

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.05.05

培养副鸡嗜血杆菌用干粉培养基的优化研究

韩美珍¹, 徐中清^{2*}, 李秀辉³, 郇春燕³

(1. 北京中海生物科技有限公司, 北京 100081; 2. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 3. 中海生物科技(枣庄)有限公司, 山东枣庄 277000)

[收稿日期] 2022-11-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 05-0027-06 [中图分类号] S852.61

[摘要] 优化副鸡嗜血杆菌干粉培养基配方。通过单因素平行对比配方中碳源、血清、辅酶等营养物质, 确定各个因素对副鸡嗜血杆菌生长的影响。研究筛选出了适宜副鸡嗜血杆菌生长的干粉培养基配方: 鸡肉蛋白胨、酪朊、多价朊、酵母粉、葡萄糖等, 再添加 7.5% 鸡血清和 10 mg/L 辅酶 I, 于 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱中 160 r/min 振荡培养 14~16 h。优化后的配方更适于培养副鸡嗜血杆菌, 为副鸡嗜血杆菌疫苗大规模生产提供了参考依据。

[关键词] 副鸡嗜血杆菌; 鸡传染性鼻炎; 活菌计数

Study on Optimization of Dry Powder Medium for Cultivation of *Haemophilus paragallinarum*

HAN Mei-zhen¹, XU Zhong-qing^{2*}, Li Xiu-hui³, HUAN Chun-yan³

(1. Beijing Zhonghai Biotechnology Co., Ltd, Beijing 100081, China; 2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

3. Zhonghai Biotechnology (ZaoZhuang) Co., Ltd, Zaozhuang, Shandong 277000, China)

Corresponding author: XU Zhong-qing, E-mail: zhongqingxu@163.com

Abstract: To optimize the formula and culture process of *Haemophilus paragallinarum* dry powder culture medium. Through single factor parallel comparison of carbon source, serum, coenzyme and other nutrients in the formula, the influence of each factor on the growth of *Haemophilus paragallinarum* was determined. The dry powder culture medium formula suitable for the growth of *Haemophilus paragallinarum* was selected; chicken peptone, casein, polyvalent peptone, yeast powder, glucose, etc., and 7.5% chicken serum and 10 mg/L coenzyme I were added, and then cultured for 14~16 hours in a constant temperature incubator at 37 ℃ and 5% CO₂ at 160 r/min. The optimized formula is more suitable for the cultivation of *Haemophilus paragallinarum*, which provides a reference basis for large-scale production of *Haemophilus paragallinarum* vaccine.

Key words: *Haemophilus paragallinarum*; infectious coryza; bacterial plate count

作者简介: 韩美珍, 研发工程师, 生物工程专业, 从事培养基研究与开发。

通讯作者: 徐中清。E-mail: zhongqingxu@163.com

鸡传染性鼻炎(infectious coryza, IC)是由副鸡嗜血杆菌(*Haemophilus paragallinarum*, HPg)引起的一种上呼吸道感染^[1]。该病原菌是一类酶系统不完全的革兰阴性杆菌,维持其生长不仅需要基础的碳源和氮源,还需要健康动物血清、辅酶等生长因子。兽用生物制品规程中要求用新鲜配制的鸡肉汤培养基来培养鸡鼻炎疫苗种子液,用于疫苗的生产。然而,鸡肉汤培养基的质量会受到多种因素的影响,如鸡肉原材料的质量、浸出时间、制作工艺等,由此经常导致疫苗种子液的抗原含量不稳定、免疫原性批间差异大等情况。针对这些问题,通过单因子平行对比实验,结合 HPg 活菌计数结果进行筛选,得出了最适宜的培养副鸡嗜血杆菌用干粉培养基配方,为后续的大规模疫苗生产提供了参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验用菌种 副鸡嗜血杆菌 A 型(0083 株)由中国兽医药品监察所鉴定、保存和供应。试验用种子繁殖:将 HPg 菌株接种于 5 日龄 SPF 鸡胚卵黄囊内,置 37℃ 继续孵育,收集 30 h 内死亡的鸡胚卵黄液,划线接种鸡肉汤琼脂平板,置于含 5%~10% CO₂ 培养箱内,37℃ 培养 16~18 h。挑荧光性强的典型菌落(菌苔)接种于鸡肉汤培养基中^[3],37℃ 培养 16~18 h,纯检合格后,作为试验用种子,置 2~8℃ 冰箱,保存备用。

1.2 仪器及耗材 紫外分光光度计,购自上海菁华科技仪器有限公司;凯氏定氮仪 KDN-1,购自上海仪电科学仪器股份有限公司;高效液相色谱仪(含有 GPC 软件),品牌及型号为日本岛津 LC-20A;一次性平皿(直径 9 cm),购买自青岛金典生化器材公司。

1.3 培养基配制 鸡肉汤培养基和鸡肉汤琼脂平板按照《兽用生物制品规程》方法制备,由北京中海生物科技有限公司供应,其中新鲜鸡肉汤培养基编号为 1 号培养基。合成培养基按照以下方法配制:鸡肉蛋白胨、酪胨、多价胨、酵母粉、葡萄糖等编号为 2 号培养基;鸡肉蛋白胨、多价胨、牛肉胨、酵母粉、葡萄糖等编号为 3 号培养基。鸡肉蛋白胨、多

价胨、牛肉胨、酵母粉、葡萄糖等编号为 4 号培养基。

1.4 理化指标检测 取适量合成培养基 2 号、3 号、4 号,用半微量法检测总氮含量^[4]、用滴定法检测氨基氮含量^[5]、用灼烧法检测灰分含量^[6]、用高效凝胶过滤色谱法检测相对分子质量大小及其分布情况^[7]。

1.5 合成培养基配方筛选实验 按照 7.5% 鸡血清、10 mg/L 辅酶 I 的添加量加入 1 号、2 号、3 号、4 号培养基中,将等量种子液分别接种到四组培养基中,于 37℃,5% CO₂ 恒温培养箱中 160 r/min 振荡培养。每间隔两小时取样,进行活菌计数^[8]。

1.6 血清种类对 HPg 生长的影响 取适量 2 号合成培养基,按照 10 mg/L 的添加量加入辅酶 I,并按照 7.5% 添加量分别加入鸡血清、猪血清、牛血清、马血清,将等量种子液分别接种到四种血清的培养基中,于 37℃,5% CO₂ 恒温培养箱中 160 r/min 振荡培养 16 h,分别进行活菌计数和 OD₆₀₀ 值检测。

1.7 血清加量对 HPg 生长的影响 取适量 2 号半合成培养基,按照 10 mg/L 的添加量加入辅酶 I,并按照 2.5%、5%、7.5%、10%、12% 添加量分别加入鸡血清,将等量种子液分别接种到以上不同血清加量的培养基中,于 37℃,5% CO₂ 恒温培养箱中 160 r/min 振荡培养 16 h,分别进行活菌计数和 OD₆₀₀ 值检测。

1.8 辅酶 I 加量对 HPg 生长的影响 取适量 2 号半合成培养基,按照 7.5% 的添加量加入鸡血清,并按照 5、10、20、30、40 mg/L 的添加量分别加入辅酶 I,将等量种子液分别接种到四种辅酶 I 添加量的培养基中,于 37℃,5% CO₂ 恒温培养箱中 160 r/min 振荡培养 16 h,分别进行活菌计数和 OD₆₀₀ 值检测。

2 结果与分析

2.1 理化指标检测结果 从表 1 的理化指标含量检测结果分析,2 号培养基总氮和氨基氮含量都比较高,说明此配方营养组分比例合理,基本营养物质更有利于 HPg 的生长。小分子肽在生命体内具有众多优异的生理活性,其结构简单、分子量小,更

容易被微生物消化吸收^[9]。而 2 号培养基中小于 1250 分子量的物质相对较高,综合以上结果,选择 2 号培养基作为副鸡嗜血杆菌的合成干粉培养基配方。

表 1 理化指标检测结果
Tab 1 Results of physical and chemical index tast

	2 号	3 号	4 号
总氮含量	8.94%	8.66%	7.85%
氨基氮含量	4.32%	4.10%	4.03%
灰分含量	25.95%	24.34%	26.32%
分子量 < 250	32.13%	30.08%	25.41%
分子量 1000 – 1250	28.15%	27.29%	23.77%
分子量 1750 – 2000	35.53%	40.06%	47.45%
分子量 > 10000	4.19%	2.57%	3.37%

2.2 合成培养基配方筛选实验 如图 1 可知,2 号培养基在培养 16 h 时,HPg 活菌数最高,2 号和 4 号培养基中 HPg 活菌数均在 16 h 之后开始下降,3 号培养基中 HPg 活菌数在 18 h 之后开始下降,但

是活菌数较低。因此,确定使用 2 号培养基配方作为基础培养基,并在培养 16 h 时进行传代较为适宜。

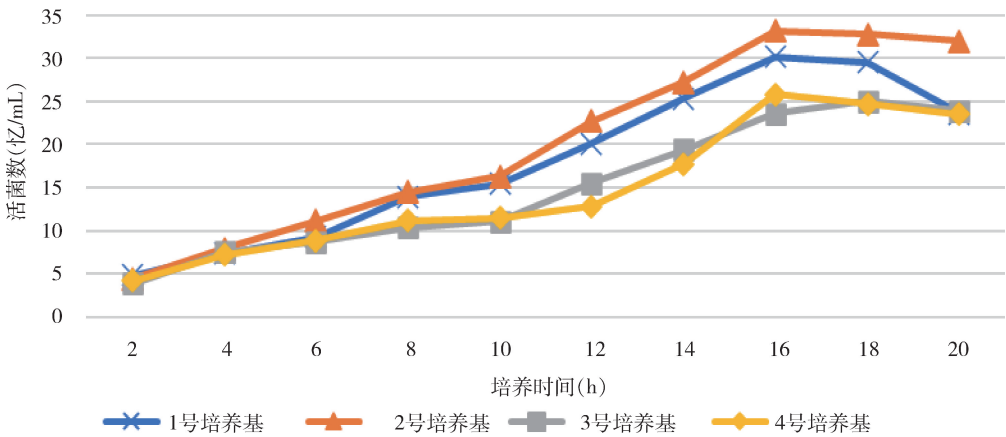


图 1 HPg 在四种培养基中的生长曲线
Fig 1 Growth curves of HPg in four medium

2.3 动物血清种类对 HPg 生长的影响 由图 2 可以看出,添加鸡血清的培养基的 HPg 活菌计数结果和 OD₆₀₀值最高,添加猪血清和马血清的培养基次

之,添加牛血清的培养基对 HPg 的生长效果最差。因此确定添加鸡血清作为此干粉培养基的生长因子。

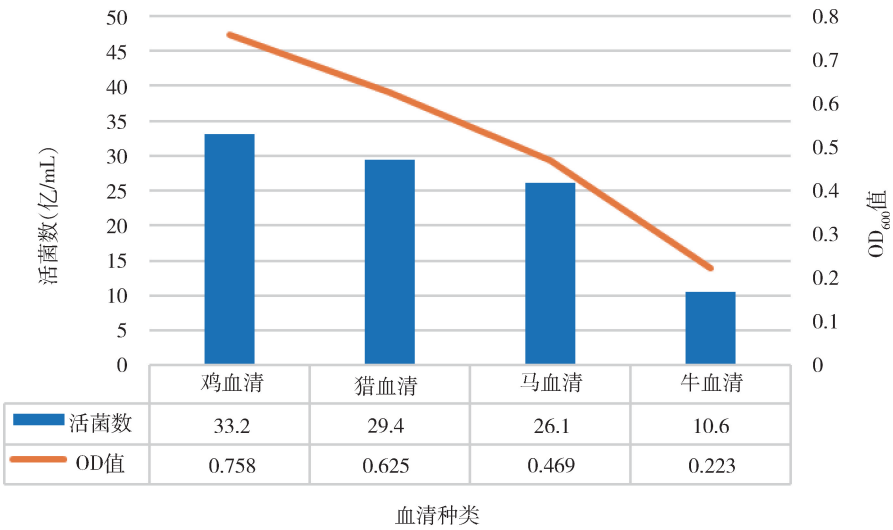


图 2 不同动物血清对 HPg 生长的影响

Fig 2 The effects of different animal serum to HPg growth

2.4 血清加量对 HPg 生长的影响 由图 3 可以看出,添加鸡血清量为 7.5% 时,HPg 活菌数和 OD₆₀₀ 值明显升高,而高于 7.5% 时,活菌数和 OD₆₀₀ 值升高不明显,结合考虑生产成本等因素,由于添加 7.5% 鸡血清足以满足 HPg 的生长,因此选择 7.5% 鸡血清添加量最适宜。

2.5 辅酶 I 添加量对 HPg 生长的影响 当辅酶 I 添加量大于 10 mg/L 时,HPg 活菌数大于 30 亿/mL,当辅酶 I 添加量大于 20 mg/L 时,活菌数没有明显增多(图 4),综合考虑生产成本等因素,确定选择辅酶 I 添加量为 10 mg/L 较为适宜。

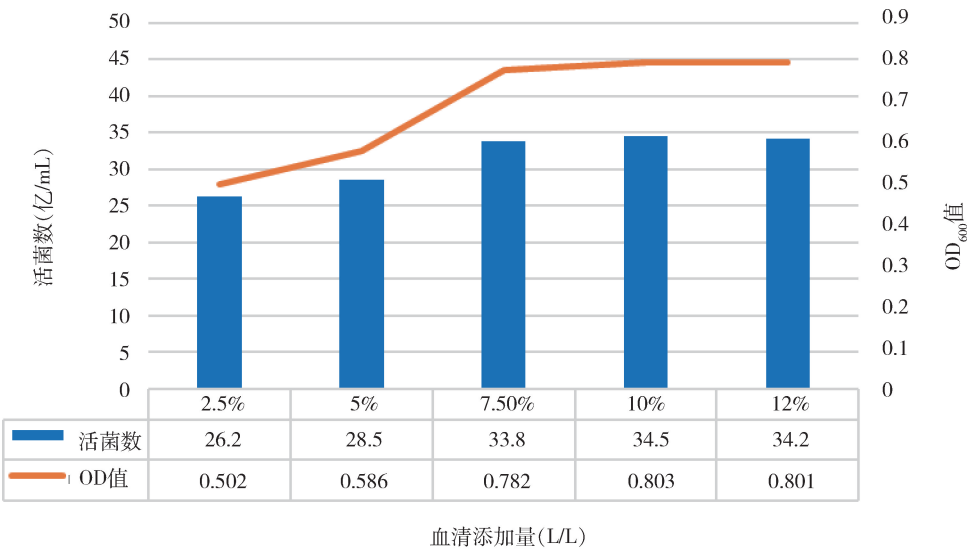


图 3 血清加量对 HPg 生长的影响

Fig 3 The effects of chicken serum addition to HPg growth

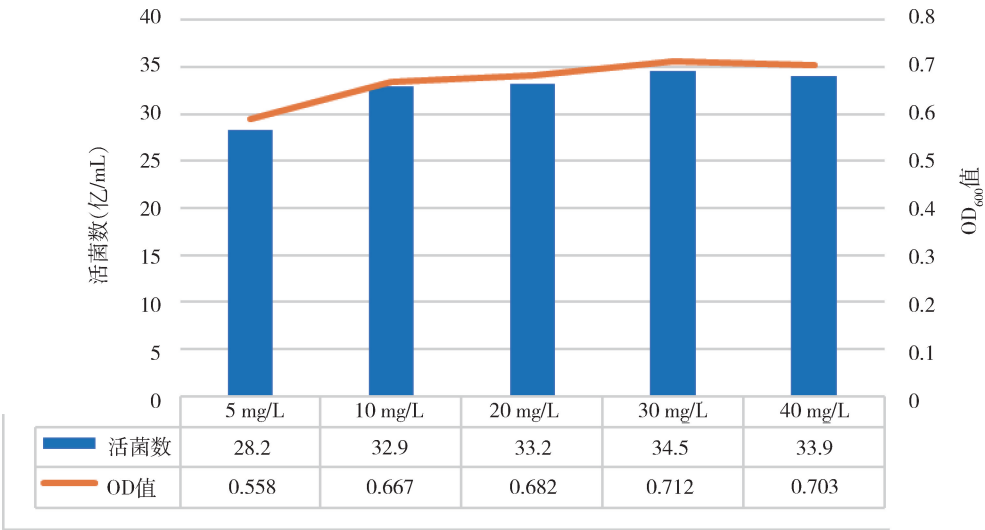


图 4 辅酶 I 添加量对 HPg 生长的影响

Fig 4 The effects of coenzyme I addition to HPg growth

3 讨论

适宜的培养基配方和合适的培养条件是产物生成量高低和原材料利用率高低的决定因素^[10]。本研究通过分析半合成培养基配方中各个参数对菌体生长的影响,优化出了更加适宜 HPg 生长的培养基配方:用鸡肉蛋白胨、酪胨、多价胨、酵母粉、葡萄糖等原材料配制成 2 号基础培养基,再添加 7.5% 鸡血清和 10 mg/L 辅酶 I,于 37 ℃,5% CO₂ 恒温培养箱中 160 r/min 振荡培养 14 ~ 16 h。优化后的配方改善了实际生产过程中常常出现的培养菌体耗时长、活菌数量低等问题,为我国 IC 疫苗生产提供了科学的数据支持。

对于大多数培养基而言,其组分相当复杂,仅通过单因素试验往往无法达到预期的效果,特别是在试验因素(培养基组分、pH、培养温度、培养时间等)很多的情况下,需要进行较多的试验次数和试验周期才能完成各因素的逐个优化筛选。本研究从四个备选配方中确定了干粉培养基营养组分种类,并通过单因素试验得到了相对适宜的营养组分配比,将来通过正交试验和优化技术一定能得到更高产、稳定、优质的培养基。

目前,国内外市场上的 IC 疫苗大多为传统的灭活疫苗,其他类型疫苗还很少。近年来,国内外有不少研究报道基因工程疫苗,其中以原核表达的

亚单位疫苗需要经过繁琐的纯化工艺、难以产业化^[11]。此外,真核细胞表达重组抗原的工艺技术还不成熟,用其制备的疫苗安全性、有效性还没有大量的数据支撑。面对如今混合感染多发、防疫密度过大、防疫负担过重的养殖压力,基因工程疫苗固然前景广泛,传统疫苗也会一直稳定而有效的发挥着作用。因此,干粉培养基研究仍要坚定不移地为疫苗产业及畜牧业发展做好基础保障。

参考文献:

[1] 吕红超,王 慧,程小果,等. 鸡传染性鼻炎疫苗研究进展[J]. 畜牧与饲料科学. 2019,40(12):98-101.

 Lv H C, Wang H, Cheng X G, et al. Research progress of chicken infectious rhinitis vaccine[J]. Animal Husbandry and Feed Science. 2019,40(12):98-101.

[2] 沈 旭. 副鸡嗜血杆菌 HB 株的分离、鉴定及其高密度发酵的研究[D]. 吉林大学:动物医学学院,2013.

 Shen X. Study on Isolation, Identification and High-density Fermentation of *Haemophilus paragallinarum* HB Strain[D]. Jilin University, 2013.

[3] 农业部兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程二〇〇〇年版[S].

 Committee of Veterinary Biological products of Ministry Agriculture. The veterinary biological products regulations of the People's Republic of China, 2000 edition[S].

[4] 叶红玲,刘 冬,任文涛. 半微量凯氏定氮法快速测定复混肥料

- 中总氮含量的研究[J]. 安徽农业科学. 2015,43(31):28-29.
- Ye H L, Liu D, Ren W T. Rapid Detection of Total Nitrogen Content in Compound Fertilizers by Semi-micro Kjeldahl Method [J]. Journal of Anhui Agri. Sci. 2015,43(31):28-29.
- [5] 闫秋成,姜秀梅. 酸度计连续滴定法测定果汁中总酸及氨基态氮[J]. 山东畜牧兽医,2012,33(02).
- Yan Q C, Jiang X M. Determination of Total Acid and Amino Nitrogen in Fruit Juice by Acidimeter Continuous Titration [J]. Shandong Animal Husbandry Veterinary. 2012,33(02).
- [6] 赵贵明. 微生物培养基及其原材料质量控制[M]. 北京:中国标准出版社,2018:82-83.
- Zhao G M. Quality Control for Microbiological Culture Media and Raw Material[M]. Press, Standards Press of China, 2018:82-83.
- [7] 吕娟,周刚,李振莲,等. 凝胶过滤色谱法测定蛋白胨中多肽的相对分子质量分布[J]. 食品安全质量检测学报,2008,11(15).
- Lv J, Zhou G, Li Z L, *et al.* Determination of Relative molecular mass distribution of polypeptides in peptone by gel filtration chromatography [J]. Shandong Animal Husbandry Veterinary. 2008,11(15).
- [8] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部[M]. 北京:中国农业出版社,2015年:附录 40.
- Committee of China Veterinary Pharmacopoeia [M]. Beijing: Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China, 2015: Appendix 40.
- [9] 张传好,郭杰夫,李海涛,等. 小分子肽的研究进展及应用情况[J]. 化学试剂,2015,37(8):707-710.
- Zhang CH H, Guo J F, Li H T, *et al.* Progress and Application of Small Molecular Peptides [J]. Chemical Reagents, 2015,37(8):707-710.
- [10] 肖怀秋,李玉珍. 微生物培养基优化方法研究进展[J]. 酿酒科技,2010(01):90-93.
- Xiao H Q, Li Y Zh. Research Progress in the Optimization of Microbial Culture Medium [J]. Liquor-Making Science & Technology,2010(01):90-93.
- [11] 潘杰,李晓明,迟强伟,等. 副鸡嗜血杆菌三价基因工程亚单位疫苗制备方法及运用[P]. 中国:CN114262719A,2022-04-01.
- Pan J, Li X M, Chi Q W, *et al.* Preparation method and application of trivalent genetically engineered subunit vaccine of *Haemophilus paragallinarum*[P]. China: CN114262719A, 2022-04-01.

(编辑:侯向辉)