

猪丹毒菌增菌培养基的试验

江西生物药品制造厂

(南昌)

猪丹毒弱毒菌用肉肝胃膜消化汤加血培养基培养,菌数一般较低。用此培养基培养注射、口服两用的猪丹毒弱毒菌 GC 42 号,菌液的菌数则更低,平均在 39 亿/毫升左右,冻干后活菌数仅有 23.6 亿/毫升。因此,不适于大量生产。

为了提高猪丹毒弱毒菌 GC42 号培养液的菌数,我们组成了有工人、干部、技术人员参加的三结合试验小组。经反复试验,试成了“105”培养基。用此培养基(不需加血)培养猪丹毒弱毒菌 GC 42 号,菌数可达 150 亿/毫升左右,冻干后活菌数仍有 100 亿/毫升,而且菌株的毒力、抗原性均无影响,经有关部门批准,现已用于生产,现将试验情况介绍如下:

一、“105”培养基配方的确定

猪丹毒弱毒菌 GC42 号的生产,原用肉肝胃膜消化汤加血培养基,这种培养基虽然营养成分较丰富,但是

培养的菌数较低。我们认为其原因可能在于需要加一些助长成份。我们曾试验在肉肝胃膜消化汤培养基中加入葡萄糖、吐温 80 等,发现单加任何一种成份均无明显作用,但将两种成份同时加入,并加入磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)来调整 pH 后,可使 GC 42 号的活菌数大大提高。经进一步试验,确定了三种补加成份的最适量为:5% 磷酸氢二钠,1% 葡萄糖,0.25% 吐温 80,此培养基取名为“51025”培养基。经过由小量到大罐的几十次试验,活菌数可稳定在 150 亿/毫升左右。但是此培养基培养的菌液难于冻干,干损率最高达 50%,水份也偏高。我们又采用 2NNaOH 代替磷酸氢二钠调整 pH(培养 8 小时左右 pH 开始下降至 7.0 以下,用 2NNaOH 调 pH 至 7.4,此后每小时调一次,连续调 5 小时后 pH 则不再变化),经大罐(16 万毫升培养基)试验获得较好的冻干效果(见表 1)。

从表 1 可以看出,用肉肝胃膜消化汤加 1% 葡萄糖

表 1 几种不同培养基培养 GC 42 号菌效果比较

培养基种类	批数	菌液平均 菌数 (亿/毫升)	冻干后平 均菌数 (亿/毫升)	冻干物 干损率 (%)	水份合格 批数	效 检 结 果 (小鼠)			
						效检批数	一次效检 通过批数	效检小鼠 总数(只)	小鼠获保 护数(只)
肉肝胃膜消化汤, 1% 葡萄糖, 0.5% 吐温 80, 中途用 2NNaOH 调整 pH	15	160	104	0.4	42/42	42	41	215	204
肉肝胃膜消化汤, 1% 葡萄糖, 0.25% 吐温 80, 中途用 2NNaOH 调整 pH	30	108.4	78.1						
51025 培养基	12	155	102	19.5	11	11	11	55	51
肉肝胃膜消化汤加血培养基(对照)	24	39.6	25.2	0.5	24	24	23	125	117

糖、0.5% 吐温 80, 中途用 2NNaOH 调整 pH 的培养基培养 GC42 号菌所获得的菌数最高,此培养基代号为“105”培养基,现已用于生产。

二、产品毒性及保护性等试验

为了说明在肉肝胃膜消化汤培养基中加入葡萄糖和吐温 80 两种成份后,对产品有无毒性、对菌种的免疫原性及产品保存性能有无影响,做了以下一些试验:

1. 用“105”培养基(将其中吐温 80 含量改为 1%)培养 GC 42 号猪丹毒弱毒菌,其活菌数为 110 亿/毫升,肌肉注射体重 25—30 斤的仔猪两头,每头注射 10 毫

升(即含吐温 80 0.1 毫升,活菌 1100 亿),观察 14 天,无反应。

2. 将用“105”培养基连续传接 5 代的 GC 42 号菌肌肉注射体重 25—30 斤的仔猪两头,每头注射活菌 248 亿,均无反应。

3. 将“105”培养基制得的 GC 42 号冻干苗以活菌数为 20 亿和 50 亿的剂量注射体重 18—25 克的小白鼠 5/5 健活,以活菌数为 20 亿的剂量注射鸽子存活 1/3,以活菌数为 40 亿的剂量注射鸽子存活 0/3,以活菌数为 60 亿的剂量注射鸽子存活 1/3,符合 GC42 号对小鼠毒力低,而对鸽子毒力强的特性。

4. 用“105”培养基生产的菌苗和肉肝胃膜消化汤加血培养基生产的 GC 42 号菌苗, 放置 36℃ 和室温保存 32 天, 前者存活率分别为 77.3% 和 78.2%, 而后者 36℃ 存活率为 74.1%, 二者无明显差别。

5. 用“105”培养基试产的 7616-1 和 7617-2 两批菌苗, 以活菌数为 1000 万的剂量注射猪, 其免疫结果

表 2 用“105”培养基生产的 GC 42 号菌苗对猪免疫的效果

菌苗批号	免疫剂量 (皮下注射)	攻毒剂量 (静脉注射)	攻毒反应					保护数
			死	重	轻	微	无	
7616-1	1000 万活菌/头	100 亿/头			2	2		4/4
7617-2	1000 万活菌/头	100 亿/头			2	2		4/4
氢氧化铝菌苗 7589	3 毫升灭活菌苗	100 亿/头			2	3		5/5
氢氧化铝菌苗 7590	3 毫升灭活菌苗	100 亿/头		1	1	2	1	5/5
对 照	—	100 亿/头	3	2				2/5

注: 免疫日期为 1976 年 7 月 19 日, 攻毒日期为 1976 年 8 月 25 日。

见表 2。

三、讨 论

1. “105”培养基在大生产中应用效果十分稳定。我们也曾试过将基础培养基(肉肝胃膜消化汤)改为马丁汤, 培养过程中同样采用 2N NaOH 调整 pH, 也可达到平均 141 亿/毫升的菌数。活菌数高峰在 14—16 小时。如小量培养, 可另外加 5% 磷酸氢二钠调整 pH, 而不需用碱调。

2. “105”培养基不仅适用于培养猪丹毒弱毒菌 GC 42 号、FII 65, 还适用于培养强毒菌 C43-6、C43-8, 其活菌数均可达到 150 亿/毫升。GC 42 号菌液冻干后仍能保持菌数在 100 亿/毫升的水平, 比原用培养基培养的菌数提高三倍以上。

3. 初步认为, “105”培养基对 GC 42 号猪丹毒弱毒菌的毒力、免疫原性无影响, 冻干制品保存在 36℃ 32 天与对照无差别。产品的低温保存, 以及免疫期等试验有待进一步进行。