

常见细菌培养物光密度与浓度的关系研究

胡 甜 汪方奎 张少然 陈雯莉

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 为建立准确评估细菌培养物浓度和生长状态的方法, 分别采用流式细胞仪和分光光度计对实验室常见 3 种培养物包括大肠杆菌 *Escherichia coli* S17-1、集胞蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 和枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 168 在不同浓度下的细胞数目和光密度进行了测定。随后将每个培养物在系列浓度下的光密度和细胞浓度进行比较, 建立了光密度-细胞浓度的函数关系。结果表明, 在一定浓度下, 3 种实验室常见培养物的光密度和细胞浓度呈显著线性正相关。最后, 采用拟合函数验证在培养过程中细菌培养物的光密度与细胞浓度的关系。本研究建立了 *Escherichia coli* S17-1、*Synechocystis* sp. PCC 6803 和 *Bacillus subtilis* 168 菌株光密度与细胞浓度的关系, 可为相关菌株采用分光光度法判断培养物细胞浓度及下游分子生物学实验的开展奠定基础。

关键词 细胞浓度; 流式细胞术; 分光光度法; 光密度; 细胞数目

中图分类号 Q 93-33 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)06-0040-05

确定细菌培养物的浓度是监控细菌生长状态、测试菌株生理生化指标的基础。同时, 开展菌液 PCR、RNA/DNA 分离、蛋白纯化、细菌原位杂交等实验研究, 也需要确定培养物的细胞浓度^[1]。目前实验室常规的测定细菌数量的方法主要包括细菌计数板直接计数、稀释平板计数、分光光度法。其中, 细菌计数板计数不能区分死菌和活菌, 而且计数结果容易受观察者熟练程度的影响。稀释平板计数是将稀释的细菌悬液涂抹在适当的琼脂营养平板上, 经过一段时间的培养后计数平板上出现的菌落形成单位的数目。稀释平板计数法误差较大, 耗时长, 难以标准化^[2]。分光光度法是利用细菌培养物对特定波长的光吸收强度来对细菌培养物浓度进行定量分析, 分光光度法评估细菌培养物浓度操作简单、快速, 但是光密度不能与细菌浓度产生直接关联。

流式细胞仪是一种高通量、高灵敏度、多参数颗粒分析系统, 能够利用颗粒(如细胞、细菌、纳米颗粒等)自身在多个特定波长条件下的光学特征, 以及外源标记的荧光特征对颗粒进行系统性多参数定量分析^[3-5]。虽然流式细胞仪主要用于临床诊断和哺乳动物细胞的细胞因子分析, 但是基于流式细胞术的

细菌计数和快速鉴定也已经有了广泛的研究。结合流式分析技术和免疫荧光标记技术已建立了牛奶中大肠杆菌 O157:H7 的快速定量检测方法^[6]。与传统的平板计数法相比, 结果基本一致, 但检测时间只需要 35 min, 在食源性致病菌快速筛选和检测中有重要的应用价值^[5-7]。

林怡雯等^[8]建立了结合 CTC 染色和流式细胞仪检测水环境中具有代谢活性的细菌总数的方法, 可以检测到平板培养法很难检测到的厌氧菌、兼性菌和 VBNC 状态的细菌, 检测时间缩短 20~40 h。总体而言, 流式细胞仪能够快速准确地统计细菌(细胞)数量, 给出具体的培养物浓度。但是, 流式细胞仪价格较贵, 一般实验室由于条件限制使用并不方便。

本研究建立了 3 种实验室常用菌株 (*Escherichia coli* S17-1、*Synechocystis* sp. PCC 6803、*Bacillus subtilis* 168) 在不同浓度下细胞浓度和光密度的相关性, 并构建了光密度和菌悬液浓度之间的函数关系, 旨在为今后利用分光光度计快速确定菌悬液浓度, 开展下游分子生物学研究如 RNA 提取、蛋白纯化、感受态制备等相关实验提供理论依据。

收稿日期: 2018-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570048)

胡 甜, 硕士研究生, 研究方向: 环境微生物。E-mail: 2466475678@qq.com

通信作者: 陈雯莉, 博士, 教授, 研究方向: 环境微生物。E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 材 料

所使用菌株包括 *Escherichia coli* S17-1、*Synechocystis* sp. PCC 6803、*Bacillus subtilis* 168,均由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室保存。

LB 液体培养基:酵母提取物 5 g、胰蛋白胨 10 g、氯化钠 10 g,定容至 1 L。

BG11 培养基: $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g、柠檬酸 0.006 g、 NaNO_3 1.5 g、 K_2HPO_4 0.04 g、 Na_2CO_3 0.02 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.036 g、柠檬酸铁铵(FAC)0.006 g、微量元素金属盐溶液 A5 1 mL,定容至 1 L。

胰蛋白胨和酵母提取物购于安琪酵母股份有限公司,其他各种试剂购于国药集团,均为分析纯。

主要仪器:L6 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)、流式细胞仪 CytoFlex S(美国贝克曼库尔特公司)、全温震荡培养箱 HZQ-F280(天津市泰斯特仪器有限公司)、QHZ-98B 全温光照震荡培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司)、GZL-P500B 光照培养箱(合肥华德利科学器材有限公司)、DW-86L626 立式超低温保存箱(青岛海尔特种电器有限公司)。

1.2 样品预处理

Escherichia coli S17-1:菌株活化后以 1% 接种到 LB 液体培养基,置于恒温震荡培养箱中,于 37 °C、180 r/min 培养约 10 h;然后以 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,弃上清,加入等量无菌 LB 液体培养基重悬。

Synechocystis sp. PCC 6803:菌株活化后接种到 BG11 液体培养基中,初始 D_{730} 约 0.1,置于光照震荡培养箱中,在 30 °C、150 r/min、光强 50~100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的条件下培养 4 d,然后以 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,弃上清,加入等量无菌 BG11 液体培养基重悬。

Bacillus subtilis 168:菌株活化后以 1% 接种到 LB 液体培养基,置于恒温震荡培养箱中,于 37 °C、180 r/min 培养约 10 h,然后以 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,弃上清,加入等量无菌 LB 液体培养基重悬。

1.3 分光光度法标准曲线测定

首先使用 L6 紫外可见分光光度计,分别以各

个培养物的无菌培养基为空白,选择 400~800 nm 波长范围对样品进行吸收光谱扫描。获得各个培养物的吸收光谱后,选取 600 nm 作为 *Escherichia coli* S17-1 和 *Bacillus subtilis* 168 的参考波长;选取 730 nm 为 *Synechocystis* sp. PCC 6803 测试波长进行光密度测试^[9-12]。将重悬的培养物和无菌生理盐水按 1:0、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 的体积比分别稀释成 6 个浓度的菌液。充分混匀后以各个培养物的无菌培养基为空白,测定溶液的光密度。每个样品进行 3 次独立测试。

1.4 流式细胞仪测定菌液浓度

按照本文“1.3”的方法配置系列稀释度的菌液,采用 CytoFlex S 进行细菌计数,流速为 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。*Synechocystis* sp. PCC 6803 数据采用 Excel 进行分析,其余 2 个培养物采用 FCS-SSC 进行评估。

1.5 基于分光光度法的细胞浓度测试

将培养至对数生长期的 *Synechocystis* sp. PCC 6803 接种于 BG11 液体培养基,初始 D_{730} 约 0.1,置于光照震荡培养箱中,在 30 °C、150 r/min、光强 50~100 $\mu\text{mol}/(\text{m} \cdot \text{s})$ 的条件下培养。按照本文“1.3”和“1.4”的方法,分别采用分光光度计和流式细胞仪测定培养物在培养 0、12、24、48、60、72 h 的 D_{730} 和细胞数目。每个样品进行 3 次独立测试。

2 结果与分析

2.1 3 种细菌培养物系列稀释度的浓度分析

为了建立细菌培养物浓度与特定波长下的光密度之间的函数关联,首先采用流式细胞仪对不同稀释度的细菌培养物的浓度进行准确分析。如图 1 所示,以培养物浓度(cells/mL)为纵坐标,以稀释倍数

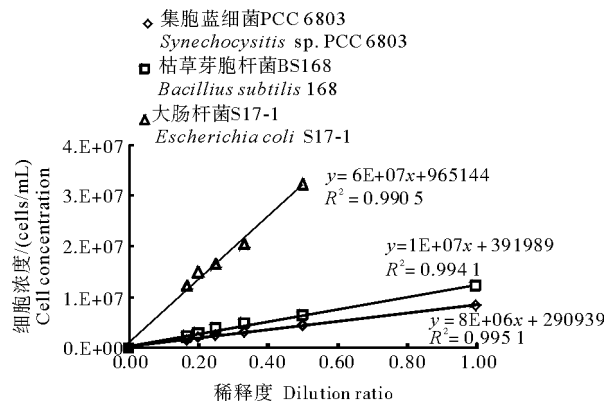


图 1 基于流式细胞术的细菌培养物浓度标准曲线

Fig.1 Standard curve of bacterial culture concentration based on flow cytometry

作为横坐标作图,各个培养物经过系列稀释后细胞浓度与稀释度呈现良好的线性关系。经过线性拟合后,各个培养物的拟合直线的 R^2 值超过 0.99。

2.2 不同浓度的细菌培养物的可见光吸收光谱扫描

为了确定不同培养物的特征吸收波长,建立细胞浓度与光密度之间的关联,利用分光光度计将上述系列稀释培养物在 400~800 nm 范围内进行吸收光谱扫描。结果如图 2 所示,在不同稀释度下,

Escherichia coli S17-1 和 *Bacillus subtilis* 168 在 600 nm 附近,其吸收值与稀释度呈现正相关。结合文献[9-12],本研究选择 D_{600} 对上述 2 个菌株的浓度进行评估。同样,测试系列稀释的 *Synechocystis* sp. PCC 6803 培养物在 400~800 nm 的吸收光谱,结果显示该培养物在 450 nm 和 550 nm 附近有特征吸收峰。但是在不同稀释度条件下,700~750 nm 区间的光密度与培养物浓度呈现正相关。因此,我们选择 D_{730} 值作为 *Synechocystis* sp. PCC 6803 浓度的评估指标。

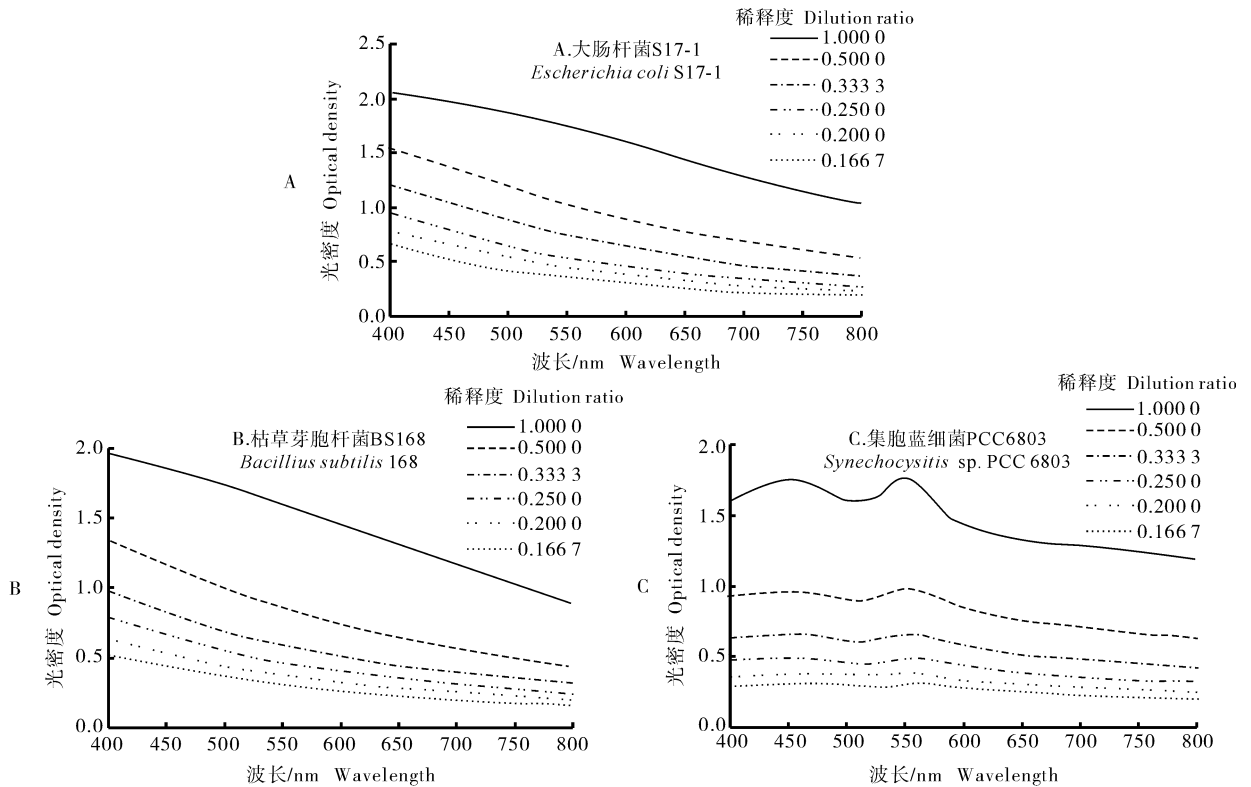


图 2 不同细菌培养物在 400~800 nm 的吸收光谱

Fig.2 Absorption spectra of different bacterial cultures at 400~800 nm

2.3 标准曲线绘制

采用分光光度计测定 3 种细菌培养物系列稀释液的光密度,并以光密度为纵坐标,以稀释倍数作为横坐标作图(图 3),结果显示,当光密度在 0~1.0 范围内,菌株 *Escherichia coli* S17-1, *Synechocystis* sp. PCC 6803 和 *B. subtilis* 168 的光密度与稀释度之间呈现良好的线性相关性。各个培养物经过系列稀释后其细胞浓度也与稀释度呈现良好的线性关系。经过线性拟合后,各个培养物的拟合直线的 R^2 值超过 0.99。

为了分析光密度与细胞浓度的关系,以各个菌

株的系列稀释度的浓度(cells/mL)为纵坐标,以光密度为横坐标作图,如图 4 所示,各个菌株的浓度与光密度呈现良好的线性相关性。线性拟合后的 R^2 都大于 0.99。

2.4 基于分光光度法的微生物浓度的评估

以集胞蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 为例,对上述光密度-培养物浓度关联函数进行验证。将集胞蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 接种到新鲜 BG11 培养基后,取培养 0、12、24、48、60 和 72 h 的培养物,采用分光光度法测定其 D_{730} 值,并换算为细胞浓度。同时采用流式细胞仪直接测定其细

胞浓度。对测定结果进行比较,如图 6 所示,实际测量值和基于分光光度法换算的细胞浓度曲线几乎完全重合。这表明,本研究建立的 3 种微生物的光密度-细胞浓度关联函数能够很好地用于微生物浓度的真实评估。

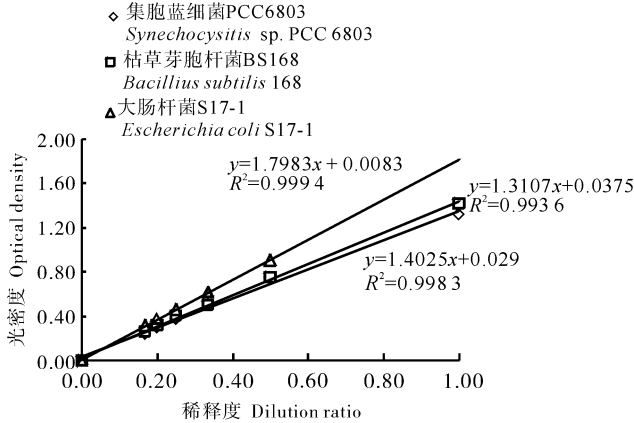


图 3 基于分光光度法的微生物培养物浓度标准曲线
Fig.3 Standard curve of microbial culture concentration based on spectrophotometry

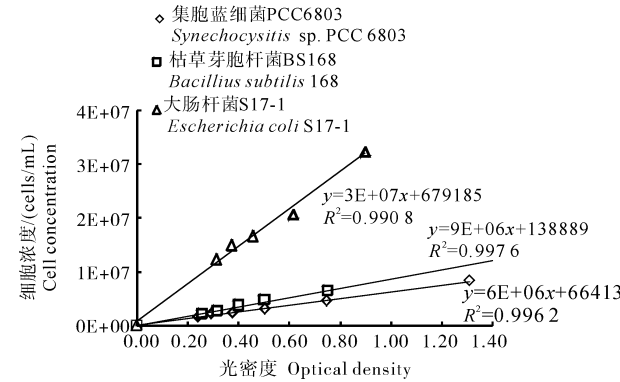


图 4 细菌培养物浓度与光密度的关系
Fig.4 Relationship between concentration of microorganisms and absorbance

学实验操作的前提。采用分光光度法能够快速、准确地完成细菌培养物浓度测试,适用于绝大多数实验室。但值得注意的是,有些微生物自身具有色素分子,存在不同的光吸收特征,因此,需要选择合适的检测波长用于评估微生物的浓度。此外,分光光度法的吸收值与待测物浓度的线性关系需要满足 Lambert-Beer 定律,这就要求待测物的浓度必需在一定的线性范围以内。如果菌悬液浓度太高,则细胞数量与光密度之间就不再是线性关系^[13]。分光光度法的准确度受两方面因素的影响,一是仪器的测量误差,为了使测量结果获得较高的准确度,一般应控制标准溶液和被测试液的光密度在 0.2~0.8 范围,选用适当厚度的吸收池。二是其他化学或物理因素的影响,包括显色反应的再现性与稳定性、共存元素的影响、非单色光和吸光质点的相互作用所引起的对 Lambert-Beer 定律的偏离等因素。同时,细胞的生长状况也会影响光密度的准确性,细胞生长进入稳定后期,细胞死亡量逐渐大于繁殖量,加上细胞凋亡都会影响光密度的测定结果,此时的光密度值不能真实反映菌悬液的浓度^[14-15]。

总之,利用分光光度法可以对大多数细菌培养物进行细胞浓度的大致评估,但是无法获取准确的细胞浓度信息,这主要是由于不同细菌培养物的细胞浓度与光密度之间的数量关系并未确立,此前也基本没有相关报道。本研究建立了 3 种细菌培养物的光密度和细胞浓度的线性关联函数,发现在光密度 0~1.0 范围内,细菌细胞浓度在 3×10^7 cells/mL 以内,光密度与细胞浓度具有良好的线性相关性,这一结果可为今后利用分光光度计快速确定菌悬液浓度,开展 DNA/RNA 提取、蛋白纯化、感受态细胞制备等相关操作提供理论依据。

参 考 文 献

[1] 乔军,孟庆龄,贾桂珍.运用 OD 值法进行细菌计数的研究[J]. 中国家禽,1996(4):26-27.
[2] BARBOSA H R,RODRIGUES M F A,CAMPOS C C, et al. Counting of viable cluster-forming and non cluster-forming bacteria:a comparison between the drop and the spread methods[J]. Journal of microbiological methods,1995,22(1):39-50.
[3] 王玉萍,黄巧云,陈雯莉.利用流式细胞仪分选土壤中发生自然转化的阳性转化子[J].华中农业大学学报,2016,35(2):56-62.
[4] GREVE B,KELSCH R,SPANIOL K, et al. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation[J]. Cytometry part A, 2012,81(4):284-293.

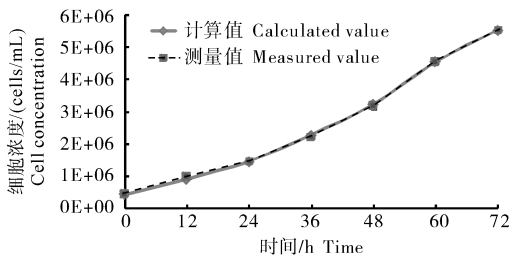


图 5 Synechocystis sp. PCC 6803 生长曲线
Fig.5 Growth curve of Synechocystis sp. PCC 6803

3 讨 论

准确评估微生物培养物的细胞浓度是进行生物

- [5] GEIJN G J M, GENT M, PUL-BOM N, et al. A new flow cytometric method for differential cell counting in ascitic fluid[J]. *Cytometry part B: clinical cytometry*, 2016, 90(6): 506-511.
- [6] 刘思渊, 古少鹏, 隋志伟, 等. 基于流式分析技术的牛奶中大肠杆菌 O157:H7 快速定量检测[J]. *食品科学*, 2017, 22(5): 330-334.
- [7] SINCOCK S A, ROBINSON J P. Flow cytometric analysis of microorganisms [J]. *Methods in cell biology*, 2001, 64: 511-537.
- [8] 林怡雯, 杨天, 李丹, 等. 基于 CTC-流式细胞仪活性细菌总数的快速检测技术研究[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(9): 2511-2515.
- [9] IJIMA H, SHIRAI T, OKAMOTO M, et al. Changes in primary metabolism under light and dark conditions in response to overproduction of a response regulator RpaA in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Frontiers in microbiology*, 2015, 6: 888. DOI: 10.3389/FMICB.2015.00888.
- [10] WU H, WANG H, CHEN J, et al. Effects of cascaded vgb promoters on poly (hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* grown micro-aerobically[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2014, 98(24): 10013-10021.
- [11] SRIPRIYA P, VEDANTAM L V, PODILE A R. Involvement of mitochondria and metacaspase elevation in harpin Pss-induced cell death of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2009, 107(6): 1150-1159. DOI: 10.1002/JCB.22217.
- [12] YAN J Y, ZOU W, FANG J, et al. Eukaryote-like Ser/Thr protein kinase PrkA modulates sporulation via regulating the transcriptional factor σK in *Bacillus subtilis* [J]. *Frontiers in microbiology*, 2015, 6: 382. DOI: 10.3389/FMICB.2015.00382. ECOLLECTION.
- [13] 徐凤, 雷萍. 菌悬液稀释倍数与 OD600 的关系实验[J]. *环保科技*, 2010, 16(3): 43-45.
- [14] 张裕民. 可见分光光度法对 3 种细菌计数的研究[J]. *中国药事*, 2015(10): 1066-1068.
- [15] 董自艳, 戴翠, 马仕洪, 等. 紫外-可见分光光度法快速确定细菌菌液的浓度[J]. *中国药品标准*, 2014(2): 120-121.

Relationship between absorbance and bacterial density

HU Tian WANG Fangkui ZHANG Shaoran CHEN Wenli

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Flow cytometry and spectrophotometry were used to measure the cell numbers and absorbances of three common cultures including *Escherichia coli* S17-1, *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Bacillus subtilis* 168 at different concentrations in the laboratory. Then the absorbance values and cell numbers of each culture were compared. The function relationship between absorbance and cell numbers was established. The results showed that the absorbance value and cell numbers of the three common cultures in the laboratory were significantly positively correlated with the concentration at the certain concentration. It was verified that the absorbance value of the culture can reflect the number of cells during the culture process using the fitting function. The relationship between the absorbance and cell number of three strains including *Escherichia coli* S17-1, *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Bacillus subtilis* 168 was established. It will provide the foundation for developing biological experiments to determine the cell number and downstream molecules in the culture using a spectrophotometer.

Keywords cell concentration; flow cytometry; spectrophotometry; absorbance; cell number

(责任编辑: 张志钰)