

明膠薄片法對 *Sarcina lutea* ATCC 9341 保存之 探討及應用

林士鈺¹、邱資峰¹、鄭幸祥²、林金梅¹、李淑慧¹
邱翠玟¹、陳忠松¹

抗生素檢驗或畜產品中抗生素殘留測定常以生物檢定法檢驗之，而該法必須使用供試菌種。對於非芽胞菌種必須新鮮配置，且需計算菌液濃度，相當麻煩。以明膠薄片法保存 *Sarcina lutea* ATCC9341 菌種，（保存前為 1.92×10^8 cells/disc），14個月後細菌數目並不降低（ 1.35×10^8 cells/disc），保存效果相當良好；並且作 penicillin 力價試驗時符合日本法之規定，而 Tylosin 之低倍稀釋液之抑制圈稍窄些，增加培養基量即可達其規定。作力價試驗時，只須取1片菌種片放入 100ml 培養基內溶解混合均勻即可，非常方便。故其他非芽胞菌種可嘗試以本法保存之。

緒 言

抗生素藥品之檢驗，一般均以微生物學方法測定之^(1,4,5,6,9)。而畜產品中抗生素殘留之測定亦為微生物學方法^(2,3)。這些方法必須使用供試菌種，對於非芽胞性菌種或生長性菌種必須新鮮配置，且需計算菌液濃度，相當麻煩。且菌種之保存一般常以繼代方法保存之，然因每週或隔週均應繼代一次，耗費時間、材料及人力，且易產生錯誤、污染和菌種之變異⁽⁷⁾，不甚理想。雖然凍結乾燥法是一種有效的方法，但對大批不同菌株或菌種而言，較複雜，且一般小實驗室較難擁有⁽¹⁰⁾。所以筆者等嘗試以一種較簡單方便又節省材料之方法——明膠薄片法來探討它對菌種保存之價值^(7,8,10)。

試驗材料與方法

(一) 試驗材料：

- (1) 菌種：*Sarcina lutea* ATCC 9341
- (2) 培養基：Difco Medium No. 1 及 No. 11
- (3) 抗生素標準品：Penicillin G Potassium, Tylosin
- (4) 菌種稀釋液： KH_2PO_4 34 克加水至 1l，以 1N NaOH 調整 pH 為 7.2，高壓滅菌後，取 1.25ml 加水至 1,000ml 即得。
- (5) 抗生素稀釋液及生物檢定：參閱參考文獻 3 之日本法。
- (6) 明膠薄片法成份：

① Solution A

1. 臺灣省畜衛試所。
2. 臺灣區肉品發展基金會。

{	Bacto, dextrose	5%
	Bacto, skim milk	3%
	Active carbon	0.6%

110°C 滅菌10分鐘後交於 4°C 保存。

②Solution B—5% Sodium ascorbate 以 millipore 過濾滅菌之，-20°C 保存。

③Solution C—20% gelatin 以 121°C 滅菌15分鐘，於 4°C 保存。

(二) 試驗方法：

1. 供試菌種明膠薄片法之製作：

- (1) *Sarcina lutea* ATCC 9341 於 Roux bottle 內大量培養 (Difco Medium No. 1) 35~37°C. 16~18 小時後洗下加 Solution A 作成細菌混懸液，整其調菌液濃度約為 1.95×10^{10} cells/ml，加 Solution A 時須將其加溫至 35°C，加入後攪拌30秒。
- (2) 將 (1) 之菌液，每 ml 加 0.2ml Solution B 及 1ml solution C. 攪拌30秒，加 Solution B 及 C 時均須加溫至 35°C。
- (3) 以 micropipette 取 25 μ l 菌液滴入 disposable petri dish 內。
- (4) 將 Petri dish 放入已放有 Silica gel 及 P₂O₅ (sicapet®) 之 desiccator 內，Petri dish 可稍微打開。
- (5) 用真空幫浦抽氣，直至菌滴成薄扁平狀，約需 4 小時。
- (6) 以鑷子取出放入置有 silica gel 及棉花塞之小瓶內，密封放入 -20°C 保存。

2. 活菌數及抗生素力價試驗：

本所及肉品發展基金會隔一段時間測定之，每次作活菌數測定時取 3 片分別測定之。抗生素力價測驗則取 2 片，分別放入 100ml 培養基內，溶解混合均勻即可作為種層用。底層 10ml，種層 4ml。

結果與討論

供試細菌經大量培養後，測定活菌數為 1.95×10^{10} cells/ml，加 solution B 及 C 乾燥後，作成之明膠薄片 (圖 1)，其活菌數理論值應為 2.23×10^8 cells/disc，但測定後為 1.92×10^8 cells/disc，其存活率為 86%。Stamp⁽⁸⁾ 曾測試不同腸內細菌，其乾燥後存活率保護劑之不同而不同，如 *Salmonella typhi* 當保護劑中含 0.25% ascorbic acid 及 nutrient gelatin 時，存活率為 19.1%，含 0.25% ascorbic acid 及 2.0% polyvinyl alcohol 時測為 14.6%。本法對 *Neisseria gonorrhoeae* 損害性相當大，因該菌種對乾燥較為敏感^(7,9,10)，Yamai 等⁽¹⁰⁾ 測定其乾燥後存活率為 1%。故菌種不同，其存活率亦不同。

將明膠薄片保存於 -20°C，經一段時間後測定其活菌數 (表 1)，保存 14 個月後其活菌數為 1.35×10^8 cells/disc，顯示本法對該菌種之保存相當穩定。*Neisseria gonorrhoeae* 以本法保



圖 1. *Sarcina lutea* ATCC9341 之明膠薄片

表1. 明膠薄片法對 *Sarcina lutea* ATCC 9341 之保存效果

間隔時間	菌			數*	實施地點
	活	1	2	3	
1日	1.84±0.24	2.40±0.10	1.51±0.11	1.92±0.37	本所
2週	1.80±0.18	1.82±0.08	2.77±0.11	2.13±0.35	肉品基金會
3.2月	1.89±0.12	1.72±0.09	1.90±0.11	1.84±0.10	肉品基金會
3.9月	1.53±0.19	1.34±0.59	1.55±0.37	1.47±0.09	本所
5.3月	1.59±0.19	1.77±0.09	1.83±0.04	1.73±0.12	本所
7.5月	1.49±0.14	1.80±0.05	1.51±0.04	1.60±0.17	本所
14.0月	1.49±0.13	1.23±0.13	1.33±0.09	1.35±0.01	本所

*單位：10⁸cells/disc.

存3年，降低1 log (10)，而 *Salmonella typhi* 保存4年，存活率為50%⁽⁶⁾。故本法對菌種保存甚佳。本法主要的保護作用乃在 nutrient gelatin 及 ascorbic acid (8)，後者具有抗氧化作用，而這些氧化作用對細菌之存活有害。

根據日本法⁽⁹⁾常用標準抗生素高倍稀釋液及低倍稀釋液，其抑制圈分別為10mm以上及20~25mm。對 Penicillin 而言符合其規定，而對 Tylosin 而言則菌液濃度稍高，因低倍稀釋液未達20~25mm，降低菌液濃度，即可達其規定。降低菌液濃度之方法為增加培養基量，即一菌種片放入150ml或200ml培養基即可。本所與肉品發展基金會所作抗生素力價試驗，顯示明膠薄片法對菌種之分佈相當均勻，且取量乾燥時亦相當準確。請詳見表2。故供試菌種以本法保存不僅期限長，且操作方便，只須取一片即可，不須每次計算細菌數，省時又省事，值得採用並推廣之。

表2. *Sarcina lutea* ATCC 9341 明膠薄片對抗生素之力價試驗

間隔時間	Penicillin (Iu/ml)		Tylosin (μg/ml)		實施地點
	0.16	0.04	0.8	0.2	
1日	22.1±0.8*	13.1±1.3	17.0±0.7	11.5±0.9	本所
	22.3±0.5	13.0±0.4	18.6±0.6	14.3±1.5	
2週	21.9±0.4	13.2±0.6	16.1±0.2	11.0±0.4	肉品基金會
	22.0±0.5	14.3±0.3	16.2±0.4	11.1±0.4	
3.2月	20.8±0.2	14.2±0.1	15.9±0.2	11.1±0.2	肉品基金會
	20.8±0.2	14.0±0.2	15.9±0.3	11.2±0.4	
3.9月	23.1±0.3	15.0±0.1	17.1±0.4	11.7±0.2	本所
	23.3±0.3	14.3±0.4	16.6±0.8	11.4±1.0	

*單位：mm

參考文獻

1. 日本厚生省・日本抗生物質醫藥品基準。
2. 林士鈺。1979。鷄體內殘留抗生素檢查方法的比較。碩士論文，臺北。
3. 傅祖慧。1982。日本、美國及我國的畜水產品殘留抗生物質檢查法。臺灣區肉品發展基金會，臺北。
4. 衛生署。中華藥典，第三版。
5. British Pharmacopeia. 1980. London Her Majesty's Stationery Office.
6. Grove, D. C., and W. A. Randall. 1969. Assay methods of antibiotics—A laboratory manual. Medical Encyclopedia, New York, N. Y.
7. Lapage, S. P., J. E. Shelton, T. G. Mitchell, and A. R. Mackenzie. 1970. Culture collections and the preservation of bacteria. Methods in microbiology, Academic Press, USA.
8. Stamp, L. 1946. The preservation of bacteria by drying. J. of General Microbiology. 1: 251—265.
9. United States Pharmacopeia, 20th edition.
10. Yamai, S., Y. Obara, T. Nikkawai, Y. Shmoda, and Y. Miyamoto. 1979. Preservation of *Neisseria gonorrhoeae* by the gelatin-disc method. British J. of Venereal Diseases. 55: 90—93.

The Application of the Preservation of *Sarcina lutea* ATCC 9341 by Gelatin-Disc Method

S. Y. Lin¹, T. F. Chiou¹, H. S. Cheng², K. M. Lin¹, S. H. Lee¹, Z. W. Chiou¹, and C. S. Chen¹

Currently, the microbiological methods are used to assay the antibiotics and its residues in animal products. There must be test organisms. Non-spore test organisms must be prepared freshly and counted before being used. These methods are too complicated.

To solve this problem we had tried to preserve the test organism by means of a gelatin-disc method. *Sarcina lutea* ATCC 9341 had remained (1.35×10^8 cells/disc) as they were after being preserved for 14 months (the cell count was 1.92×10^8 cells/disc before preservation). This study had proved to be satisfactory in terms of preservation. The potency assay of penicillin met the requirements of the Japanese method, but the inhibition zone of low concentration of tylosin was a little narrower but an increase in the amount of medium will meet the requirement. Thus the assaying of the potency has become very convenient because it only needs one disc to mix 100ml medium. We, therefore, can deduce that the other non-spore test organisms can also be preserved by this method.

1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health
2. Taiwan Meat Development Foundation