 7425 批芽孢苗动物 4/4 保护, 7426 批芽孢苗动物 3/4 保护, 对照组动物 3/3 死亡。第二次效检, 7424 批芽孢苗动物 4/4 保护, 7426 批芽孢苗动物 4/4 保护。