

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 35/74

A61K 9/19 A61P 31/04



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310105575.1

[43] 公开日 2004 年 11 月 17 日

[11] 公开号 CN 1546064A

[22] 申请日 2003.12.5
[21] 申请号 200310105575.1
[71] 申请人 颜世敢
地址 250100 山东省济南市桑园路 10 号
共同申请人 朱丽萍
[72] 发明人 颜世敢 朱丽萍 任素芳 曹洪敬
徐培莲

[74] 专利代理机构 济南诚智商标专利事务所有限
公司
代理人 王汝银

权利要求书 1 页 说明书 13 页

[54] 发明名称 一种防治鸡白痢的冻干微生态制剂
[57] 摘要

一种防治鸡白痢的冻干微生态制剂，该制剂中含有具有一定活菌数的嗜酸乳杆菌 (ATCC4356)、粪肠球菌 (CMCC 1.130) 和地衣芽孢杆菌 (ATCC25972)。采用涂片法测定，冻干后上述三株菌种的活菌总数为 2.60×10^{12} CFU/ml，细菌存活率为 86.7%，含水量为 1.8%，常温保存 10 个月活菌数不低于 10^{10} CFU/ml。冻干保护剂为 10% 脱脂乳粉 + 10% 蔗糖 + 5% 甘油 + 5% 谷氨酸钠。该制品安全、无毒，用于鸡沙门氏菌人工感染临床防治试验临床有效率达 93%。为鸡沙门氏菌病的清除和净化，降低畜产品的药物残留及避免细菌耐药性产生提供了一条有效的生态防治途径。经试验经济、社会、生态效益显著，具有广阔的应用前景。

ISSN 1008-4274

1、一种防治鸡白痢的冻干微生态制剂，其特征在于制剂中含有具有一定活性和菌数的嗜酸乳杆菌、粪肠球菌和地衣芽孢杆菌。

2、根据权利要求 1 所述的一种防治鸡白痢的冻干微生态制剂，其特征在于所述的制剂为添加冻干保护剂的冻干微生态制剂，采用涂片法测定，冻干后上述三株菌种的活菌总数为 2.60×10^{12} CFU/ml，含水量为 1.8%。

3、根据权利要求 2 所述的一种防治鸡白痢的冻干微生态制剂，其特征在于冻干保护剂为 10%脱脂乳粉+10%蔗糖+5%甘油+5%谷氨酸钠。

4、根据权利要求 1 所述的一种防治鸡白痢的冻干微生态制剂，其特征在于所述的嗜酸乳杆菌、粪肠球菌、地衣芽孢杆菌均为标准菌，编号分别为嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) ATCC4356，粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) CMCC 1.130、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) ATCC25972。

一种防治鸡白痢的冻干微生态制剂

技术领域

本发明涉及一种防治鸡白痢的冻干微生态制剂。

背景技术

鸡白痢是由鸡白痢沙门氏菌引起的严重危害雏鸡的一种可垂直传播的传染病。药物防治是目前控制鸡白痢的有效措施,但往往造成耐药菌株出现、药物残留和停药后易复发,因此探索一种更有效而且环保的防治措施和防治制剂是大势所趋。

乳酸菌生长的营养条件要求高,多数严格厌氧,因而在正常条件下培养难度高、对外界抵抗力差,难以制备和长期保存。Wright 指出保加利亚乳杆菌对低温处理敏感而导致细胞在结构和功能上的损害,使其保存困难。

1911 年 Heckly 和 Hammer 最先采用冷冻干燥方法来保存微生物,至七十年代随着菌粉的制备、冷冻干燥技术的完善,许多研究者发现冷冻干燥方法具有其他方法无法比拟的优点,得到越来越广泛的应用。冷冻干燥不同于从液相直接进行干燥的方法,在冻干过程中很少引起细胞的收缩,制品容易再水化,制品能在长时间内保持稳定而不需特殊的储存条件,同时便于运输。然而冷冻干燥不仅需要专门的设备,而且需要较为完善的工艺,要保持菌体在冷冻干燥过程中具有较高存活率,需要多方面的优化条件协调起来才能达到。

微生态制剂的应用虽然开辟了一条防治疾病的新途径,而且是一条效果好、成本低、无污染的好方法。但微生态制剂应用效果的好坏除与选用菌种的品质有关,另一个重要影响因素就是活菌数的多少和保存期。目前在防治鸡白痢方面的经济有效的冻干微生态制剂尚未见之于报道。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是克服上述现有技术的不足,提供一种安全无毒、活菌数高、保存期长、防治效果显著的一种防治鸡白痢的微生态制剂—白痢净。

本发明的技术方案是该种防治鸡白痢的微生态制剂,其特征在于制剂中含有具有一定活菌数的嗜酸乳杆菌(ATCC4356)、粪肠球菌(CMCC 1.130)和地衣芽孢杆菌(ATCC25972)。

所述的制剂为添加冻干保护剂的冻干微生态制剂,采用涂片法测定,冻干后上述三株菌种的活菌总数为 2.60×10^{12} CFU/ml,含水量为 1.8%。冻干保护剂为 10%脱脂乳粉+10%蔗糖+5%甘油+5%谷氨酸钠。

所述的嗜酸乳杆菌、粪肠球菌、地衣芽孢杆菌均为标准菌,编号分别为嗜酸乳杆菌

(*Lactobacillus acidophilus*) ATCC4356, 粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) CMCC 1.130、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) ATCC25972。上述标准菌为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心提供, 对公众开放。

现以下述几个方面的内容说明本发明的属性, 这几个方面的内容是: 嗜酸乳杆菌和粪肠球菌的生物学特性研究; 微生态制剂白痢净防治雏鸡沙门氏菌人工感染的疗效实验; 微生态制剂白痢净的毒性试验; 微生态制剂白痢净的稳定性实验。

一 嗜酸乳杆菌和粪肠球菌的生物学特性研究

乳酸菌是一类能利用糖产生大量乳酸的革兰氏阳性菌的总称。健康动物的肠道内存在着大量的对机体有益的乳酸菌, 它们构成了消化道内微生物的优势菌群, 能够分解碳水化合物, 产生多种有机酸, 提高机体的消化机能, 促进营养物质的吸收, 竞争性的抑制某些病原菌和肠道内有害菌的增殖, 还对免疫系统的发育等有着重要的意义。不同品种的动物及其消化道不同位置存在的乳酸菌的种类和数量不同。大部分的菌株具有种属特异性。嗜酸乳杆菌和粪肠球菌是鸡肠道内的主要优势菌群, 其对生物体的有益作用已被许多研究结果所证实。

1 材料

1.1 实验动物: SPF 鸡, 30 日龄, 山东省 SPF 鸡研究中心提供。小白鼠, 18-22g, 山东大学实验动物中心提供。健康雏鸡, 山东农科院畜牧兽医研究所实验场提供。

1.2 培养基

MRS 培养基: 蛋白胨 10g, 牛肉浸膏 10g, 酵母浸膏 5g, 葡萄糖 20g, 吐温-80 1g, K_2HPO_4 2g, 醋酸钠· $3H_2O$ 5g, 柠檬酸三铵 2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.05g, L-半胱氨酸盐酸盐 0.5g, 1% $CaCO_3$, 蒸馏水 1000ml, 加 15g 琼脂即制备固体培养基。pH7.0, 121℃ 15min。

生化试验培养基: 糖发酵培养基、明胶、吲哚、硫化氢、耐酸试验用培养基均按文献配制。

1.3 标准菌:

嗜酸乳杆菌 (ATCC4356)、粪肠球菌 (CMCC 1.130) 和地衣芽孢杆菌 (ATCC25972), 均为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心提供。

鸡白痢沙门氏菌 C₇₉₋₁₄、禽源大肠杆菌 O₇₈, 由中国兽药监察所提供。

2 方法

2.1 氧吸收试验: 将分离菌接种 MRS 琼脂平板, 恒温培养箱中 37℃ 有氧培养 48h, 观察各菌的生长特性。

2.2 产酸试验: 分离菌分别接种 MRS 液体培养基 (pH7.0), 37℃ 培养 24 小时, 用 pH

计测定培养基的 pH 值变化。

2.3 耐酸实验：分别挑取各分离菌单菌落接种 pH 值为 2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 的 MRS 液体培养基，37℃培养 24h，平板计数。

2.4 胆盐耐受性试验：参考 Barbara 的方法加以改进。将分离菌的 24h 培养物调整到菌液浓度为 10^{11} cfu/L，取菌液 0.1ml 与 10ml 含 0%~1.0% 的胆盐的 MRS 琼脂（预先融化并冷却至 45℃）混合后浇注平板，37℃厌氧培养 48h，观察是否生长。

2.5 粘附性试验：参照 Annika 的方法，取 1 月龄 SPF 鸡整段小肠，剪开后用 pH7.2 的 PBS 冲掉内容物，浸于 PBS 中，4℃放置 30min，使表面粘液松散，用 PBS 洗涤 5 次，用载玻片将肠粘膜上皮细胞轻轻刮下，悬浮于 30ml PBS 中，涂片，革兰氏染色，镜检无菌再用。将分离菌用 PBS 稀释为约 10^{11} CFU/L，取 1ml 菌悬液与 1ml 细胞悬液在试管中混合，于 37℃下 20r/min 振荡 30min。涂片、革兰氏染色、显微镜下观察菌体的粘附情况。

2.6 药敏试验：常规纸片法。分离菌菌液稀释为 2×10^7 /ml，用灭菌吸管吸取 0.1ml 菌液，涂布于 MRS 琼脂平板培养基，干燥片刻，放置药敏纸片，每个平皿放 6 块，贴紧培养基表面，厌氧培养 24h，观察抑菌圈。每个处理组重复 3 次，取平均值。判定标准：无抑菌圈为不敏感，抑菌圈直径 <10mm 为低敏，抑菌圈直径 10-15mm 为中敏，抑菌圈直径 >15mm 为高敏。

2.7 抑菌试验：方法同药敏试验。用分离菌的菌液离心后的上清浸泡灭菌纸片。在营养琼脂平板上涂布大肠杆菌、沙门氏菌，待平板表面稍干，放置吸有菌液的纸片。37℃有氧培养 20 小时，观察有无抑菌圈。

2.8 毒性实验：将分离菌菌液浓度调整为 6×10^9 /ml。每种菌口服接种 5 只小白鼠和 10 只 1 日龄雏鸡，剂量为 0.5ml，设 5 只小白鼠和 5 只雏鸡作空白对照，常规饲养 20 天（颗粒料中不添加药物），注意观察小鼠和雏鸡的精神、食欲、运动，实验结束时剖杀检查脏器尤其是消化道的病变。

3 结果

3.1 氧吸收试验结果：3 株菌均为兼性厌氧菌，在有氧、厌氧条件下均能生长，在厌氧条件下菌落大（ $\phi 2\text{mm}$ ），有氧条件下菌落很小。

3.2 产酸试验：嗜酸乳杆菌（ATCC4356）、粪肠球菌（CMCC 1.130）生长后能使 MRS 培养基的 pH 值由原来的 7.0 下降到 5.0 甚至更低，而地衣芽孢杆菌（ATCC25972）不产酸。

3.3 耐酸试验：嗜酸乳杆菌（ATCC4356）在 pH3.0 以上培养基中均能存活。粪肠球菌（CMCC 1.130）和地衣芽孢杆菌（ATCC25972）在 pH 值小于 5.0 的培养基中几乎不生长。

3.4 胆盐耐受性试验：嗜酸乳杆菌（ATCC4356）、粪肠球菌（CMCC 1.130）和地衣芽孢杆菌（ATCC25972）均能耐受 0.8%~1.0% 的牛胆盐。

3.5 粘附性：镜检发现嗜酸乳杆菌（ATCC4356）呈丛状聚集于上皮细胞表面。粪肠球菌（CMCC 1.130）和地衣芽孢杆菌（ATCC25972）无粘附性。

3.6 药敏试验结果：3株菌的药物敏感性基本一致，对痢特灵、头孢唑啉、青霉素高度敏感，而对卡那霉素、环丙沙星、磺胺类药物有耐药性。

3.7 抑菌试验：嗜酸乳杆菌（ATCC4356）、粪肠球菌（CMCC 1.130）的菌液对致病性大肠杆菌、沙门氏菌产生明显的抑菌圈（ ϕ 13mm）。地衣芽孢杆菌（ATCC25972）不产生抑菌圈。

3.8 毒性试验结果：所有受试小白鼠和雏鸡在试验期内精神、食欲正常，未出现一只死亡，剖检脏器未见异常，表明各分离菌经口服对小白鼠和雏鸡均无毒性作用。

4 结论

4.1 生物学特性研究表明从产酸性、耐酸性、耐胆盐性、氧吸收性、粘附性、抑菌性等生物学特性综合评判嗜酸乳杆菌（ATCC4356）、粪肠球菌（CMCC 1.130）和地衣芽孢杆菌（ATCC25972）各方面性能较好，适合作为研制微生态制剂的菌种。

4.2 嗜酸乳杆菌（ATCC4356）、粪肠球菌（CMCC 1.130）和地衣芽孢杆菌（ATCC25972）属于美国FDA(1989)和我国农业部（1996）公布的对动物无致病性可直接用于动物饲料的41种细菌之列。

4.3 菌株的粘附性好坏也是决定益生菌质量高低的关键因素之一。鸡肠道中的pH值通常较低，还存在胆盐等物质，因此，益生菌必须有良好的耐酸能力和耐胆盐能力，才能在酸性环境中发挥作用。嗜酸乳杆菌具有耐胆盐、耐酸等特点，对畜禽常见致病菌有抑制作用，对动物体安全无毒，预期可作为益生菌生产菌。

二、微生态制剂白痢净防治雏鸡沙门氏菌人工感染的疗效实验

1、实验材料

1.1 微生态制剂“白痢净”：为自行研制的冻干制剂，菌种为嗜酸乳杆菌（ATCC4356）、粪肠球菌（CMCC 1.130）和地衣芽孢杆菌（ATCC25972）。冻干制剂的菌数为每瓶含菌 3×10^{12} CFU，生产批次为20020718。

嗜酸乳杆菌培养液：嗜酸乳杆菌接种MRS培养基制备，菌数调整为 20×10^9 CFU/ml。

粪肠球菌培养液：粪肠球菌接种MRS培养基制备，菌数调整为 20×10^9 CFU/ml。

地衣芽孢菌培养液：地衣芽孢菌接种营养琼脂平板制备，菌数调整为 20×10^9 CFU/ml。

1.2 试验动物：海兰蛋公雏，山东省农科院畜牧兽医研究所实验鸡场提供。

1.3 鸡白痢沙门氏菌标准菌和标准血清：鸡白痢沙门氏菌标准株 C₇₉₋₁₄ 及其标准阳性血清，购自中国兽药监察所。

1.4 细菌培养基：普通营养琼脂平板培养基、SS 琼脂平板培养基、肉汤培养基、改良 MRS 琼脂平板等，均按常规方法制备。

1.5 仪器：厌氧培养箱、恒温培养箱等。

2、实验方法

2.1 预备试验—攻毒剂量的筛选：将鸡白痢沙门氏菌标准菌接种于添加有 5%血清的肉汤培养基中，37℃振荡培养 20h，依次传代，制备三级种子液，接种营养琼脂平板进行细菌计数。正式实验进行前先饲养一批雏鸡摸索攻毒剂量，每组 10 只，共 5 组，在 3 日龄时经口接种鸡白痢沙门氏菌菌液，剂量分别为 6×10^{11} 、 6×10^{10} 、 6×10^9 、 6×10^8 、 6×10^7 。根据症状出现早晚、发病率、病死率等指标综合筛选合适的攻毒剂量。

2.2 实验分组：如表 1。在雏鸡出壳后即随机分成 12 组，每组 50 羽。I、II、III 组白痢净高中低剂量组，每只分别投服含 4、2、1 ($\times 10^{10}$ 个菌) 的液体活菌制剂。第 IV、V、VI 组分别投服嗜酸乳杆菌培养液、粪肠球菌培养液、地衣芽孢杆菌培养液，剂量均为 2×10^{10} 个菌/只。第 VII 组土霉素对照组，用 400ppm 拌料。第 VIII 组为鸡白痢沙门氏杆菌攻毒对照组，不用活菌制剂。IX 为空白对照组，不用活菌制剂，不攻毒。IX 组与其他组隔离饲养。所有雏鸡笼养，饲喂不含抗生素和抗球虫药的雏鸡全价料，自由采食和饮水。

2.3 菌数核定和投药方式：试验时对研制的微生态制剂重新核定菌数， $10 \times$ 倍比稀释，取 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 稀释度的稀释液各 0.1ml，接种 MRS 琼脂平板和营养琼脂平板，37℃厌氧和有氧培养 24 小时，计数。

投药方式：在雏鸡出壳后立即投服微生态制剂，第一次为滴管投服，以后为饮水投服。每次饮水投药前停水 2 小时，按饮水量和菌液浓度计算制剂的添加量。

2.4 临床防治试验：I~VI 组从 1 日龄开始，每只每日饲喂 2 次活菌制剂，连喂 7 天。3 日龄时，I~VIII 组雏鸡经口滴服鸡白痢沙门氏菌菌液。观察鸡群临床表现，记录发病和死亡数量。30 日龄时称重，统计各组死亡率、存活率及平均增量，同时每组宰杀存活鸡 5 只，取 1g 盲肠内容物作鸡白痢沙门氏杆菌的分离培养、鉴定和计数。

2.5 沙门氏菌的鉴定：先用沙门氏菌选择培养基增菌培养，然后再用 SS 鉴别培养基进行分离培养，挑选疑似菌落用沙门氏菌阳性血清进一步进行定性鉴定。

3、实验结果

3.1 攻毒剂量的选定：攻毒剂量太大则 24 小时内死亡率达 90% 以上，根本来不及治疗。剂量太小发病较晚且发病率低。最后选定攻毒剂量为 6 亿菌/只，攻毒 24 小时左右发病，能达到 95% 的发病率和 40% 的病死率。

3.2 人工感染防治实验结果：阳性对照组的雏鸡在攻毒后 20 小时表现精神不振，食欲减退，40 小时出现拉稀症状，肛门周围粘有灰白色稀粪，96 小时出现死亡，120~144 小

时出现死亡高峰，以后不再出现死鸡，但存活鸡都表现为发育迟缓，体重和个头明显不如空白对照组。发病率、病死率分别为 95%、40%。从病死鸡的肝脏分离到鸡白痢沙门氏菌（C₇₉₋₁₄）。

“白痢净”试验组（I~III）的发病时间比阳性对照组推迟约 30 小时，发病率分别为 2%、10%、44%，病死率分别为 0%、6%、20%。药物对照组的发病率、病死率都明显低于阳性对照组。生物学统计表明，I、II 与 III 组之间差异显著，I、II 组之间差异不显著。实验结果表明，微生态制剂“白痢净”防治鸡白痢沙门氏菌病有疗效，疗效与土霉素相当。

3.3 增重情况比较：1 日龄雏鸡的体重相当，而 30 日龄时阳性对照组的体重只有 232.12 克，明显低于空白对照组的 300.20 克。白痢净组比空白对照组增重 97.95g，药物实验组的体重都高于空白对照组，表明微生态制剂有明显的增重效果。I~III 组 30 天平均增重分别为 334.42g、314.92g、273.19g，与阳性对照组相比差异显著。如表 2。

3.4 沙门氏菌检测：药物对照组的存活鸡生长发育正常。30 日龄时剖杀存活鸡，取肠道内容物作沙门氏菌的分离、鉴定和定性检测。结果表明，实验 I、II 组为阴性，III 组沙门氏菌的检出率为 12%，与阳性对照组之间差异显著。

4、结论

4.1 本实验结果表明，早期饲喂微生态制剂“白痢净”能有效防治鸡白痢沙门氏菌的大剂量的人工感染，能降低发病率和病死率，疗效与土霉素相当，是有效控制鸡白痢的生物防治措施。

表 1、“白痢净”防治鸡白痢沙门氏菌人工感染的临床实验							
组别	攻毒 只数	发病数 只数	发病率	病死数 只数	病死率	存活 只数	沙门氏菌 检出率
白痢净高剂量组	50	1	2%	0	0%	50	0
白痢净中剂量组	50	5	10%	3	6%	47	0
白痢净低剂量组	50	22	44%	10	20%	40	12%
嗜酸乳杆菌制剂	50	7	14%	4	8%	46	5%
粪肠球菌制剂	50	13	26%	8	16%	42	20%
地衣芽孢杆菌制剂	50	15	30%	11	22%	39	34%
土霉素防治组	50	6	12%	3	6%	47	4%
阳性对照组	50	48	95%	20	40%	30	100%
空白对照组	50	0	0	0	0	50	0

表 2、各组增重情况（g）					
组别	攻毒 只数	存活 只数	1d 重	30d 重	平均增重
白痢净高剂量组	50	50	45.20	379.62	334.42
白痢净中剂量组	50	47	45.52	360.44	314.92

白痢净低剂量组	50	40	45.31	318.50	273.19
嗜酸乳杆菌制剂	50	46	45.30	340.30	295.0
粪肠球菌制剂	50	42	46.26	312.0	265.74
地衣芽孢杆菌制剂	50	39	45.84	323.50	277.66
土霉素防治组	50	47	45.40	322.03	276.63
阳性对照组	50	30	45.10	232.12	187.02
空白对照组	50	50	45.37	300.20	254.83

4.2 通过本实验可以看出，微生态制剂的临床预防量以 10^{10} 的数量级为宜。按每鸡 4×10^{10} 、 2×10^{10} CFU 的剂量用于防治鸡白痢沙门氏菌感染的临床有效率为 93%、85%。

4.3 通过比较实验鸡的增重可以看出，微生态制剂“白痢净”实验组的存活鸡的体重都高于空白对照组，表明该制剂有增重效果。其机理可能与微生物之间的竞争排斥有关，这也可以通过沙门氏菌定性检测结果得到证实，药物实验组的沙门氏菌检出率都显著低于阳性对照组。

4.4 多菌种制剂的防治效果优于单一制剂。研制的 3 种菌的制剂与盲肠培养物的效果相当。

三、微生态制剂白痢净的毒性试验

安全性是微生态制剂的首要的而且是必备的要素。本实验对自行研制的微生态制剂进行了小白鼠急性毒性试验、亚急性毒性试验、最小致死量测定和雏鸡安全性试验。

1、实验材料

1.1 受试药品：白痢净，冻干剂，保存时间为 5 天。

1.2 实验动物：小白鼠，18-22g，山东大学实验动物中心提供。

1 日龄海兰公雏，山东农科院畜牧兽医研究所实验场提供。

1.3 细菌计数培养基：MRS 培养基、营养琼脂平板等培养基，按文献介绍的方法配制。

1.4 仪器：厌氧培养箱、恒温培养箱、曲玻棒等。

2、实验方法

2.1 细菌计数：制剂以灭菌生理盐水递进稀释，分别接种 MRS 液体培养基和营养琼脂平板，MRS 平板置厌氧培养箱内，营养琼脂平板置恒温培养箱内， 37°C 静置培养 24 小时，细菌计数。

2.2 急性毒性实验：每种制剂分别接种 5 只小白鼠，剂量为 0.5ml，腹腔注射，另设 5 只作对照，注射灭菌盐水，常规饲养（饲料中不添加药物），观察 3 天，注意观察小鼠的精神状态和食欲，实验结束时剖杀检查各脏器的病变。

2.3 亚急性毒性试验：每种制剂分别接种 5 只小白鼠，剂量为 1ml，口服，另设 5 只口服灭菌盐水作对照，连续投服 7 天，常规饲养（饲料中不添加药物），观察 3 试验期 30

天，注意观察小鼠的精神状态和食欲，实验结束时小鼠称重，剖杀检查各脏器尤其是消化道的病变。

2.4 最小致死量测定：用健康小白鼠 65 只，分成 11 个组，每组 5 只。I-V 组腹腔注射冻干制剂，每只剂量分别为 2、4、8、16、32 亿个活菌，另设空白对照，观察 7 天。

2.5 雏鸡安全性实验：每种制剂经口投服 1 日龄雏鸡各 30 只，10 只空白对照，每只鸡每次 10 亿菌，每天 2 次，连续投服 7 天，观察 30 天。注意雏鸡的精神状态和食欲，实验结束时雏鸡称重，剖杀检查各脏器尤其是消化道的病变。

3、实验结果

3.1 细菌计数结果：冻干制剂保存 5 天的活菌数分别为 $2 \times 10^{10}/\text{ml}$ 、 $3 \times 10^{12}/\text{ml}$ 。

3.2 急性毒性实验结果：试验小鼠没出现一只死亡，精神状态、毛色、食欲等与对照组没有差别，剖检未发现脏器有肉眼可见病变。

3.3 亚急性毒性实验结果：实验期内试验小鼠没出现死亡，精神状态、毛色、食欲等与对照组没有差别，剖检未发现脏器有可见病变，消化道粘膜正常，没有肿胀、出血等病变。试验小鼠的体重平均比对照鼠重 5g。

3.4 最小致死量实验结果：各个剂量组的小鼠都没出现死亡，说明研制的制剂对小白鼠的最小致死量大于 32 亿/只。

3.5 雏鸡安全性实验结果：以 20 亿菌/天的剂量给雏鸡投服，试验期内精神、食欲等正常，没有出现一只鸡死亡，说明该制剂对雏鸡是安全的。剖检未见脏器出现病变，消化道也粘膜正常。制剂应用组平均体重比对照分别重 60.4g、55.12g，说明该制剂还有一定的增重效果。

4、结论

通过小白鼠急性毒性实验、亚急性毒性试验、最小致死量测定和雏鸡安全性试验证实，研制的微生态制剂白痢净是安全的。

四、微生态制剂白痢净的稳定性实验

保存期的长短是决定微生态制剂使用效果的重要因素。微生态制剂中的活菌数与保存期、保存条件的关系是微生态制剂的重要指数。本文就自行研制的微生态制剂的活菌数与保存期、保存条件的关系进行了研究。

1、材料与方法

1.1 实验材料：冻干微生态制剂白痢净，为自行研制。保存期分别为 0、15、30、60、90、120、180、240、300、360 天，分别保存于 4℃ 和常温条件下。

1.2 计数培养基：

嗜酸乳杆菌、粪肠球菌计数培养基为 MRS 培养基。地衣芽孢杆菌计数培养基为营养琼脂平板。均按常规方法配制。

1.3 实验仪器:

- 厌氧培养箱, 德国 HERAEUS 公司生产。
- pH211 计, 意大利哈纳仪器公司生产。
- 生物显微镜, XSP—18 型, Olympus。
- 恒温箱, 型号 SC303-4, 浙江嘉兴新胜电器厂。
- 超净工作台, 苏州净化设备有限公司。
- 培养皿若干, 接种棒, 三角刮刀, 离心机等。

1.4 实验方法:

取保存于 4℃和常温下的保存期为 0、15、30、60、90、120、180、240、300、360 天的不同批次的冻干制剂, 倍比稀释, 分别接种 MRS 固体培养基和营养琼脂平板, MRS 固体培养基厌氧培养, 营养琼脂平板有氧培养, 37℃培养 48h, 细菌计数。

2、实验结果

不同剂型制剂的菌数与保存条件和保存期的关系见下表。

表 1、菌数与保存条件和保存期的关系

温度	0	15	30	60	90	120	180	200	300	360
4℃	2.6×10 ¹²	2.6×10 ¹²	2.6×10 ¹²	2.6×10 ¹²	2.6×10 ¹²	2.51×10 ¹²	2.45×10 ¹²	2.42×10 ¹²	2.40×10 ¹²	2.2×10 ¹²
常温	2.6×10 ¹²	2.52×10 ¹²	2.40×10 ¹²	2.24×10 ¹²	2.09×10 ¹²	1.02×10 ¹²	9.22×10 ¹¹	2.62×10 ¹¹	7.46×10 ¹⁰	4.44×10 ⁸

3、结论:

冻干剂型微生态制剂受温度影响小, 保存时间长。常温下存放 10 个月, 活菌数不低于 10¹⁰。

根据上述实验验证, 因此本发明的有益效果是:

一、研制的嗜酸乳杆菌 (ATCC4356)、粪肠球菌 (CMCC 1.130) 和地衣芽孢杆菌 (ATCC25972) 微生态制剂冻干制品, 活菌数为 2.6×10¹²CFU/ml, 细菌存活率为 86.7%, 含水量为 1.8%。常温保存 10 个月活菌数不低于 10¹⁰CFU/ml。

二、对上述微生态制剂进行了毒性实验、稳定性试验和效力试验。小白鼠毒性试验和雏鸡安全性试验证实该制品安全、无毒。研制的微生态制剂用于鸡沙门氏菌人工感染临床防治试验, 结果表明临床有效率达 93%。

三、研制的微生态制剂为鸡沙门氏菌病的清除和净化, 降低畜产品的药物残留及避免

细菌耐药性产生提供了一条有效的生态防治途径。经试验经济、社会、生态效益显著，具有广阔的应用前景。

具体实施方式

冻干微生态制剂—白痢净及冻干工艺

1、材料与方法

1.1 材料

1.1.1 生产用菌种：嗜酸乳杆菌（ATCC4356）、粪肠球菌（CMCC 1.130）和地衣芽孢杆菌（ATCC25972），为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心提供。经一级、二级活化后按 10%接种量接种液体培养基。

1.1.2 培养基：MRS 培养基。

1.1.3 冻干保护剂 蔗糖、葡萄糖、山梨醇、甘露醇、甘油、谷氨酸钠等均为分析纯试剂或生化试剂。

1.1.4 器材：

冻干机，YRD-4503B 型，上海玉成干燥设备有限公司生产。

厌氧培养箱，德国 HERAEUS 公司生产。

pH211 计，意大利哈纳仪器公司生产。

恒温箱，型号 SC303-4，浙江嘉兴新胜电器厂。

超净工作台，苏州净化设备有限公司。

生物显微镜、大容量离心机、培养皿若干，接种棒，三角刮刀，离心机等。

1.1.5 实验动物：小白鼠，18-22g，山东大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 工艺流程：

菌种活化→富集培养→菌体浓缩→保护剂的选择→菌悬液的制备和活菌计数→分装→冷冻干燥

1.2.2 乳酸菌的富集培养、菌体浓缩和菌悬液的配制

嗜酸乳杆菌、粪肠球菌接种 MRS 液体培养基（pH7.0）中，37℃培养至对数生长期。

无菌室内 4℃下 4000rpm 离心 15min，迅速倒掉上清液，将菌泥悬浮于 10%的灭菌脱脂乳中制备菌悬液，活菌计数。

地衣芽孢杆菌接种于营养琼脂培养基上，37℃培养，待镜检 95%的细菌生成芽胞时，用灭菌生理盐水洗脱菌苔，搅拌成均一的菌悬液，计数。

将乳酸菌：芽孢菌数按 1000：1 的比例混匀，使加入保护剂后的菌液最终浓度为 3

$\times 10^{12}$ CFU/ml, 分装于灭菌冻干瓶中, 装量为每瓶 2ml。

1.2.3 冻干保护剂的筛选

以 10%脱脂乳粉+10%蔗糖为基础保护剂, 与一定浓度的甘油、谷氨酸钠进行组合, 通过比较冻干前后乳酸菌(嗜酸乳杆菌+粪肠球菌)的活菌残留量, 筛选出最佳冻干保护剂配方。

组别	10%脱脂乳粉 +10%蔗糖	5% 甘油	5%谷氨酸 钠
I	+		
II	+	+	
III	+		+
IV	+	+	+

冻干保护剂以 10%脱脂乳粉+10%蔗糖+5%甘油+5%谷氨酸钠为最佳。

1.2.4 冻干曲线的设计

1.2.4.1 共晶点的确定: 冷冻的温度应根据冷冻产品的共晶点来确定, 一般以低于共熔点以下 10~20℃为宜, 如高于共晶点, 在真空状态下未冻结的液体迅速蒸发, 造成样品的收缩, 颜色加深, 但温度又不能太低, 这样不仅浪费能源和时间, 对某些产品还会降低存活率。常用保护剂的共晶点为: 脱脂奶-26℃, 10%蔗糖-26℃, 40%蔗糖-33℃, 2%明胶与 10%蔗糖-19℃。但含有高分子物质保护剂的溶液不显示明确的共晶点而形成无定型的冰, 因此没有共熔点, 只有相当于共熔点的温度。象菌体悬液成分复杂, 共晶点难以测量, 为保险起见, 实际上冷却到-40℃以下。

1.2.4.2 分装: 悬浮菌液在无菌室内分装于灭菌冻干瓶中, 装量为 2 毫升/瓶, 半压塞, 装入冷冻机干燥箱中。

1.2.4.3 冷冻: 批量生产时可采用直接冷冻干燥。把冻干机压缩机的制冷能力调到最大, 使制品在短时间内温度降到期望值(-40℃)以下。本机在 60min 内使制品温度降到-48℃, 冷冻速度为 0.8℃/min, 维持 2 小时。

1.2.4.4 真空干燥: 干燥过程分为一次干燥、二次干燥。一次干燥是升华除冰(冷冻水)的过程, 二次干燥是高真空下除掉一部分结合水的过程。

一次干燥: 将冷阱温度降到-45℃后, 维持 30min, 把干箱真空度降到 10Pa 以下时, 加热制品, 使制品温度升到-6℃(缓慢升温, 约需 1h), 使制品始终处于 30Pa 的真空度下维持升华干燥约 10h。在一次干燥过程中不能使产品温度超过共晶点, 否则会发生产品熔化, 制品体积缩小, 甚至出现气泡, 颜色加深, 溶解困难等现象。一次干燥结束后样品残留水分为 5%~10%。

二次干燥：在 2h 内将板温缓慢由-6℃升至 30℃，维持 2-3h，当板温和制品温度基本重合时即可结束干燥。二次干燥后的含水量为 1%~3%。

整个干燥过程是在低于 30Pa 的真空度下完成的，冷冻真空干燥过程约需 22~24h。

1.2.4.5 残余水分检测：冷冻干燥结束后，在干箱处于真空状态下，进行残余水分检测。使冻干制品的水分含量为 1.50%~2.50%。

1.2.4.6 出箱：残余水分检测合格后，箱内压塞，充入干燥的无菌氮气，保持容器内的真空。

1.2.4.7 贮存温度：4℃或 37℃保存。

1.3 冻干制品的检验

1.3.1 显微镜检查：涂片、染色、镜检菌体完整性。

1.3.2 活菌数测定：总菌数测定采用涂片法。制品用灭菌生理盐水倍比稀释，接种 MRS 培养基，37℃温箱培养 48h，活菌计数。

1.3.3 活菌残留量测定：干燥前后的活菌残留量=干燥后的活菌数/干燥前的活菌数×100%。

1.3.4 含水量测定：制品置 105℃烘干 4h，烘干前后分别用电子天平称重，计算含水量。

1.3.5 急性毒性实验 制品细菌计数后，接种 5 只小白鼠，另设 5 只作空白对照，剂量为 10 亿菌/只，口服和腹腔注射各半，用不添加药物的饲料饲养 7 天，每天注意观察小鼠的精神状态、食欲和临床表现，实验结束时剖杀检查脏器尤其是消化道的病变。

2、结果

2.1 冻干保护剂的筛选试验：冻干前总菌数为 3.0×10^{12} CFU/ml，冻干后各组的活菌数和活菌残留量分别见下表：

组别	10%脱脂乳粉 +10%蔗糖	10%脱脂乳粉 +10%蔗糖+5%甘 油	10%脱脂乳粉 +10%蔗糖+5%谷 氨酸钠	10%脱脂乳粉 +10%蔗糖+5%甘 油+5%谷氨酸钠
活菌数	2.28×10^{12} /ml	2.49×10^{12} /ml	2.43×10^{12} /ml	2.60×10^{12} /ml
活菌残留量	76%	83%	81%	86.7%

2.2 冻干曲线的设计：经冻干试验检验表明，在共晶点不明确的情况下，以实际冷冻到-40℃以下，维持 2 小时，制品处于 30Pa 的真空度下温度在-6℃维持升华干燥约 10h，在 2h 内将板温缓慢由-6℃升至 30℃，二次干燥维持 2-3h，当板温和制品温度基本重合时即可结束干燥。

2.3 物理性状检查：制品外观呈粉红色，圆饼状，质地疏松，外观良好。

2.4 显微镜检查结果：冻干制品中的细菌形态完整，视野中很少发现细菌碎片。

2.5 活菌数测定和活菌残留量测定结果：冻干前总菌数为 3.0×10^{12} CFU/ml，冻干后总菌数为 2.60×10^{12} CFU/ml，活菌残留量为 86.7%。

2.6 含水量测定结果：制品的含水量为 1.8%，符合冻干制品残余水分应小于 2% 的标准，适于长期保存。

2.7 急性毒性实验：实验期内试验小鼠没出现一只死亡，精神、食欲和临床表现与对照组没有差别，剖检未发现脏器病变，消化道粘膜正常，没有肿胀、出血等病变。

3 冻干制剂的检验标准

3.1 物理性状检查：制品外观呈粉红色，圆饼状，质地疏松，外观良好。

3.2 显微镜检查：冻干制品中的细菌形态完整，视野中很少发现细菌碎片和杂菌。

3.3 纯度检验：成品接种麦康凯平板、SS 培养基、营养肉汤等培养基，有氧条件下 37℃ 恒温培养，应无大肠杆菌、沙门氏菌等杂菌污染。

3.4 活菌数测定和活菌残留量测定结果：冻干前、后活菌残留量应大于 70%。

3.5 含水量测定结果：制品的含水量符合冻干制品残余水分小于 2% 的标准。

3.6 毒性实验结果：制剂对小鼠应安全，无毒，不出现死亡，精神、食欲、体重与对照组没有差别，脏器尤其是消化道不应出现病变。

按照上述方法，使用公众易得到的标准菌，所述领域的技术人员均可实施出具有同样质量的本发明制剂。而且，冻干剂型微生物制剂受温度影响小，保存时间长。故不论是标准菌，还是本发明的冻干剂型微生物制剂，均不需要单独保藏。

产品使用说明

本品为活菌制剂，菌种对家禽无毒、无残留、无抗药性，属绿色产品。

本品对防治家禽腹泻有效果，可用于预防鸡白痢和大剂量内服抗生素后肠道菌群的重建。

本品不能与抗生素同时使用。

雏鸡使用效果优于成年鸡。

冻干制品外观粉红色，圆饼状，质地疏松，常温保存不超过 10 个月。

本品只能饮水或口服、拌料，注射无效。用前停水 1-4 小时。稀释后的菌液应在尽可能短的时间内用完。