

噬菌體 AH1 在不同環境之效價

林慧明* • 許璐 • 吳金冽*

Titer Change of Bacteriophage AH1 in Different Environments.

Hui-Ming Lin*, Lu Jan and Jen-Leih Wu*

Abstract

Standing characteristics of the bacteriophage AH1 in eight different water supplies were compared inside and outside the laboratory. Autoclaved tap water gave the best keeping condition for the phage inside and outside the laboratory. Distilled water was the worst one within the laboratory, however, one pond water was faulty in keeping the phage outside the laboratory.

Plaque forming units of the lyophilized phage AH1 remained unchanged for 120 days and decreased thereafter.

緒言

魚類養殖所發生之疾病種類頗多，其中屬細菌性疾病者常因嚴重感染而造成大量死亡，就以 *Aeromonas hydrophila* 而言，是魚類細菌性病中常見病原體之一^(1,2)。本實驗利用 *Aeromonas hydrophila* 病原菌為寄主細胞 (host cell)，篩選能夠感染它的噬菌體 (bacteriophage) 研究魚類赤鰭病的生物防治法⁽³⁾ (biological control method) 建立模式系統，以供魚病防治研究之用。目前就以所篩選的八種噬菌體中，具有最强溶菌能力的噬菌體 AH1 為材料，探討赤鰭病的防治⁽⁴⁾；噬菌體 AH1 感染 *A. hydrophila* 後，在 100 分鐘內可以產生 160 個新生噬菌體，而且在 3 小時後，*A. hydrophila* 的菌數被降低 1×10^7 倍以上；在感染倍數 (multiplicity of infection, 簡稱 m.o.i.) 0.01 以上時，*A. hydrophila* 對魚體的病原性及致死性可以完全被消除；如此效率的溶菌作用，極有利於控制水中 *A. hydrophila* 的濃度，而達到預防養殖魚類赤鰭病的發生。本篇研究報告的目的，在於探討噬菌體 AH1 在不同的水源及經冷凍乾燥後，感染力之變化，亦即其安定性的問題，以評估 AH1 在生物防治法之可行性。

材料與方法

1. 菌株 *Aeromonas hydrophila* 培養

實驗所用的菌株 *Aeromonas hydrophila* 是直接從病魚體內分離出，由臺大動物系魚病研究所

* 中央研究院動物研究所

Institute of Zoology, Academia Sinica, Nankang, Taipei, Taiwan, 115.

提供。本實驗室以 $3\times D$ 培養液(A 溶液： KH_2PO_4 4.5 gm, Na_2HPO_4 10.5 gm, Casein hydrolysate 15.0 gm, glycerol 13 gm, gelatin 30 mg, distilled H_2O 950 ml; B 溶液： $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 gm, $CaCl_2$ 0.033 gm, distilled H_2O 50 ml, A 與 B 溶液滅菌後，冷卻至室溫時混合)，在 $28^\circ C$ 下，以行好氣性培養 *A. hydrophila* 細菌，利用分光光度計 (spectrophotometer) 測定其生長情形，在 $O.D_{580}=0.8$ 時，此菌生長大約達到對數期 (log phase) 階段，細菌數約為 5×10^8 cells/ml，利用此時期的細菌做接種源，進行實驗。

2. 噬菌體 AH1 培養⁽⁵⁾

本實驗室先後自野外採集池水及下水道排水，回實驗室鑑定，分離出八種噬菌體，分別命名 AH1, AH2, AH3, ……AH8，其中測知 AH1 噬菌斑 (plaque) 之生長最快，在 $28^\circ C$ 下，16 小時之半徑可達 1.41 mm，表示它的溶菌 (lysis) 能力最强，因此，AH1 被挑選來感染 *A. hydrophila*。培養高效價噬菌體 AH1 時，必需先培養寄主 *A. hydrophila*，細菌培養到 $O.D_{580}=0.8$ 時，加入感染倍數等於 1 的噬菌體 AH1，亦就是 AH1 對 *A. hydrophila* 的比例等於 1，此時，*A. hydrophila* 容易被噬菌體 AH1 吸附 (adsorption) 感染，在打氣或振盪培養下，會有溶菌現象發生，溶液會逐漸澄清，離心除去細菌屍體後，上層液體保留。鑑定效價 (titer) 之方法，是將保存液 0.1 ml 經 100 倍連續稀釋，分別取 0.1 ml AH1 稀釋液，0.1 ml *A. hydrophila* 培養液與 0.65%，3 ml 低濃度洋菜培養基 ($42^\circ C$) 混合均勻，倒在含有洋菜培養基的培養皿上，使均勻分佈，凝固後，放在 $28^\circ C$ 下溫箱培養，隨時觀察噬菌斑的形成，通常 6 ~ 12 小時後，計算噬菌斑的數目。

3. 活存試驗

① 液體狀態 (Liquid state)

16 隻 1,000 ml 燒杯，分別盛不同來源的水，如自來水 (經高壓蒸氣消毒)，蒸餾水及六處池水，每杯盛有 700 ml，加入 $1\sim 2\times 10^8$ PFU/ml (plaque forming unit/ml) 之噬菌體 AH1，再分成兩組，一組放在實驗室內，另一組放在室外有水的水溝中，每天定期以吸管攪拌吸取 0.1 ml，連續稀釋，測定 AH1 效價，計算活存比 (survival fraction)，活存比 = AH1 在水溶液中之效價 (PFU/ml) / AH1 之原來效價 (PFU/ml)，並記錄每天的水溫與氣溫。

② 冷凍乾燥狀態

將 AH1 效價為 1.5×10^{11} PFU/ml 160 ml 經 $30,900\times g$ 離心 1 小時，所得到沉澱物用 40 ml Mq 培養基 ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 7.0 gm, KH_2PO_4 3.0 gm, $NaCl$ 0.5 gm, NH_4Cl 1.0 gm, $MgSO_4 \cdot 10^{-3}M$, $CaCl_2 \cdot 10^{-4}M$, glucose 4.0 gm, distilled H_2O 1,000 ml) 分散後，分別以每 0.5 ml 量裝入冷凍乾燥用的小玻璃瓶 (ampule) 內，冷凍乾燥後，真空密封瓶口，保存於 $4^\circ C$ 冰箱中，再定期開瓶加入 0.5 ml 稀釋培養基 (diluting medium: 0.8 gm nutrient broth, 5.0 gm $NaCl$, 1,000 ml distilled H_2O) 測定活存效價，來鑑定 AH1 的安定性的時限。

結果與討論

一、水源之 pH 值及室內外溫度

為了瞭解噬菌體 AH1 在水溶液中之安定性，所採用的水源分別取自蒸餾水，自來水及六處養殖池水。測定這些水源的 pH 值，結果如 Table 1 所示，各地池水的 pH 值近乎中性，分別介於 pH 7.2 至 7.8 之間，自來水的 pH 值為 7.8，蒸餾水則偏酸性，其 pH 值為 5.6。

Table 1. pH value of water from different sources.

Water source	Tap water	Distilled water	Pond 1	Pond 2	Pond 3	Pond 4	Pond 5	Pond 6
pH	7.8	5.6	7.5	7.8	7.5	7.3	7.2	7.2

本實驗分別在室內及室外進行，測定試驗期間之氣溫及水溫變化；室外氣溫及水溫之變化分別介於 $21^{\circ}\sim 25^{\circ}\text{C}$ 與 $21^{\circ}\sim 25^{\circ}\text{C}$ 之間，如 Fig. 1 所示，這四天之天氣主要是陰天；室內水溫及水溫較穩定，氣溫為 26°C ，而水溫為 23°C 。

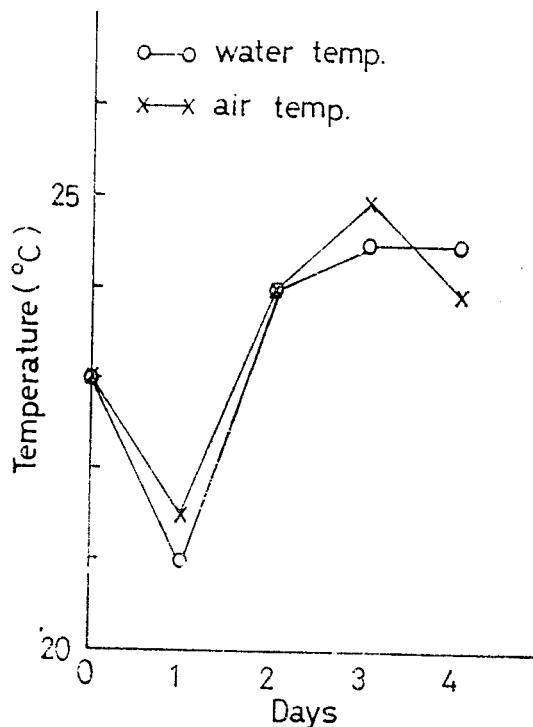


Fig. 1. The variation of air and water temperatures of outdoor experiment.

二、AH1 在室內不同水源中的安定性

噬菌體 AH1 在室內八種不同水源中，其最初效價濃度為 $1.7 \times 10^8 \text{ PFU/ml}$ ，每天測定 AH1 之活存效價及活存比 (Fig. 2 及 Table 2)。經過一天放置之後，噬菌體 AH1 在自來水中的效價濃度不變化，但是在蒸餾水中的安定性最低，效價成 $1.0 \times 10^7 \text{ PFU/ml}$ ，活存比值為 0.059；在六種池水中的安定性較在蒸餾水中為高，效價濃度僅為原來效價濃度之一半左右，活存比皆分別為 0.647, 0.441, 0.494, 0.706, 0.647 及 0.512，以在第 2 號及第 3 號池水中的安定性較低。這種安定性的差異到第三天更為明顯，AH1 在自來水中仍然維持近乎原來的噬菌體效價 ($1.3 \times 10^8 \text{ PFU/ml}$)，但在蒸餾水中的安定性急劇降低，效價降為 $2.9 \times 10^4 \text{ PFU/ml}$ ，活存比祇為 1.7×10^{-1} ，與原來噬菌體濃度相比，幾乎降低 6,000 倍左右。在各地池水中的活存比分別是 5.2×10^{-2} , 9.4×10^{-2} , 6.5×10^{-2} , 1.1×10^{-1} , 5.5×10^{-2} 及 7.6×10^{-2} 。很顯然地，AH1 在這些池水中的安定性可粗分為兩類，一類為在第 2 號及第 3 號池水，其活存效價低於原來濃度的百分之一，另一類為在第 1, 4, 5 及 6 號池水，其活存效價介於原來效價的百分之五至十之間。

Table 2. The survival titer and survival fraction of bacteriophage AH1 in indoor aqueous state.^(a,b)

Water source	Days in water							
	1		2		3		4	
	S.T. ^c	S.F. ^d	S.T.	S.F.	S.T.	S.F.	S.T.	S.F.
Tap H ₂ O	1.7×10^8	1.0×10^0	1.6×10^8	9.4×10^{-1}	1.3×10^8	7.6×10^{-1}	1.2×10^8	5.9×10^{-1}
Distilled H ₂ O	1.0×10^7	5.9×10^{-2}	5.5×10^5	3.2×10^{-3}	2.9×10^4	1.7×10^{-4}	2.0×10^4	1.2×10^{-4}
Pond 1	1.1×10^8	6.5×10^{-1}	4.0×10^7	2.4×10^{-1}	8.9×10^6	5.2×10^{-2}	3.3×10^6	1.9×10^{-2}
Pond 2	7.5×10^7	4.4×10^{-1}	1.7×10^7	1.0×10^{-1}	1.6×10^5	9.4×10^{-3}	7.8×10^5	4.6×10^{-3}
Pond 3	8.4×10^7	4.9×10^{-1}	1.9×10^7	1.1×10^{-1}	1.1×10^5	6.5×10^{-3}	5.5×10^5	3.2×10^{-3}
Pond 4	1.2×10^8	7.0×10^{-1}	4.9×10^7	2.9×10^{-1}	1.8×10^7	1.1×10^{-1}	5.3×10^5	3.1×10^{-2}
Pond 5	1.1×10^8	6.4×10^{-1}	5.2×10^7	3.0×10^{-1}	9.4×10^5	5.5×10^{-2}	8.4×10^5	4.9×10^{-2}
Pond 6	8.7×10^7	5.1×10^{-1}	6.2×10^7	3.6×10^{-1}	1.3×10^7	7.6×10^{-2}	7.6×10^5	4.5×10^{-2}

a. Room temperature was 26°C and water temperature was 23°C.

b. The initial titer of AH1 was 1.7×10^8 PFU/ml.

c. S.T.: Represent survival titer by PFU/ml.

d. S.F.: Represent survival fraction, calculated by $\frac{\text{PFU/ml in water}}{\text{PFU/ml of initial titer}}$.

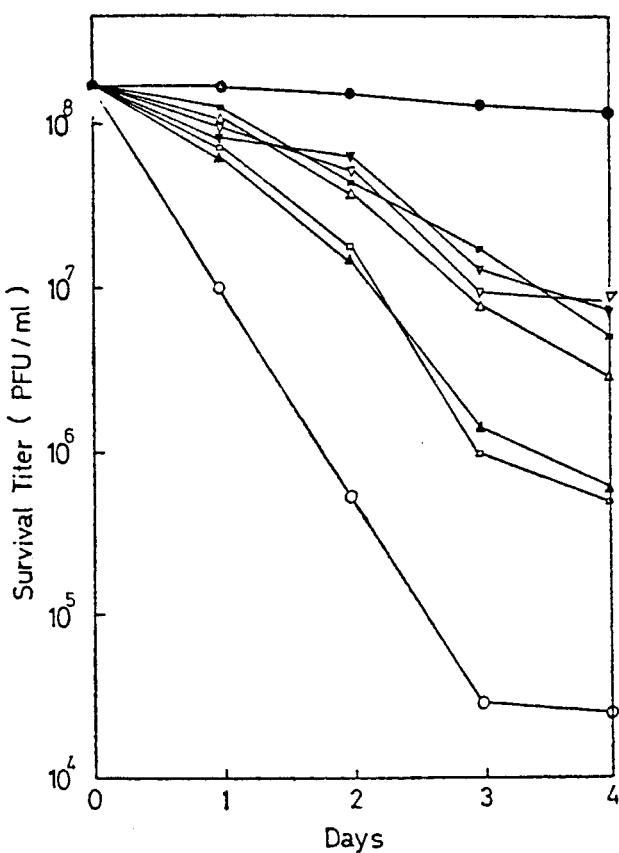


Fig. 2. The stability of bacteriophage AH1 in indoor aqueous state. ●—● tap H₂O,
○—○ distilled H₂O, △—△ Pond 1, ▲—▲ Pond 2, □—□ Pond 3, ■—■ Pond 4,
▽—▽ Pond 5, ▼—▼ Pond 6.

噬菌體 AH1 在 pH 6 至 pH 9 水溶液中的安定性相若，pH 增加或降低，則安定性下降（未發表結果）；在不同溫度下的安定性實驗，顯示 AH1 在 36°C 以下的溫度，其安定性相近（未發表結果）。由 Table 1 的測定結果可知，除了蒸餾水的 pH 值 5.6 以外，其餘七種水源的 pH 值都是 AH1 安定的 pH 範圍內，而且室內溫度亦在 AH1 的安定溫度範圍內。因此，AH1 在蒸餾水內的安定性特別低應與其所處的 pH 偏酸有相當關係。但是，AH1 在六處池水中的安定性仍然比在自來水中低，此可能是自來水與池水的水中生物相不同的關係。因為，自來水已經過殺菌處理，鮮有生物在水中生存，但是池水採回之後，則保留其原有狀態直接做實驗，其中含有許多細菌、微生物、藻類及原生動物等生物，而且因水源採自不同地點，而有甚大差異。由於這些水中生物的存在，常有許多酵素或代謝物分泌到池水中^(6,7)，池水可能存在生物分泌的蛋白質分解酶（protease）或核酸酶（nuclease）等酵素，則對噬菌體 AH1 的感染活性有相當的破壞力，因為，噬菌體 AH1 主要是由蛋白質與 DNA 構成其個體。又水中各種離子的存在有助於噬菌體 AH1 活性的保存^(8,9)，因為在自來水中的活性大部份可以保留，而在蒸餾水中則不能，因此造成兩者在無水中生物存在下，對 AH1 的安定性產生不同的影響結果。

三、AH1 在室外不同水源中的安定性

噬菌體 AH1 在室外八種不同水源中，其最初效價濃度為 1.4×10^8 PFU/ml，測定 AH1 之活存效價與活存比結果，如 Fig. 3 與 Table 3 所示，在第一天 AH1 的活存效價，仍以自來水中最高，而以蒸餾水中最低，其活存效價為 1.6×10^7 PFU/ml，活存比為 0.11，在其他六種池水中活

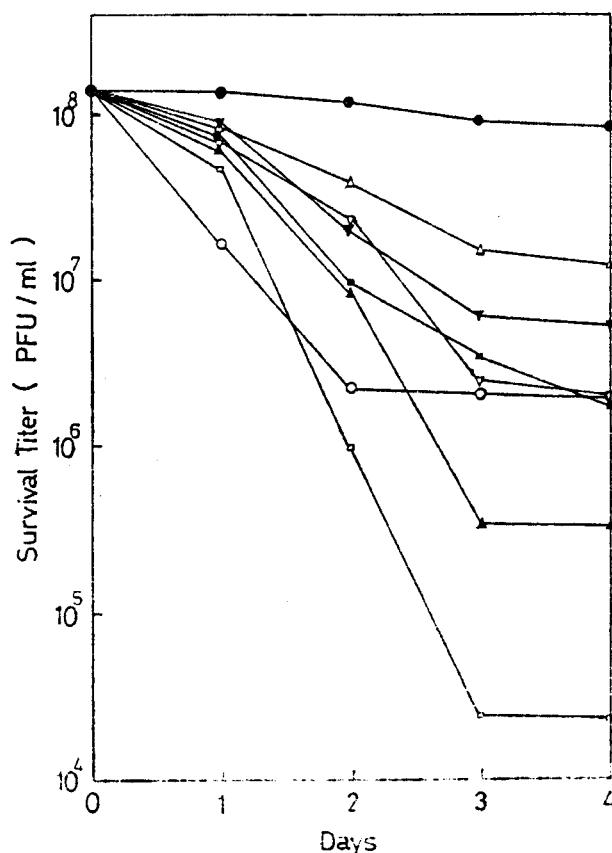


Fig. 3. The stability of bacteriophage AH1 in outdoor aqueous state. ●—● Tap H₂O,
○—○ Distilled H₂O, △—△ Pond 1, ▲—▲ Pond 2, □—□ Pond 3, ■—■
Pond 4, ▽—▽ Pond 5, ▼—▼ Pond 6.

Table 3. The survival titer and survival fraction of bacteriophage AH1 in outdoor aqueous state*.

Water source	Days in water							
	1		2		3		4	
	S.T.	S.F.	S.T.	S.F.	S.T.	S.F.	S.T.	S.F.
Tap H ₂ O	1.4×10^8	1.0×10^0	1.2×10^3	8.6×10^{-1}	1.0×10^8	7.1×10^{-1}	9.6×10^7	6.8×10^{-1}
Distilled H ₂ O	1.6×10^7	1.1×10^{-1}	2.2×10^3	1.6×10^{-2}	2.0×10^3	1.4×10^{-2}	2.0×10^3	1.4×10^{-2}
Pond 1	9.6×10^7	6.8×10^{-1}	4.6×10^7	3.2×10^{-1}	1.6×10^7	7.1×10^{-2}	1.2×10^7	8.5×10^{-2}
Pond 2	8.5×10^7	6.1×10^{-1}	9.3×10^3	6.6×10^{-2}	4.0×10^5	2.8×10^{-3}	4.0×10^5	2.8×10^{-3}
Pond 3	4.9×10^7	3.5×10^{-1}	1.0×10^7	7.1×10^{-3}	2.8×10^4	2.0×10^{-4}	2.8×10^4	2.0×10^{-4}
Pond 4	9.4×10^7	6.7×10^{-1}	1.1×10^7	7.8×10^{-2}	3.5×10^5	2.5×10^{-2}	1.9×10^3	1.4×10^{-2}
Pond 5	8.8×10^7	6.3×10^{-1}	2.2×10^7	1.6×10^{-1}	2.4×10^6	1.7×10^{-2}	2.0×10^3	1.4×10^{-2}
Pond 6	9.7×10^7	6.9×10^{-1}	2.1×10^7	7.1×10^{-2}	8.6×10^6	6.1×10^{-2}	6.9×10^3	4.9×10^{-2}

* The initial titer of AH1 was 1.4×10^8 PFU/ml.

存比分別為 0.68, 0.61, 0.35, 0.67, 0.63 及 0.67，顯示噬菌體 AH1 在第 3 號池水中的安定性較其他池水中為低。此種安定性的差異在第三天有如下的變化：在第 2 號與第 3 號池水的 AH1 的活存比分別為 2.8×10^{-3} 及 2.4×10^{-4} ，而其餘池水及蒸餾水中的 AH1 活存比，則分別為 7.1×10^{-2} , 2.5×10^{-2} , 1.4×10^{-2} , 6.1×10^{-2} 及 1.9×10^{-2} 。很明顯地，AH1 在這些池水中的安定性，仍可同樣的區分成二類，一類為在第 2 號及第 3 號池水，其活存效價低於原來效價濃度的千分之三以下，另一類為在第 1, 4, 5 及 6 號池水，其活存效價介於原來效價的百分之一至八之間。

室外所做的實驗，八種不同水源的水，pH 值不變，蒸餾水仍偏酸性，其餘的都在適合 AH1 保存的 pH 範圍內，如 Table 1 所示；但在第三天起，AH1 活存比是以在第 2 號及第 3 號池水中最低，可能是在第 2, 3 號池水中所含的生物相最多，在室外光線直接照射下，水中生物之新陳代謝速率增加，代謝物相對地增多，致使 AH1 活性急劇的降低，所以活存比較在蒸餾水中的低；在本實驗中，池水中的生物相似於較水源的 pH 值，對 AH1 安定性的影響大，此方面須進一步做水質分析及水中生物相的調查。室外溫度波動較室內大，而且有日光照射，日光中具有紫外線，能使 AH1 活性降低^(1, 11) (deactivation)，在室外所得到 AH1 活存比較在室內低。

四、AH1 在冷凍乾燥狀態下的安定性

噬菌體 AH1 的溶菌液 (lysate) 是在水溶液培養基內，故不能長時期維持其感染活性。為了長期保存 AH1 的活性，把它用冷凍乾燥法製成粉末，在 4°C 下貯藏，定期測定其活存效價。結果如 Fig. 4 所示，AH1 原來之效價濃度為 1×10^{11} PFU/ml，在粉末製成後 120 天內，活性沒有變化，此後才顯出感染活力逐漸下降。因此 AH1 在乾燥狀態下較在水溶液中安定度高，有利於長期保存其活性。將來應用到魚病生物防治上時，把噬菌體 AH1 做成冷凍燥粉末保存，使用時，將噬菌體粉末溶於水溶液中成高濃度，再分別混入養殖池內，如此，可以延長貯藏時間，減少貯藏及運送的麻煩，甚至其他細菌性的疾病，都可以仿用此生物防治模式來做魚病預防。

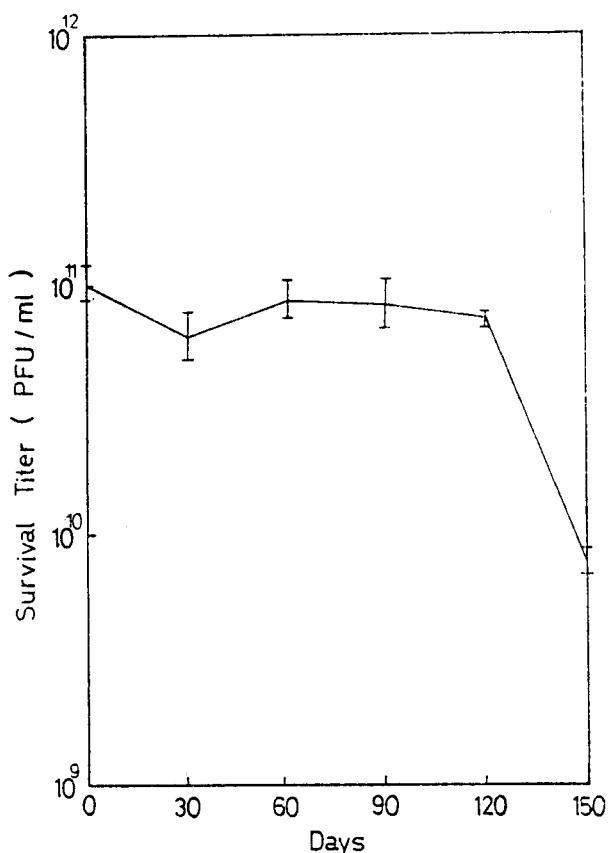


Fig. 4. The stability of bacteriophage AH1 in lyophilized state.

摘要

本實驗係以分別在室內與室外測定 AH1 八種不同水源中的安定性。在室內，以在自來水中的安定性最高，其次在六種不同池水中，在蒸餾水中的安定性最低；而在室外，是以在自來水中的安定性最高，但因池水生物在日照直接影響下，所產生代謝物質較室內實驗的池水多，所以，AH1 不是在蒸餾水中安定性最低，而是在池水中的安定性最低。真空乾燥方法製成 AH1 粉末可以維持 120 天之久的安定性，且具有溶菌作用。

謝辭

本研究承農業發展委員會漁業組之資助，得以完成，謹此致謝。研究期間承蒙臺灣大學動物系郭光雄教授及魚病研究室同仁之鼎力協助，特致衷心之謝意。

參考文獻

References

1. Kou, G. H. (1974). Studies on the bacterial flora in eel-culturing ponds with special reference to *Aeromonas*. J. Fish. Soc. Taiwan, 3:21-27.
2. Lin, Y. S. and Hsiao, S. M. (1977). The statistic analysis of eel disease in

- Taiwan. JCRR Fisheries Series. No. 29, pp. 57-61.
3. Morrison, J. (1932). Bacteriophage in the treatment and prevention of cholera, Lewis, London.
 4. 呂金冽 噬菌體與魚病防治 生物研究中心專刊第9號 pp. 9-14.
 5. Rovozzo, G. C. and BURKE, C. N. (1973). Chap. 8 Bacteriophage, A Manual of Basic Virological Techniques, pp. 165-179.
 6. Pacaud, M. (1976). Purification of protease II from *Escherichia coli* by affinity chromatography and separation of two enzyme species from cells harvested at late log phase. Eur. J. Biochem., 64: 199-204.
 7. Mosig, G. and BOCK, S. (1976). Gene 32 protein of bacteriophage T4 moderates the activities of the T4 gene 46/47-controlled nuclease and of the *Escherichia coli* *Escherichia coli* RecBC nuclease *in vivo*. J. Virol., 17: 756-761.
 8. Anacker, R. L. and ORDAL, E. J. (1955). Study of a bacteriophage infecting the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*. J. Bacteriol., 70: 738-741.
 9. Kotinoff, L. M. (1978). Properties of T4D bacteriophage grown in synthetic media containing Zn⁺², Co⁺² or Ni⁺²: J. Biol. Chem., 253: 1059-1064.
 10. Reiner, A. (1949). Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus* conidia from ultraviolet irradiation injury. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 35: 73-79.
 11. Hamlett, N. V. and BERGER, H. (1975). Mutation altering genetic recombination and repair in bacteriophage T4. Virology, 63: 539-567.