

测定菌体浓度的简便方法

朱艳静, 李宇

(上海市工业微生物研究所, 上海 200233)

摘要 为了简便地测定 JIS L 1902 标准所规定的菌液浓度, 以单位体积菌落数与吸光度 (ABS 值) 的相关性, 制成标准曲线, 利用标准曲线快速准确地判断菌液浓度。

关键词: 菌液浓度; 吸光度 (ABS 值); 标准曲线; JIS (日本工业标准)

控制菌液浓度是测试抗菌率的关键一步, 菌液浓度过高或过低, 将影响测试结果, 因此务必使其落在标准所规定的范围内。以往一般采取两种方法来测定菌液浓度。一为活菌计数法, 此法能准确地判断菌液浓度, 但有明显的滞后性, 无法在第一时间内确定其实际浓度, 待结果出来后, 再开始检测, 菌的活性将有所下降, 给实验室操作带来诸多不便; 二为比浊法, 此法能快速地判断菌液浓度, 但为粗略的估计值, 受限于各人肉眼的观察, 误差较大, 准确性不高。

本文根据日本工业标准: 纤维制品的抗菌性试验方法 (Japanese Industrial Standard: Testing for antibacterial activity and efficacy on textile products) JIS L 1902 单位体积菌落数与吸光度 (ABS 值) 的相关性, 制成标准曲线, 快速准确地测算菌液浓度, 便于实验的操作与预判, 具有较强的实用价值。

1 材料与方法

1.1 菌种

大肠杆菌 (*Escherichia coli* ATCC8099)

1.2 试剂与仪器

蛋白胨 (中国医药集团上海化学试剂公司) 批号: F20040903

牛肉膏 (国药集团化学试剂有限公司) 批号: F20041102

氯化钠 (太仓化工二厂) 批号: 20040310

Cary100 紫外—可见光分光光度计

1.3 培养基

营养细菌培养基 NB。

蛋白胨 5g, 牛肉膏粉 3g, 蒸馏水 1000mL, pH 6.8 ± 0.2。

营养琼脂培养基 NA。

蛋白胨 5g, 牛肉膏粉 3g, 琼脂粉 15g, 蒸馏水 1000mL, pH 6.8 ± 0.2。

1.3.1 对数生长期菌液的制备

取在规定保存代数之内的供试菌种, 在火焰旁, 挑取一铂金环, 在营养琼脂培养基上划线, 于 37 ± 1 培养 24h 后, 在平板上挑取饱满的单菌落, 置于 20mL 营养细菌培养基中, 振荡 (110r/min, 振幅 3cm) 培养 24h。

1.3.2 稳定期菌液的制备

取培养好的对数生长期菌液 0.4mL, 于 20mL 营养细菌培养基中, 再振荡培养 4h, 即为稳定期菌液。

1.4 吸光度 (ABS 值) 的测定

取培养好的稳定期菌液, 按不同的设定稀释倍数 (5、10、20、40 倍), 依次进行稀释, (稀释液为 1/20NB), 在 660nm 标准波长下, 测得一组不同菌液浓度的吸光度。(用空白 1/20NB 进行测试前调零)。

1.5 活菌计数

在无菌室内火焰旁进行操作。分别依次测定四个不同稀释倍数的菌落数。每个稀释倍数依次制定几个浓度梯度, 用灭菌吸管各吸取 1 mL 注入平皿。注入约 15 mL, 45 ~ 50 的营养琼脂培养基, 随即转动平皿, 使样品与培养基充分混合均匀, 待培养基凝固后, 翻转平皿, 置 37 ± 1 培养箱内培养 24h 后, 进行菌落计数。用肉眼观察, 点出菌落数, 记下各平皿的菌落数后, 求出同一稀释度各平皿生长的

作者简介: 朱艳静 (1963 ~), 女, 高级工程师。

电话: 021 - 64822988 - 3041, E-mail: zhyj@gsy-siim.com

平均菌落数。

1.6 标准曲线的制作

运用生物统计 ORG 数据分析软件,以吸光度 ABS 值为横坐标,稳定期的菌液浓度为纵坐标绘制标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 菌液浓度为 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL 标准曲线的制作

(见表 1;图 1、2)。

表 1 菌液浓度 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL 的 ABS 值

第一次实验结果		第二次实验结果	
菌液浓度 (cfu/mL)	吸光度 (ABS 值)	菌液浓度 (cfu/mL)	吸光度 (ABS 值)
2.5×10^7	0.0686	2.2×10^7	0.0760
5.4×10^7	0.1251	5.4×10^7	0.1590
9.6×10^7	0.2362	8.7×10^7	0.2692
1.5×10^8	0.4386	1.6×10^8	0.4616

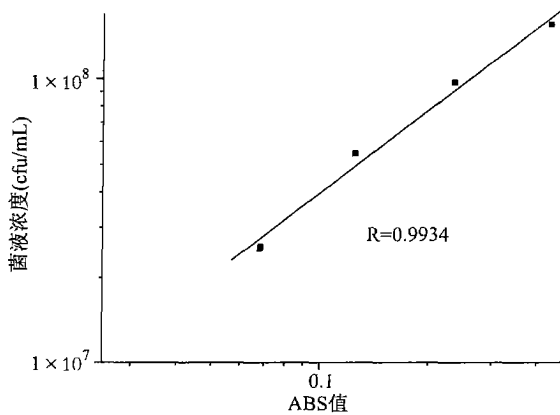


图 1 菌液浓度 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL 的 ABS 值 (第一次实验结果)

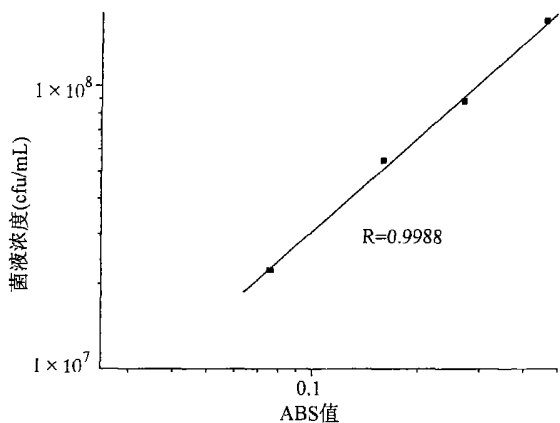


图 2 菌液浓度 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL 的 ABS 值 (第二次实验结果)

由图 1、2,我们可以看到,将菌液浓度控制在 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL 时,标准曲线的回归系数可达 0.99 以上,准确度很高。

2.2 菌液浓度为 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 标准曲线的制作

(见表 2;图 3、4)。

因为最终所用的菌液浓度为 10^5 cfu/mL,所以就考虑在制作标准曲线时,将其控制在 10^5 cfu/mL,避免因再次稀释所产生的误差。同样,在同等条件下,重复两次实验。

表 2 菌液浓度 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 的 ABS 值

第一次实验结果		第二次实验结果	
菌液浓度 (cfu/mL)	吸光度 (ABS 值)	菌液浓度 (cfu/mL)	吸光度 (ABS 值)
9.5×10^5	0.0372	3.0×10^5	0.0002
1.7×10^6	0.0311	7.5×10^5	0.0036
3.3×10^6	0.0523	1.5×10^6	0.0069
7.5×10^6	0.1106	2.5×10^6	0.0099

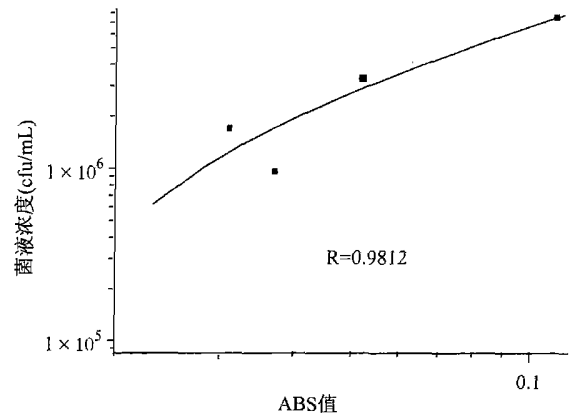


图 3 菌液浓度 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 的 ABS 值 (第一次实验结果)

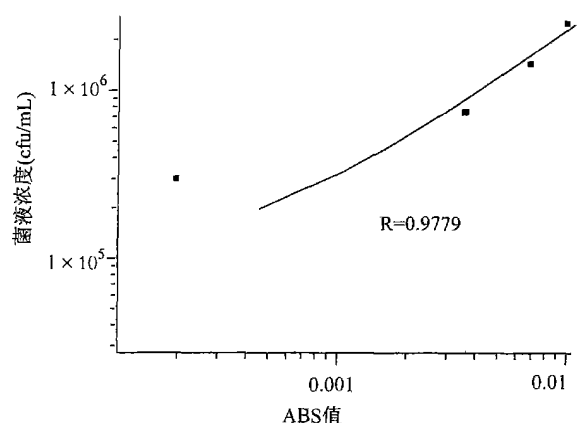


图 4 菌液浓度 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 的 ABS 值 (第二次实验结果)

由 3、4 图,可以看到,将菌液浓度控制在 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 时,标准曲线的回归系数偏低,存在一定的误差。

3 结论

经实验论证,在标准曲线制作时,菌液浓度为 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL,其各个稀释倍数的活菌计数值与所测的吸光度,在 ORG 软件对数直角坐标系上呈

很强的相关性,其回归系数 R 非常接近 1。而采用菌液浓度为 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 制作标准曲线,其相关性较差,回归系数 R 不甚理想。因此,不宜直接采用较低浓度的菌液制作标准曲线。

鉴于各实验室条件差异;培养基产地、批号不同;操作人员与系统误差等原因,建议在同一实验室一旦有因素变化,应再进行一次标准曲线的制作。

An easy method for detecting concentration of bacterial suspension

ZHU Yan-jing, LI Yu

(Shanghai Institute of Industrial Microbiology, Shanghai 200233)

Abstract In order to easily detect the concentration of the bacterial suspension, the standard curve according to the colony forming units correlating the absorbency was made. The result showed that this standard curve could quickly judge the concentration of bacterial suspension.

Key words concentration of bacterial suspension; absorbency (ABS); standard curve; JIS (Japanese Industrial Standard)

敬告作者

1. 《工业微生物》期刊为国内外公开发行的科技期刊,本刊为中文核心期刊、“中国科技核心期刊”、“中国科学引文数据库”来源期刊以及美国 CA (Chemical Abstracts) 收录期刊,旨在推动生物技术特别是工业微生物领域的科技成果实现产业化。

2. 为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》、“中国期刊网”和“万方数据——数字化期刊群”等多种数据库。作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意将文章编入数据库,请另投它刊,本刊将不予受理。

3. 受科学基金资助项目的论文应标明其名称及代码,国家级项目予以优先录用发表。

4. 论文应有相应的英文题名、作者姓名、单位、摘要和关键词;量和单位应采用法定计量单位;表格推荐使用三线表;生物名称中属及属以下的拉丁文学名应用斜体。

5. 有关投稿事宜,请与本刊编辑部联系 E-mail: GYWS@chinajournal.net.cn,切勿一稿两投。

《工业微生物》编辑部

地址:上海桂平路 353 号 邮编: 200233