

簡單凍凝真空乾燥裝置 保存菌種的效能觀察

馮家興

(貴陽醫學院微生物學教研組)

自Florsdorf和Mudd二氏發展了凍凝乾燥技術以來,其用途日趨廣泛。在教學及研究工作中,保存菌種是一個重要的條件。解放以來,爲了適應此種需要,市場上已出現了有關此種技術的裝置。但作者認爲此種商品在某些方面不太合乎要求,因此着手試行配置了一種較簡單的凍凝真空乾燥裝置。經兩年多來的應用與實驗,感覺其效能尚好。現就觀察所及,提供商討。

材料與方法

凍凝乾燥裝置(圖1)

這一裝置是在厚壁橡皮管的供應有困難和手工生產的可能下設計的。可分爲三部分:

1. 插管頭: 由一圓形洋鐵盒及10枝小銅管所合成。盒的直徑爲3.5厘米,高2.0厘米,其底部中央接有長12厘米,內徑1.5厘米的銅管一隻,其游離端略彎,且稍尖削。盒的四周分別焊接10隻小銅管,與盒體成 45° 角。小管長2.5厘米,內徑0.6

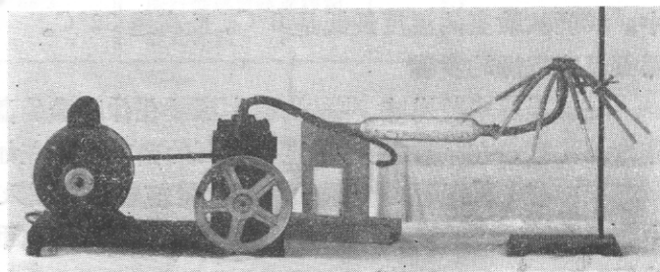


圖1 簡單凍凝真空乾燥裝置

厘米。又在每隻小管上接硬橡皮管一段,長11厘米,內徑0.6厘米。因此這一插管頭每次可以同時乾燥10管菌種。

2. 吸水管: 在一 25×2.5 厘米的玻璃管中,裝入35—40克無水氯化鈣,並在管的兩端各墊兩層紗布,用厚壁橡皮管連於插管頭的游離端與抽氣機之間。

在考慮吸收蒸發的水分時,曾嘗試了幾種簡單的辦法,但均不滿意。因須同時兼顧空間最小、綫路最短和管徑最大,以及吸水能力最好。如上述裝置由標本至抽氣機,其通路總長約65厘米,爲現時條件下可能完成的較恰當的安排。

3. 抽氣機: 爲 $1/4$ 匹馬力電動機帶動的真空抽氣機,其真空度可達0.01毫米水銀壓以下。平時工作中並配裝簡單水銀真空計,以檢查裝置有無漏氣情形。

在停止使用期間，上述裝置的一些開放管口，均用盲玻璃管塞緊，以防吸水劑潮解。無水氯化鈣經使用 6 次後，即另行換置，因在更多次的使用時，可見標本在第一階段乾燥的時間，由 60 分鐘逐漸延長。

菌種

選取 20 餘種常見的和有代表性的菌種進行觀察，其中也用了一株大腸桿菌噬菌體及流感病毒 PR₈ 株。

1. 乾燥前後對各菌種均進行了必要的生化學的檢查。一些菌種如第 II 型肺炎雙球菌和白喉桿菌並作毒力試驗，腸道病原菌則作凝集試驗。

2. 各菌種均接種於羊血肝化湯瓊脂培養基上，經 37°C 孵育 24 小時，魏氏桿菌經 40 小時，再括取菌落與生理鹽水作成均液，每毫升菌數與 McFaland 氏比濁管 6 億相當，然後以等量溶積的脫脂牛乳混合。分裝 0.1 毫升於菌種安瓿的膨大部（安瓿長 14 厘米，內徑 0.6 厘米，膨大部的溶積 1.5 毫升）作為保菌材料。同時以消毒棉花少許不鬆不緊地塞入安瓿頸部上 1/3 處。

3. 在進行活菌計數時，是在如下規定的凍凝真空乾燥後，即時以 1 毫升生理鹽水將乾粉作成乳劑，經放置 5 分鐘後，取 0.1 毫升與肝化湯作成 10 倍的等倍稀釋液。取各種稀釋液 0.1 毫升塗佈於羊血肝化湯瓊脂上。計取菌落時取含 300—10 個菌落的兩個相隣稀釋度標本的平均值。對照組的活菌數是用經脫脂牛乳稀釋後的菌液作標本如法檢出。

流行性感嗜血桿菌的計數是用 0.1 毫升的稀釋液在羊血肝化湯瓊脂平皿上塗成若干個直徑約 1 厘米範圍的接種面，再在周圍種葡萄球菌，生長後計取結果。

4. 用為觀察的菌種，在乾燥並熔封後即保存於 4—8°C 冰箱中或室內的木質標本瓶中。我們試驗室的溫度最低是 0°C，最高達 32°C。

凍凝真空乾燥的步驟

在凍凝真空乾燥時，凍結的標本應放在什麼樣的溫度下乾燥為最適當的問題，引起了作者的注意。在試驗之後，確定了所有的菌種都是在如後的條件下進行乾燥。

1. 凍凝乾燥過程：將裝有菌液的安瓿膨大部插入 -21.5°C 的碎冰食鹽混合劑的杯中凍 5 分鐘，將杯移至插管頭下方，把橡皮管彎向內下方接上安瓿，接完後即開動抽氣機抽氣。

2. 曾發現將乾燥過程分為兩個階段來進行是比較恰當的，故採取了這種操作方式。即先將凍凝的標本保持在 -21.5°C 的碎冰食鹽混合劑中抽氣經 60 分鐘，此時標本的冰層即完全消失，而碎冰食鹽混合劑的溫度上升至 -7°C 為第一階段。第二階段是將標本再在室溫中繼續抽氣 60 分鐘。

3. 經過如上步驟乾燥的標本，以 Karl Fisher 氏法測定其殘餘水分為 2.18—2.80%。熔封時的真空度經 Mcleod 氏真空計測定為 28 微米。

結 果

保持凍凝標本在何種溫度下乾燥較為適宜的觀察

已在 -21.5°C 凍凝的標本，可以保持在室溫中或零下溫度（加入碎冰中的鹽量不等時可得不同的低溫）經第一階段的乾燥過程。為求得一個乾燥凍凝標本的適宜溫度，曾選

用傷寒桿菌及腦膜炎雙球菌作了比較。其結果如表 1。

表 1 抽乾過程第一階段中保持標本在不同溫度下所得活菌百分率的比較

菌 種	活 存 % [*]		
	-21.5 至 -7°C	-9 至 -5°C	室 溫 [*]
腦膜炎雙球菌	1.75	0.16	0.29
傷寒桿菌	87.1	66.7	82.1

^{*} 未乾燥前的活菌數為 100%；

^{*} 14°C，在開始抽氣時，標本的溫度很快地升至 -7°C 以後緩緩上升至 -1°C。

在乾燥過程的第一階段中，所用的碎冰食鹽冷凍劑不能將凍凝的標本保持在恆定的溫度下，如使用的是 -21.5°C，則在 60 分鐘的抽乾過程中，標本的溫度將升至 -7°C。至於將標本放於 -9°C 或室溫中抽氣，則在 30 分鐘內可完成第一階段的乾燥。經在 -21.5°C 凍凝乾燥後立即測定的菌種活存百分率見表 2。

表 2 凍凝乾燥後立即測定的菌種活存百分率

菌 種	活 存 %	菌 種	活 存 %
傷寒桿菌	87.1	白喉桿菌	84.2
乙型副傷寒桿菌	80.7	肺炎雙球菌 (II 型)	13.3
弗氏痢疾桿菌	51.0	腦膜炎雙球菌	1.75
鼠疫桿菌 (Otten 株)	66.3	流行性感胃嗜血桿菌	4.7
		魏氏桿菌	44.7

所用的魏氏桿菌是經 40 小時的羊血肝化湯瓊脂培養，在塗片中未見有芽孢存在。乾燥後約只有半數活存。

曾用一株大腸桿菌噬菌體作乾燥前後裂菌效價的比較(用原濾液進行乾燥)。在乾燥前其效價為 10^{-7} ，在乾燥後再試時已降至 10^{-4} 。

抽乾過程中細菌飛揚情況的觀察

對於乾燥過程中所發生的細菌飛揚情況，也進行了觀察。以綠膿桿菌作成生理鹽水懸液，再與等量脫脂牛乳混合，最後製成 3 億、7.5 億和 15 億的生理鹽水脫脂牛乳懸液。按 0.1 毫升量分裝於安瓿管中，用火灼將安瓿管頸部充分滅菌，在上 1/3 處塞上一鬆緊適宜的無菌棉塞。按上述規定操作過程乾燥後，取棉塞於 5 毫升肝化湯管中培養 48 小時，生長後進行鑑定。所得細菌飛揚情形如表 3。

在規定的 2 小時乾燥過程中，綠膿桿菌在 1:1 的脫脂牛乳生理鹽水中，濃度高至 7.5 億/毫升時，未見有隨水蒸氣飛出的情形，但濃度增加到 15 億時，則有少數棉塞上有細菌污染。

表 3 細菌飛揚情形觀察

乾 燥 時 間		2 小時	4.5 小時
懸液最後濃度 (毫升)	3 億	0/20	0/20
	7.5 億	0/20	0/10
	15 億	2/10	1/10

分母：乾燥的管數；

分子：棉塞培養出該種細菌的管數。

一些菌種的活存期限的觀察

曾將乾燥了的 20 餘種細菌放置於 4—8°C 冰箱及室溫中 (其中少數只放在一種溫度下), 在不同時間內啓封一只作活存、必要的生化學反應、血清學及毒力檢查。現已二年有餘, 尚在繼續觀察中, 其部分結果見表 4。

表 4 封 存 各 菌 種 的 活 存 期 限

菌 種	已 保 存 時 間 (月)	
	4—8°C 冰 箱	6—32°C 室 溫
葡萄球菌	25	13
鏈球菌	25—26	13—25
變形桿菌 OX ₁₉	25	12
沙門氏菌 ⁺	25—26	12—26
痢疾桿菌*	25	12—14
產鹹弧菌	24	13
白喉桿菌	27	27
類白喉桿菌	25	14
鼠疫桿菌 (Ottens 株)	24	14
肺炎雙球菌 (II 型)	21	
腦膜炎雙球菌	24	
卡他球菌	25	
流行性感胃嗜血桿菌	26	
肺炎桿菌	21	
綠膿桿菌	24	
枯草桿菌	25	
脆弱桿菌	25	
魏氏桿菌		27

⁺ 包括傷寒桿菌, 甲型和乙型副傷寒桿菌, 豬霍亂桿菌和鼠傷寒桿菌;

* 包括志賀氏、許密次氏、弗氏及宋內氏痢疾桿菌共 4 株。

另將流感病毒 PR₈ 株乾燥後放於 4—8°C 冰箱中, 在乾燥前其血凝效價為 1/256, 經 21 個月後, 啓封並用胰消化液稀釋至 1/500, 經接種雞胚的絨毛尿囊腔後, 其第一代的血凝效價為 1/128。

討 論

在應用所配裝的凍凝真空乾燥設備進行保存菌種時, 如流行性感胃嗜血桿菌這樣的菌種, 經放置於 4—8°C 冰箱中二年餘尚活存; 安甌中的真空度和標本裏的殘餘水分也合乎一般的要求; 而且乾燥時間只需 2 小時等, 似乎很能滿足一般教學和研究工作上的要求。

某些菌種如腦膜炎雙球菌、流行性感胃嗜血桿菌等乾燥後立即檢查到的活菌數都很低。在用凍凝真空乾燥保菌時, 影響細菌活存的條件很多^[1]。如果這些細菌在更低的溫度下凍凝, 並經第一階段的乾燥時, 是否可以提高其活存率。因如腦膜炎雙球菌對於脫水的忍受力是相當強的^[2], 而真正有英膜的細菌又含有較多的水分^[3], 可能由於形成冰花^[4],

以致細胞破裂。從試驗的結果看來，肺炎雙球菌、腦膜炎雙球菌及流行性感胃嗜血桿菌的活存率均低，似乎與這一情況不無關係。

試驗中所用的保護液為 1:1 的生理鹽水脫脂牛乳，這也是影響各種細菌出現甚為懸殊的活存率的原因之一。關於保護液目前一般均認為血清、牛乳、其他蛋白性的膠體物質及在緩衝液中配加一些糖類或明膠為最好，但又要求更低的凍凝溫度。就所有結果來看，用生理鹽水脫脂牛乳已可能保存許多有代表性的菌種至相當長的時間，可以初步滿足一些設備上尚有不足的實驗室的需求。至於在改變了保護液後某些菌種的活存率可以大大提高的工作，在必要時是可以單獨提出來研究的。

關於在乾燥過程中防止細菌從裝置中飛出而引起傳染的辦法，Reitman 氏等^[5]曾在裝置中設置一雙重棉花過濾管，而高守一氏^[6]又在安瓿管頸部放兩個棉塞均證明有阻止細菌飛出的效用。就本試驗的結果來看，如用 1:1 生理鹽水脫脂牛乳，控制細菌數在 7.5 億/毫升以下，標本量為 0.1 毫升和乾燥時間為 2 小時，已未見到有細菌飛出情形。如在安瓿頸部再加一鬆緊適宜的棉塞更足以保證阻住可能飛出的細菌。

總 結

介紹了一種簡單的凍凝真空乾燥裝置，並在觀察過程中證明其合乎教學與研究工作的需要。

1. 所能達到的真空度與乾燥菌種所含的殘餘水分合乎一般要求。
2. 所保存的菌種經放置室溫與冰箱中二年有餘尚活存，且在生化反應、抗原性和毒力等重要生物性質上均無顯著的改變。
3. 應用 1:1 生理鹽水脫脂牛乳作保護液，控制細菌數不超過 7.5 億/毫升，裝量 0.1 毫升，在 2 小時的乾燥過程中可確保乾燥菌未飛揚的危險。

本文承于本崇教授指導，謹此致謝。

參 考 文 獻

- [1] Heller, G.: *J. Bact.*, **41**: 109, 1941.
- [2] Miller, C. P. and Schad, D.: *J. Bact.*, **47**: 71—77, 1944.
- [3] Porter, J. R.: *Bact. Chem. and Physiol.* 2nd printing, Chapman and Hall, London, p. 335, 1947.
- [4] Rahn, O.: *Bact. Rev.*, **9**: 23, 1945.
- [5] Reitman, M.: *J. Bact.*, **68**: 541—544, 1954.
- [6] 高守一：微生物學報，**4**: 394, 1956.

A REPORT ON THE USE OF A SIMPLE DEVICE FOR LYOPHILIZATION

FUNG GIA-SING

(Kwei-Yung Medical College, Kwei-Yung)

In the report, a simple device for lyophilization was described. On the basis of observations within a period of a little more than two years, the author considered that this simple equipment was useful for the purpose of preserving organisms for teaching and research work. It was found that:

1. The component parts of the device were easy to assemble in any small laboratory.

2. Both the attainable vacuacy in the sealed ampule, 28μ Hg., and the residual moisture of the dried material, 2.18—2.80% were within the range of ordinary demands.

3. The process that 0.1 ml. of a saline-milk suspension of the organisms, would be frozen in a salt ice mixture at -21.5°C , and dried within 2 hours, was a time saving advantage.

4. If the number of the organisms was kept at or below 750 mil./ml., there was no detectable microorganisms in aerosols during the required time for suction.

5. More than 20 kinds of organisms thus far lyophilized and preserved in the ice chest and/or at room temperature within a period of a little more than 2 years were still alive with no obvious changes of biological activities, virulence or antigenicity.

In the viability test immediately after the process of drying, the author found that the percentage of the viable cells of the organisms such as *D. pneumococcus* type II, *N. meningococcus* and *H. influenzae* was rather low. It was only 2—13%. The author ascribed it to the following reasons organisms with large capsules contained more moisture, and the frozen temperature of -21.5°C , was not enough to prevent the formation of the sharp pointed microscopic ice crystals, which injured the cell wall. In view of such reasoning, it would perhaps be advisable to find out other media instead of the saline-milk mixture and a lower temperature for the preservation of these capsulated organisms.