

有关冻干布氏杆菌苗的 一些问题的研究

农业部南京兽医生物药品厂

刘友融 张泽人

——引言——

在冻干过程和储藏阶段中,活菌稳定与否,是衡量布氏杆菌活苗冻干质量的重要尺度。

本文着重探讨有关影响冻干布氏杆菌苗活菌数的几个问题。分析了一部分生产材料,同时结合生产作了若干试验,已经明确了一些问题。兹将各项结果报告于下。

一、培养基与细菌活存率的关系

为了提高每单位培养基的产苗量,我们在肝汤琼脂中加入1%葡萄糖,但据北京生物制品研究所报告^[1],培养基中含糖量高,虽可提高菌数但冻干后活存率低。为此,自六三年起我们修改了培养基的配方,将加入的1%葡萄糖废除,使细菌所需的糖原,完全由肝汤供给。测定新鲜猪肝琼脂的含糖量平均为6.58 mg/ml,而根据该所的报告,布氏菌苗培养基中的糖量仅需0.2—0.3%。这样我们用不加糖的培养基生产了189批菌苗,而六三年以前用加糖培养基生产了141批菌苗,这些菌苗的生产,除在培养基方面,有加糖及不加糖的区别以外,从接种至冻干完成的整个生产工艺,条件基本上是一致的。我们曾从这两类菌苗中抽出一定批数作冻干前和冻干后的活菌数比较,结果看到(表1):①肝汤琼脂内加入1%葡萄糖,其冻干前活菌数较不加糖者为低,前者平均仅含941亿/ml,而后者平均可达1401亿/ml,为加糖培养基的148.88%,可见肝汤琼脂中加入葡萄糖,不能促

表1 培养基内加糖和不加糖与布氏杆菌活菌数的关系

类别	批数	生产年度	冻干前平均活菌 亿/ml	冻干后平均活菌 亿/ml	活菌率%
培养基内加入1%葡萄糖	16	1962	941.00	541.80	57.58
不加糖培养基	28	1963	1401.00	792.82	56.59

- 注: 1. 冻干前活菌数为分装时抽样计数者,距洗菌收获日约6—8天。
2. 培养瓶为1500平方厘米平面的大型扁瓶,正面培养65小时左右,每瓶用10%蔗糖脱脂全奶保护剂750毫升洗菌,每平方厘米培养面用保护剂约0.5毫升。
3. 两组材料均采用第6线冻干,程序是: -35°C冻结4小时,升华时间为35小时,最高温度为+28°C保持一小时,真空度<45μ。

进布氏杆菌的生长。②用这两种培养基培养的活菌,用同种保护剂(10%蔗糖脱脂全奶)洗下,经冻干后,加糖者的平均活存率为57.58%;不加糖者为56.59%。也就是说,用同种同量保护剂,在同一冻干曲线的条件下,加糖和不加糖培养基的细菌存活率基本一致(见表1)。

二、冻干前液体原苗贮存时间与活菌衰亡的关系

为着明确收获后的液体原苗,在4—8°C冷库内能贮存多久,以便于合理安排生产进度和进行纯净检查,曾结合生产进行探索。方法是:收获完成立即抽样作活菌计数,同时将样品存放于4°—8°C冷库内定时取样数菌。从七批结果的平均值看来(表2),用10%蔗糖脱脂奶悬浮的布氏杆菌,在4°—8°C温度下,在58—62小时内死亡最快,以后则逐渐降低,至150—154小时(相当于收获后的第七天)约死亡20%。

表2 布氏杆菌原苗贮存时间对于活菌衰亡的影响(4—8°C贮存)

原苗贮存时间(小时)	收获后立即	34—38	58—62	82—86	124—130	150—154
活菌数(亿/ml)	1324.40	1212.05	1133.25	1092.95	1082.48	1058.64
活菌率(%)	100	91.52	85.56	82.53	81.73	79.93
死亡率(%)	0	8.48	14.44	17.47	18.27	20.07

三、原苗浓度与冻干后细菌存活率的关系

关于冻干前原苗浓度与冻干后活存率的关系的问题,很久以前, Otten (1930)曾用伤寒杆菌和霍乱弧菌作过研究^[6],他指出浓度大的菌悬液比同种浓度小的活存率高10倍。Stamp(1947)否定了 Otten 的结论,他的研究结果证明^[6,7]浓度小的悬液比浓度大的活存率高。Fry & Greaves(1951)为验证上述两种不同的结果^[6,8],用同一种细菌,稀释成三种不同的浓度,进行冻干,经3—8个月的保存试验,没有发现明显的差异。1962年长春生物制品研究所,曾进行了布氏杆菌浓度与活存率关系的研究^[2],用两种不同浓度的液体原苗,在同一条件下冻干,结果浓度小的(500—600亿/ml)比浓度大的(800—1,000亿/ml)活存率高40%。看来这一问题,尚未取得比较接近的结果,因为这个问题与提高干苗活菌产量有密切关系,我们认为有进一步探讨的价值。

研究的方法是:将布氏杆菌扁瓶培养物,按常规每大扁瓶加入10%蔗糖脱脂全奶700毫升洗菌收获,摇匀后,分为三瓶:一瓶为常规组,不再加入保护剂,其余两瓶按菌液700毫升加入200和400毫升的比例,加入保护剂稀释,并依次称为试验组-1及试验组-2。三组菌苗分别充分摇匀,在同一条件下分装冻干,冻干前各任取一瓶稀释计数,冻干完成同样作干后稀释数菌,以查明冻干过程中各组苗细菌的衰亡情况;并将冻干后各组材料贮存于4°—8°C冷库内,定期抽样计数活菌,以了解各组冻干苗在贮存过程中细菌的活存情况(所有试验材料稀释计数前均经真空测定证明真空良好者)。从三批试验结果的平均值(表3)可以看出:①常规组与试验组~1冻干后的活存率,基本没有差异,分别为64.26%及64.42%;而试验组~2的活菌率较高,为68.66%。②在4°—8°C冷库内贮存两个月后,试验组~2活菌的衰亡幅度较其余两组为小。③三组材料贮存四个月的結果活菌均呈大

幅度的降低,其中試驗組~2較其余兩組死亡尤多。④貯存至第八個月各組苗活菌的衰亡率不相上下,死亡速度逐漸緩慢,比四個月結果,分別下降4—7%。三組的貯存效果似乎看不出明顯差異。

表 3 布氏杆菌原苗的浓度与冻干后及貯存阶段細菌活存率的关系

組 別	每扁瓶 保护 剂 量 (毫升)	冻干前 活 菌 亿/ml	冻干后活菌		貯 存 阶 段 活 菌					
			亿/ml	%	二 个 月		四 个 月		八 个 月	
					亿/ml	%	亿/ml	%	亿/ml	%
常規組	700	1672.50	1075.00	64.26	868.00	53.45	437.00	29.11	385.76	23.07
試驗組—1	900	1257.50	785.00	64.42	606.25	48.21	364.75	29.00	274.77	21.85
試驗組—2	1100	987.50	678.00	68.66	615.90	62.37	264.50	26.78	227.00	22.99

必須說明,試驗材料貯存三個月后,冰庫突然发生故障;庫溫逐漸上升至28°C,試驗材料未轉移,仍在其中擱置約一月,致使整个試驗結果遭受影响。这可以从表 3 看出,貯存四个月的活菌数,三組均呈大幅度降低,显然这是高溫存放的結果。尽管如此,通过这一試驗,仍可看出布氏菌苗悬浮浓度与冻干后的活存率沒有明显关系,每毫升含菌不足 1,000 亿的較1,600亿左右者略可提高 4 % 左右。經4°—8°C冷藏两个月,前者的活存率显然較高于后者,但是經過高溫以后至第八個月,不同悬浮浓度的冻干布氏杆菌,死亡率基本一致。

四、有关菌苗保护剂的探討

已經肯定,保护剂是影响冻干制品质量的主要因素之一。关于这方面的研究,Heckly 等(1958,1960)先后在鼠疫杆菌及布氏杆菌的冻干研究中^[10,11],指出蔗糖、乳糖及葡萄糖在冻干过程中的稳定作用不相上下;但是在貯存阶段,葡萄糖組的活菌呈大幅度的衰亡,蔗糖及乳糖两者悬殊不大。我們为着解决生产中蔗糖来源的困难,对于这一問題,曾进行了研究:用同批脱脂奶,分別加入蔗糖、乳糖及葡萄糖,作为保护剂,其含量均为10%,并且用同一批布氏杆菌培养物,制成三組原苗,在同次运转中冻干,冻干前后均分別取样,检查活菌。根据几批的統計結果,說明冻干后的活存率,以蔗糖組最好,平均为 59.21%;乳糖組次之,平均为 49.57%;葡萄糖組最差,仅达 42.73%(表 4)。从各类苗的物理外观看,蔗糖組和乳糖組的干块,外觀上沒有明显差别,仍以葡萄糖組最差。因此我們沒有进行貯存阶段活菌的保存試驗。

表 4 保护剂中不同的糖类与布氏杆菌菌数的关系

苗 类	10%蔗糖脱脂全奶	10%乳糖脱脂全奶	10%葡萄糖脱脂全奶
批 次	4	3	3
冻干前平均活菌(亿/ml)	1029.25	968.33	1249.00
冻干后平均活菌(亿/ml)	608.50	480.00	533.66
活 菌 率	59.21%	49.57%	42.73%

关于保护剂內加入还原剂,以增强活菌的稳定效果的問題,据 Stamp^[7] Naylor 和 Smith^[12]以及 Gvanov & Koush^[13]认为在基础保护剂內,加入抗坏血酸及氯化铵等,可以

获得比较满意的结果。但是, Fry (1951) 却指出^[8,14]加入还原剂没有得到任何改进。

我们对上述问题,也进行了初步探讨,将 10%蔗糖脱脂全奶及 10%蔗糖 1%明胶水溶液,分别加入抗坏血酸,硫脲,氯化铵各 0.5%,作为两个试验组,分别以不加还原剂的保护剂作为对照,进行比较。各组苗于冻干前后抽样计数。试验材料均贮存于 4°—8°C 冷库内,每隔三月抽样两瓶(所抽样品均经测定证明真空良好),检查活菌的衰亡情况,以观察冻干过程中及贮存阶段活菌的稳定效果(表 5)。必须指出,这项试验的全部材料于贮存冷库的第二个月,由于冷库突然发生故障,以致在 28°C 搁置一月。我们可以从表 5 看到,贮存三个月的结果,四组的活菌数均显著降低,然而尽管在试验过程中遭受意外,仍然不难说明下列问题:①四种不同保护剂中,以 10%蔗糖脱脂奶加还原剂组为最好,无论在冻干后或贮存阶段,其活菌率均较其他三组为优,冻干后达 84.78%。至第六个月的检查结果,其活菌仍然达到 53.85%,相应的,较 10%蔗糖脱脂全奶组高 20%以上。② 10%蔗糖 1%明胶加还原剂组比其对应组不加还原剂者,对于活菌的稳定性,不但没有提高的趋势,甚至于稍差于后者。③ 10%蔗糖脱脂全奶和 10%蔗糖 1%明胶两组比较,无论在冻干后或在贮存阶段,其活菌稳定情况基本不相上下。

表 5 四种不同的保护剂对于布氏杆菌苗冻干后与贮存阶段活菌稳定效果的比较

苗 类	冻干前 活菌 亿/ml	冻干后活菌		贮存阶段活菌					
		亿/ml	%	一个月		三 个 月		六 个 月	
				亿/ml	%	亿/ml	%	亿/ml	%
10%蔗糖脱脂全奶	1394.33	925.00	66.34	880.00	63.11	445.33	31.93	423.33	30.35
10%蔗糖脱脂全奶加 还原剂	1040.50	971.33	84.78	766.66	75.28	533.33	51.25	560.33	53.85
10%蔗糖 1%明胶	946.66	628.00	66.33	579.00	61.16	319.50	30.04	299.76	31.66
10%蔗糖 1%明胶加 还原剂	1137.16	702.00	61.76	773.33	63.29	302.00	26.54	335.66	29.52

五、冻干程序与菌存率的关系

我厂是用国产大型冻干机生产 19 号干苗的。在生产初期,产品常出现干缩或蜂窝状现象。经分析研究,明确此种现象是由于菌苗浓度与冻干曲线不相适应所致。据此我们拟订出了一条比较合理的冻干曲线,即第六线。此线的全部过程是:制品在 -40°C—-45°C 预冻 4—6 小时, -40°C 开始升华,自 -40°C—-32°C 每小时升温 4°C;自 -32°C—-15°C 每小时升温 2°C;自 -15°C—-10°C 每个温度保持 1 小时半;自 -10°C—+5°C 每小时升温 2°C;自 +5°C—+14°C 每小时升温 6°C;自 +14°C—+26°C 每小时升温 8°C;最后 +26°C 及 +28°C 各保温 1 小时,这样自升华开始至制品冻干完成共需 35 小时。在真空度方面,要求 30—60 分钟达到 100 微米,2—3 小时以内稳定地维持在 50 微米以内,直到冻干结束。

曾按此线生产了 20 余批产品,结果证明这一冻干曲线,在良好的真空条件的配合下,可以制出物理性状优良,活菌数较稳定和残水率较低的制品。但是,为着进一步提高制品质量,节约机电损耗,加速机器周转,我们又从缩短冻干时间进行了研究,多次试验证明,应用 24 小时的升华时间(代号为第 13 线)更有利于提高冻干制品的质量,这可以从冻干

后的活存率及残水率方面看出。如表 6 所示 1963 年用第 6 綫生产的 28 批苗,在冻干阶段的活存率平均为 56.59%,残水率平均为 2.43%;1964 年用第 13 綫生产的 34 批苗,活存率平均为 61.05%,残水率平均为 1.64%(表 6)。这两个阶段生产的苗除采用的冻干曲线不同以外,从制苗到分装的整个工艺过程都是相同的。可见冻干程序有很大的影响。

表 6 冻干布氏杆菌苗活菌率及残水率与冻干曲线关系

冻干曲线代号	生产年度	批数	冻干前平均活菌 亿/ml	冻干后平均活菌 亿/ml	活菌率%	残水率%
#6 綫	63 年	28	1401.00	792.82	56.59	2.43
#13 綫	64 年	34	1517.00	926.12	61.05	1.64

注：两个阶段的统计材料，均系从大群生产中抽取有完整的冻干前后活菌记录的部份批组，进行比较的。

为着合理的设计冻干曲线，我们在研究第 13 綫的工作中，曾进行了 10% 蔗糖脱脂奶布氏杆菌菌悬液的共融温度的测定方法是，预先在制品内放置低温温度计及两个电极，然后冻结至 -40°C 左右，随即将电极连接于万能表上，万能表的电阻指示钮，于测定前移至 1,000 Ω 处，然后观察被测物质的温度变化，同时注意万能表上的指针，指针开始移动的瞬間，即表示被测物质已开始导电，这时的温度就是共融温度或称共融点。我们测定的结果，证明其共融点在 -17°C — -18°C 之間。同时反复地测定了箱温和苗温的关系，发现两者有较大差异，当箱温在 -30 — 0°C 之間时，与苗温的最大差距在 15°C 左右，也就是

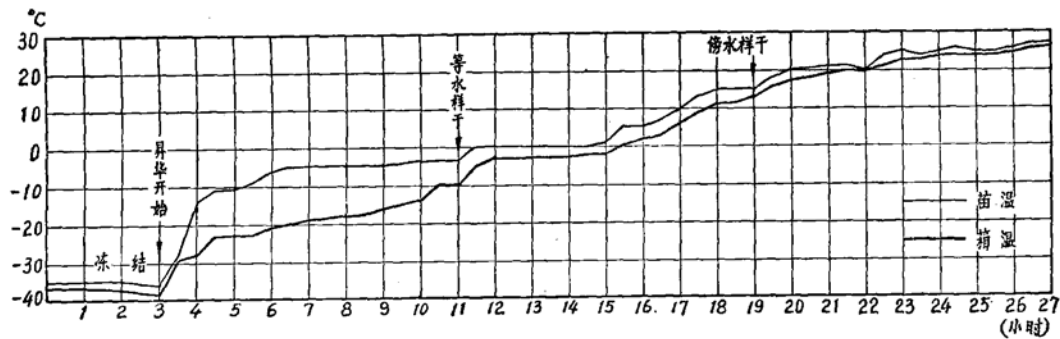


图 1 冻干过程中菌苗温度与冻干箱温度的变化关系

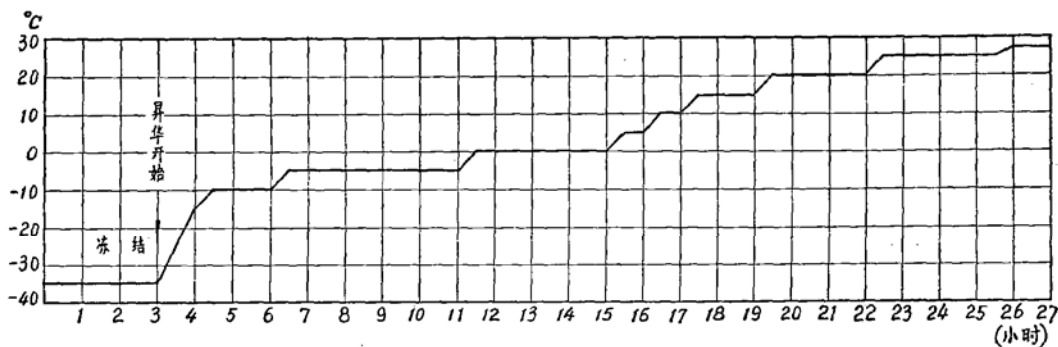


图 2 冻干布氏杆菌第 13 运转曲线(冻干箱温度)

苗温较箱温低 15°C 左右。温差随着温度逐渐增高而减少, 0°C 以上则渐趋接近, 但仍然维持一定的差距(图 1), 此外, 为着尽可能的缩短时间, 我们将低温冻结的时间缩短到 3 小时, 温度控制在 -35° — -40° 之间。连续多批的生产实践证明, 采取这种时间和温度对于冻干过程中活菌的稳定效果并不比 -40°C , 6 小时的冻结条件差。第 13 线的升温过程见图二。

根据这个曲线以及箱温和苗温的关系, 可以推知, 实际共融点在箱温 -5°C 左右, 从等量水样干完的时间看, 也正在这个温度以内。这就说明: 菌苗内的大量水份, 完全可以在共融温度以下排除, -5°C 以后的供热主要是排除少量水份。这一阶段虽供应相当多的热量, 但仅能排除有限的水份, 我们认为这可能是因为细胞内比细胞间脱水较为困难的缘故。我们用第 13 线冻干的 34 批苗平均残水率为 1.64%, 而用第 6 线冻干的 28 批苗平均残水率为 2.43% (表 6), 这说明: 供热速度和温度的适应, 比升华时间的长短具有更重要的意义。毫无疑问, 真空度的配合也是十分重要的, 我们在第 13 线运转的整个阶段, 真空度一直维持在 $25-45\mu$ 之间, 因而保证了良好的冻干效果。这就再一次说明, 冻干曲线与真空度的配合, 是冻干运转中不可忽视的重要问题。

讨 论

1. 提供合理的冻干程序, 对于菌苗的质量起着重要的作用。长期以来人们对于这一问题, 曾进行了一系列理论性的探讨和实验^[4,5,6,9,14]。特别对于冻结的问题研究很多, 大家一致认为冻结过程中晶体的形成, 对微生物有明显的致死作用, 因此冻结的良好与否对于细菌存活有着密切的关系。在沒有超速冻结的条件下, 采用在共融温度以下的速冻措施, 可以在极大的程度上减少细胞在冻结过程中的死亡。在升华脱水阶段, 我们认为最重要的是掌握箱温(或铁板温度)与苗温的关系, 以及制品的共融温度, 才可以合理制定升华曲线, 从而有效的提高制品的质量。从现阶段国内外的冻干技术水平看来, 冻干后细胞的死亡率, 一般在 15—60% 之间, 显然在技术上还存在问题。因此, 进一步的研究冻干技术, 应该是今后一项重要的工作。

2. 北京生物制品研究所的研究结果表明。培养基内的含糖量与布氏杆菌的生长浓度成正比, 而生长浓度又与冻干后活菌数成反比。这个规律在我们的试验中未能完全证实, 对于这个问题, 我们认为在试验方法上, 有提出商榷的必要。该所根据比浊结果, 作为生长浓度的标准, 而我们是以稀释培养法(原苗收获后的 6—8 天计算活菌数)作为细菌繁育的依据, 生长浓度是否能代表活菌数, 是值得商讨的问题。此外, 培养基内的含糖量, 该所指出: 以 0.2—0.3% 为宜, 但是, 我们使用新鲜猪肝培养基的含糖量, 经测定结果: 平均达 6.58 mg/ml, 我们在培养基中加入葡萄糖效果不显著, 是否由于培养基中糖分本来就很高, 加糖显不出效果, 还是因沒有掌握到活菌的高峰期的原故, 也是值得讨论的问题。

3. 长春生物制品研究所介绍布氏杆菌的研究材料时指出^[2]: 浓度小的菌悬液 (500—600 亿/ml) 较浓度大的 (800—1000 亿/ml) 冻干后的活菌率可提高 40%, 在我们的试验则未看到有这样显著的差异, 这可能与我們所用的苗太浓有关, 其中浓度最低的也达到 987.50 亿/ml, 相当于该所浓度大的菌悬液。看来进一步降低原苗浓度或更有利于冻干后的活存率。

結 語

通过上述各项结果,提出以下初步结论:

1. 用不加糖的新鲜猪肝琼脂平面培养基较加入 1% 葡萄糖者有利于布氏杆菌的繁育,在 10% 蔗糖脱脂全奶的悬浮条件下,冻干后可提高活菌数 33.13%。但培养基加糖与否,与冻干后活存率无关。

2. 10% 蔗糖脱脂奶布氏杆菌悬浮液,收获后在 4°—8°C 贮存,以三天内死亡最多,约达 15%,以后速度逐渐降低,至第七天约死亡 20%。

3. 布氏杆菌原苗浓度与冻干后的活菌率有关,冻干前原苗每毫升不足 1,000 亿者,较 1,600 亿,约可提高 4%。

4. 冻干布氏菌苗的保护剂,以 10% 蔗糖脱脂全奶对活菌的稳定效果最好;乳糖代替蔗糖则次之;用葡萄糖代替者最差。三者稳定活菌效果,分别为 59.21%;49.57% 及 42.73%。

5. 在 10% 蔗糖脱脂全奶保护剂内加入还原剂;抗坏血酸,硫脲,氯化铵各 0.5%,可以使冻干后布氏杆菌活存率达到 84.78%,较其对应组提高 18.84%。贮存半年后其活菌率仍然保持在 53.85%,比对应组高 23.50%。(贮存至第二个月后,曾在 28°C 放置一月。)

6. 10% 蔗糖脱脂全奶或 10% 蔗糖 1% 明胶水溶液,作为布氏菌苗保护剂,无论在冻干后或贮存阶段其活菌的稳定情况没有显著差别。冻干后分别为 66.34% 及 66.33%,贮存半年后分别为 30.35% 及 31.66%。(贮存至第三个月后,曾在 28°C 放置一月。)

7. 在 -35°C 左右的冻结条件,以及良好的真空度的配合下,供热速度和温度的适应比升华时间更为重要。生产实践证明,合理的修改冻干曲线,缩短冻干时间,可以使冻干后活菌率由 56.59% (#6 线冻干)提高到 61.05% (#13 线冻干),残水率则分别为 2.43% 及 1.64%。

参 考 文 献

- [1] 黄文萱等: (1963) 冷冻干燥布氏菌苗与培养基含糖量的关系。生物制品集刊 (P40—43)
- [2] 鼠疫与布氏活菌苗的活菌数在不同情况下与冷冻干燥的关系: 1962 长春生物制品研究所 (会议交流资料)
- [3] 冻干布氏杆菌菌苗的研究 (第一报): 1963 江苏省畜牧兽医学学会论文选辑 (P108—115)
- [4] 关声寰译: 猪丹毒冻干菌苗的制造原则 (俄文) 兽医研究参考资料 5—6。
- [5] Соколов, М. И. 1960, 謝斯译: 在冷冻干燥情况下微生物活力的保存 (未发表资料)
- [6] R. J. C. Harris, 1954: Biological Application of Freezing and Drying, Academic Press in N. Y.
- [7] Stamp; Lord, 1947: The Perservation of Bacteria of Drying, J. Gen. Microbiol. 1, 251 ~ 265.
- [8] Fry, R. M. & Greares, R. I. N. 1951: The Survival of Bacteria Drying and after Drying. J. Hug. 47, 220 ~ 246.
- [9] Luyet, B. J. and Gehenio, P. M. 1940: Life and Death at Low Temperature, Monograph Published By Biodynamica, Normandy, Miss.
- [10] Heckly, R. J.; Anderson, A. W. & Rockenmacher, M. 1958: Lyophilization of Pasturella Pests, Applied Microbiol. 6, 255 ~ 261.
- [11] Heckly, R. J.; Faunce, K. & Elliery, S. S. 1960: Lyophilization of Brucella Melitensis, Applied Microbiol. 8, 52 ~ 54.

- [12] Naylar, H. B.; Smith, P. A. 1946: Factors Effecting The Viability of *Serratia Marcescens* During Dehydration and Storage, *J. Bact.* 52, 562 ~ 573.
- [13] Ivanov, M. M. & Koush, E. I. 1961: New Freeze-Drying Media for the Preparation of *Brucella* Vaccine, *Trudy Nauchno-control, Inst. Vet. Prep.* 9, 88 ~ 92.
- [14] Freezing and Drying, Report of a Symposium Held in June, 1951. The Institute of Biology.

SOME FACTORS INFLUENCING THE SURVIVAL COUNT IN THE FREEZE-DRIED *BRUCELLA ABORTUS* VACCINE

(*Nanking Veterinary Biological Laboratories, Ministry of Agriculture*)

Y. Y. Liu, T. J. Chang

Summary

1. Under the same conditions of production, the vaccine prepared with the swine liver agar with an additional of 1% dextrose, gave a survival count of 94,100 million per ml. before freeze-drying and a count of 54,180 million per ml. after the survival rate being 57.58%. While the vaccine prepared with the swine liver agar with no additional agent, gave a survival count of 140,112 million per ml. before freeze-drying and a count of 79,282 million per ml. after the survival rate being 56.59%.

2. The results of seven trials showed that in the *Brucella abortus* vaccine suspended in skin milk plus 10% sucrose and preserved at 4° ~ 8°C, the organisms died off quickly in the beginning, with a mortality of 15% in 58 ~ 62 hours, and then slowly with a total mortality of 20% in 150 ~ 154 hours after harvesting.

3. The vaccine was suspended in and diluted with skin milk plus 10% sucrose in three different concentrations: 98,000 m/ml., 125,000 m/ml. and 167,000 m/ml. in average, and then freeze-dried. The results of three trials showed that after freeze-drying, the percentage survival in the vaccine of the three concentrations was 64.26%, 64.42% and 68.66% respectively. When the diluted vaccines were preserved at 4° ~ 8°C for two months and then freeze-dried, the percentage survival was 53.45%, 48.21% and 62.37% respectively. The third concentration or the more diluted vaccine always gave the better result.

4. When 10% of sucrose, lactose or dextrose was added to the skin milk as protective agent to suspend the vaccine, the survival rate of them after freeze-drying was 59.21%, 49.57% and 42.73% respectively. Sucrose is considered to be the best sugar to be used as protective agent.

5. Four kinds of suspending medium were used in the preparation of *Brucella abortus* vaccine for comparison: (1) skin milk plus 10% sucrose, (2) 1% gelatin plus 10% sucrose, (1a) and (2a) same as (1) and (2) but with additional 0.5% each of ascorbic acid, thiourea and ammonium chloride. The results of three trials showed that the (1a) medium, that is the medium with the components of skin milk plus 10% sucrose and 0.5% each of ascorbic acid, thiourea and ammonium chloride gave the best result the survival rate was 84.78%, about 20% higher than that of the three other media. In case the vaccines were preserved at 4° ~ 8°C for one month then freeze-dried, it gave a survival rate of 75.28% in the vaccine prepared with (1a) medium, while in the other three, the survival rate was between 61% to 63%.

6. The results of large scale production showed that under good conditions of vacuum, a survival rate of 61.05% with 1.64% residual moisture was obtained in one sublimation curve, designated Curve No. 13, completed in 24 hours; while a survival rate of 56.59% with 2.43% residual moisture in another curve of sublimation, designated Curve No. 6, completed in 35 hours.