

# 嗜菌體在不同溫度下保存時效價的改變\*

唐冀雪

(中國協和醫學院細菌免疫學系)

一般為研究、預防及治療用的嗜菌體在製成一定(約一年)時期後即棄去不用,恐其效價減低,達不到使用的目的。一般認為<sup>[1]</sup>嗜菌體耐熱程度因種類而有不同,但對低温抵抗力極強。Campbell-Renton 氏<sup>[2]</sup>的實驗說明 32 種痢疾、副傷寒、傷寒、葡萄球菌嗜菌體雖凍在  $-68^{\circ}\text{C}$  及  $-180^{\circ}\text{C}$  的低温下 5 分鐘效價也不減低,只有一株乙類副傷寒嗜菌體對低温敏感,但在  $-12^{\circ}\text{C}$ , 5 個月效價無改變。為了要瞭解在什麼溫度下保存嗜菌體最適宜,低温冷凍是否能延長保存的時間,於是我們進行了以下的實驗。

## 實驗方法

將新製成未過濾的金黃色葡萄球菌嗜菌體、福氏痢疾嗜菌體及鼠疫嗜菌體各加入 Roccal 防腐劑使最後濃度為 1:50,000。在冰箱中保存 24 小時後作無菌實驗,然後滴定嗜菌體效價作為實驗起始時的對照。此後,將每種嗜菌體分裝在 3 個小瓶中,每瓶約 20 毫升,以皮塞封口後分別放在室温背光處、冰箱中及暖箱中,此外再將各種嗜菌體分裝 20 支 1 毫升之安瓶,置低温冰箱中快速冷凍保存。同樣方法處理傷寒嗜菌體,但未加防腐劑,僅以貝克斐 N 燭濾過。

實驗起初,每週以 Gratia 氏<sup>[3]</sup>雙層瓊膠空斑法滴定保存在不同溫度下之嗜菌體。方法如下:以無菌手續用注射器由小瓶中吸取 0.5 毫升被測嗜菌體,並於低温冰箱中取出 1 個安瓶在室温中溶化後以注射器取出 0.5 毫升。將被測定的嗜菌體在試管(直徑  $17\frac{1}{2}$  毫米)中作 10 倍稀釋(4.5 毫升培养基加 0.5 毫升嗜菌體),預先估計樣品效價,例如,若效價可能為  $10^9$ ,則取稀釋  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  之嗜菌體各 0.5 毫升分置試管中,每試管中加入 18 小時斜面生長的相應細菌懸液 3.5 毫升,懸液濃度每毫升約含  $1.2 \times 10^8$  細菌。混合後立即加入 1 毫升在沸水中溶化的瓊膠培养基,以手指敲打試管使內容物混合,

\* 1956 年 11 月 7 日收到。

以另一吸管取出 1 毫升混合液於新製瓊脂平碟表面鋪勻(用旋轉盤或用手搖盪皆可), 操作必須敏捷, 避免凝固。待所鋪之瓊脂層冷固後, 反轉平碟, 置 37°C 暖箱中孵育。18—24 小時後由所作的 3 個平碟中選擇 1 個, 其空斑在 30—300 之間者, 或空斑清楚可數者, 計算未稀釋的嗜菌體每毫升含空斑數目, 作為菌體效價(單位/毫升)。傷寒及痢疾嗜菌體所成之空斑有繼續擴大的作用, 故於孵育 5—6 小時後計算空斑。

如一週後效價改變不多, 則酌情於 1—3 個月再作滴定。

存放嗜菌體的暖箱溫度為 35—38°C; 冰箱溫度為 4—6°C; 低温冰箱溫度為 -21—-38°C; 每日記錄室溫, 於 1955 年 2—6 月溫度多在 21—26°C 之間, 偶然也有 18°C 者。7—9 月未記錄室溫, 也未作嗜菌體滴定, 但瞭解到約有一週最高室溫達 34°C, 此後, 1955 年 10 月—1956 年 6 月室溫也界於 21—26°C 之間, 與前一年者無大區別。

實驗所用的培养基為肉膏湯(3 克肉膏、10 克蛋白胨、5 克食鹽、1,000 毫升蒸餾水)及肉膏瓊脂(肉膏湯加 1.8% 瓊脂), pH 值為 7.4。

## 實驗結果及討論

將嗜菌體效價滴定結果製成圖 1、2、3、4, 並總結於下表:

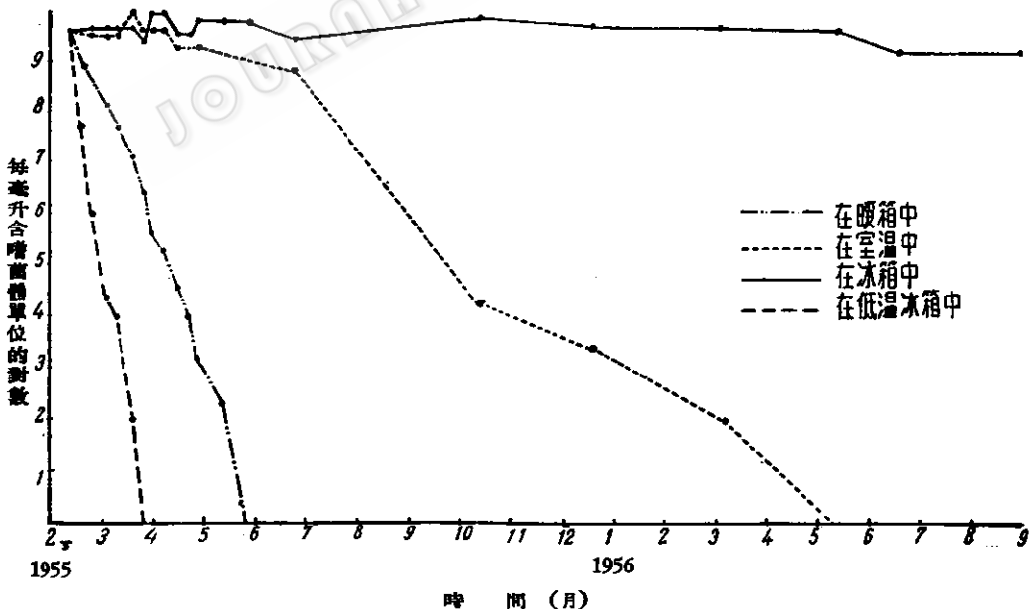


圖 1 金黃色葡萄球菌嗜菌體在不同溫度下保存時效價的改變

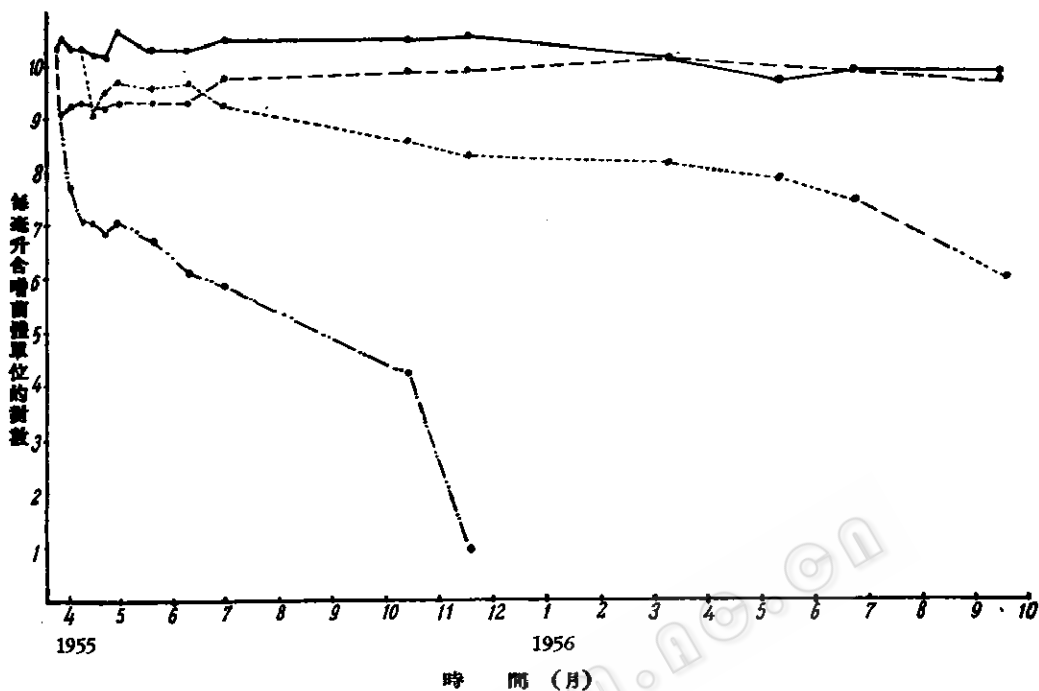


圖 2 瀉氏痢疾嗜菌體在不同溫度下保存時效價的改變

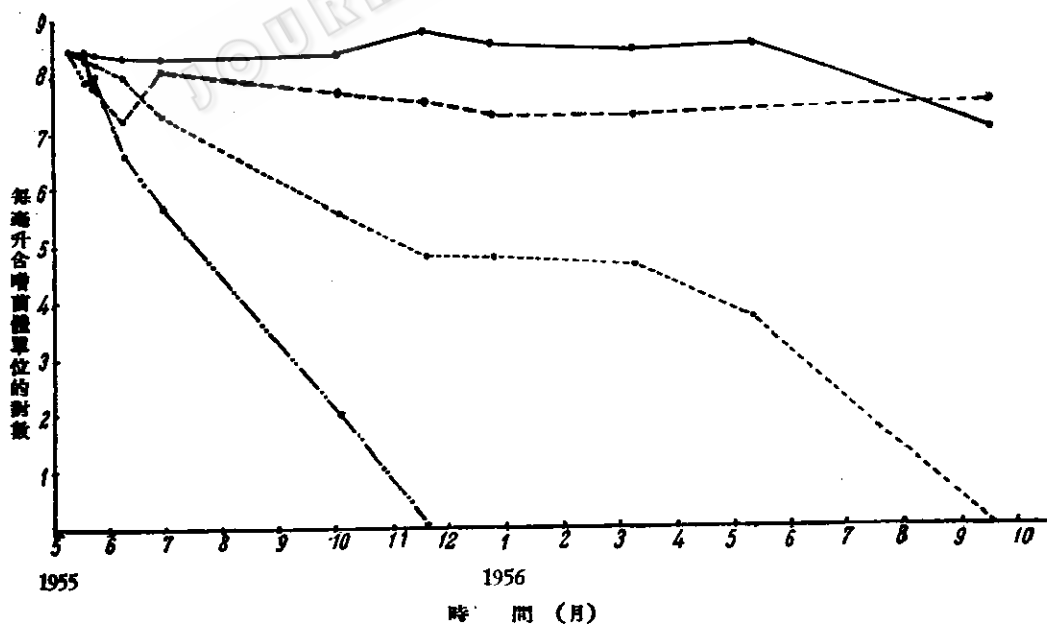


圖 3 鼠疫嗜菌體在不同溫度下保存時效價的改變

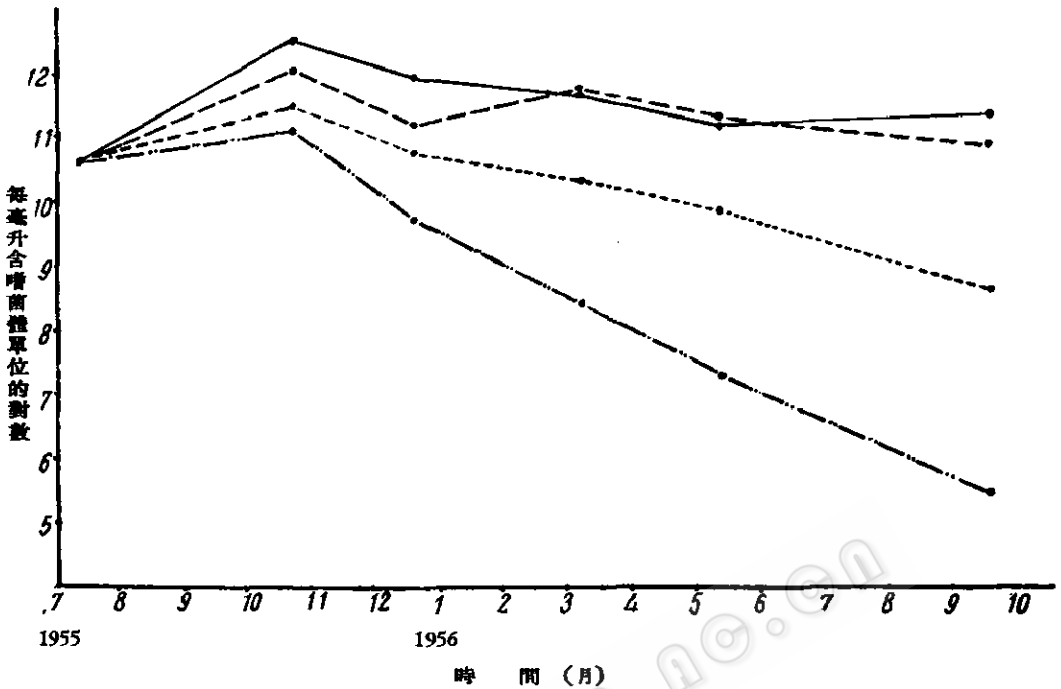


圖 4 傷寒嗜菌體在不同溫度下保存時效價的改變

表 1 嗜菌體在不同溫度下保存時效價的改變

	實驗起始時		效價(單位/毫升)的改變			
	時間	效價	暖箱	室溫	冰箱	低溫冰箱
金黃色葡萄球菌嗜菌體	II/11	$3.8 \times 10^9$	3個月失效	13個月失效	19個月後 無顯著改變	1個月失效
福氏痢疾嗜菌體	III/22	$2.4 \times 10^{10}$	7½月失效	18個月後 $9.3 \times 10^8$	18個月後 無顯著改變	18個月後 無顯著改變
鼠疫嗜菌體	V/8	$2.8 \times 10^8$	5個月失效	15個月失效	16個月後 無顯著改變	16個月後 無顯著改變
傷寒嗜菌體	VII/12	$4.0 \times 10^{10}$	14個月後 $3.0 \times 10^8$	14個月後 $4.6 \times 10^8$	14個月後 無顯著改變	14個月後 無顯著改變

註：“失效”即每毫升含 100 個空斑以下。

由結果看出,不同的嗜菌體對溫度的敏感度也不同,金黃色葡萄球菌嗜菌體較其他三種敏感,在低溫冰箱中 1 個月即失效,而其他三種在一年多的過程中則無顯著改變。作者曾重覆於  $-18^{\circ}\text{C}$  保存金黃色葡萄球菌嗜菌體實驗,所得結果無論加與不加防腐劑,都是自凍入冰箱之日起,效價逐日下降,至 1 個月則完全失效。此嗜菌體在暖箱中也較其他者敏感,其次為鼠疫嗜菌體;傷寒嗜菌體保存 14 個月後仍有較低的效價。金

黃色葡萄球菌嗜菌體不耐熱及不耐寒的原因是什麼？與其他嗜菌體在性質上有那些不同以致使它們對溫度具有不同的敏感度，應作進一步研究。

在冰箱中保存嗜菌體最適宜，四種嗜菌體在一年多的時間，效價都沒有顯著改變。我們封在安瓿中在冰箱保存了 3—4 年的各種嗜菌體效價也沒有很大的改變。

嗜菌體效價滴定的實驗不是同時開始的，因此不能比較在室溫保存的各種嗜菌體效價改變的情況。一般可以看出（圖 1、2、3、4），當室溫不超過  $26^{\circ}\text{C}$  時，各種嗜菌體在室溫放置 3—4 個月效價無甚改變，但在 6 月底，室溫超過  $30^{\circ}\text{C}$  時，則效價很快下降，金黃色葡萄球菌嗜菌體雖在冬季效價繼續下降，於 13 個月完全失效（圖 1）；痢疾、鼠疫嗜菌體在冬季則效價改變不多，第二年 6 月效價又下降。痢疾及傷寒嗜菌體雖經過了兩個夏天，效價仍有  $9.3 \times 10^5$ /毫升及  $4.6 \times 10^4$ /毫升。

實驗中的嗜菌體都是以一株敏感菌繁殖的，如痢疾嗜菌體是以一株福氏菌繁殖的，其裂解液雖然可以作用於絕大多數福氏及志賀氏痢疾桿菌，但和以另一株繁殖的痢疾嗜菌體是有質量的不同。Campbell-Renton 氏<sup>[2]</sup>的實驗中，只有一株乙類副傷寒嗜菌體對  $-68^{\circ}\text{C}$  及  $-180^{\circ}\text{C}$  敏感，其他則否，因此，本實驗結果只能作一般的參考。究竟實驗中各種尚未失效的嗜菌體效價能維持多久，尚待繼續測定。

嗜菌體裂解液的成分和嗜菌體的濃度都影響保存時效價的改變，保存嗜菌體的環境不能恆定，特別是室溫和低溫冰箱的溫度改變很大，對結果一定有影響，本實驗都沒作這些瞭解。Roccal 防腐劑在 1:50,000 濃度時，在加入嗜菌體的當時和繼續接觸下都不影響嗜菌體的作用，對效價沒有影響。在各種嗜菌體保存的過程中，裂解液都無菌生長。

測定效價所用的雙層瓊膠空斑法在一定的時間讀結果後稀釋法細緻準確，滴定結果雖有 1—2 倍差誤但不影響效價改變的趨勢。7 月 12 日傷寒嗜菌體實驗起始時，效價為  $4.0 \times 10^{10}$ /毫升，然後分置各處保存，因故未作滴定，於 10 月 20 日再滴定時，效價都較前增高了（圖 4），甚至在冰箱中保存的增高了 80 倍，這種情況以技術差誤不易解釋。根據 B. P. Sagik 氏<sup>[4]</sup>，新製的 T<sub>2</sub> 嗜菌體在冰箱中保存時效價有增高現象，第 19 日達高峯，氏等認為因在所製成的嗜菌體裂解液中有抑制空斑產生的物質存在的原故，此次傷寒嗜菌體未加防腐劑，在保存過程中效價增高，其性質如何，應待重覆並進行探討。

瞭解到上述嗜菌體在冰箱中保存一年多的時間及短暫地在室溫存放效價無甚改變，在研究工作上很有幫助，因為在研究中常需要在較長的時期用一批效價沒有改變的嗜菌體，這樣才不致影響研究結果。此外，為預防及治療用的嗜菌體在適宜的條件下保

存應該考慮延長其使用期限。

本實驗的技術工作由閻桂華同志協助，特此誌謝。

### 參 考 文 獻

- [1] 易木：噬菌體。防治醫學 1 (1): 63, 1951。
- [2] Campbell-Renton, M. L. Experiments on drying and on freezing bacteriophage. *J. Path. Bact.*, 53, 371—384, 1941.
- [3] Gratia, A. Des relations numériques entre bactéries lysogènes et particules de bactériophage. *Ann. Inst. Pasteur*, 57, 652—676, 1936.
- [4] Sagik, B. P. A specific reversible inhibition of bacteriophage T<sub>2</sub>. *J. Bact.*, 68, 430, 1954.

## CHANGE IN ACTIVITY OF BACTERIOPHAGE STANDING AT DIFFERENT TEMPERATURES

T'ANG CHI-HSUEH

*Department of Bacteriology & Immunology Chinese Union Medical College, Peking*

(ABSTRACT)

Phages of *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Pasteurella pestis* and *Salmonella typhi* were kept in incubator (35—38°C), at room temperature (mostly 21—26°C), in refrigerator (4—6°C) and deep freezer (—21——38°C) for a period of over 14—19 months. Samples were taken from time to time and titrated by Gratia's double-layered plating method, and the number of plaques were counted for one milliliter of each sample. The results showed no apparent change in the titer of all phage samples kept in the refrigerator. Staphylococcal phage lost its activity entirely after being kept for one month in the deep freezer. All phages lost their activity gradually at incubator or room temperature, among which staphylococcal phage was found to be more fragile, losing its activity entirely after standing 3 months in the incubator, and 13 months at room temperature.