

# 多波长扫描法测定混合菌浓度

李 强      陈惠晴      曹竹安

(清华大学化学工程系 北京 100084)

**摘要** 对2-酮基-L-古龙酸发酵过程中,混合菌中各菌量的分别测定方法进行了研究。在吸光度法测定菌量的基础上,提出了利用14个波长下的吸光度值进行拟合计算,分别求取混合菌量的分析方法——多波长扫描法,并据此成功地测定了本体系发酵过程中大、小菌及芽孢的浓度,平均相对偏差小于4%。

**关键词** 混合菌,菌量分析方法

测定微生物菌量的方法有很多,如细胞干重法、密度梯度离心法,平板计数法,分光光度法等<sup>[1~5]</sup>,这些方法各有优缺点和适用范围。细胞干重法,只能测得混合菌的总量;对于密度梯度离心法,理论上可行,但要真正将混合菌定量分开也很困难;平板计数法可以分别测定活菌数,但其操作步骤繁琐,操作误差大,重复性差,而且只能测出具有繁殖力的细胞数量,无法区别芽孢和营养体。对于混合菌发酵体系,分别测定菌量无论是对过程的深入分析,还是进行动力学研究都是必需的。建立一种比较准确的、快速的测定混合菌量的分析方法是十分必要的。本文针对这一问题进行了研究,建立了一种比较可行且具有一定精度的分析方法——多波长扫描法。

## 1 多波长扫描法

根据比尔定律,对于混合物体系,在一定混合物浓度范围内,混合物的吸光度等于各物质吸光度之和。对于具有n个组份的溶液(包括悬浊液),m个波长下可以列出m个方程。如果各方程线性无关,当:  $m < n$  时,方程组无解;  $m = n$  时,有唯一解;当  $m > n$  时,可以作归一化处理,相当于多组数据,因此有优化解。

对于本体系,由于被测样品包括小菌、大菌和大菌芽孢3种组份,理论上测定3个波长下的吸光度,就可以求解出各个浓度,但由于测定

的较小误差,就会使方程的解波动很大,以至于无法反映实际情况,所以必须测定多个波长下的吸光度,采用最小二乘归一化求解,计算方程如式(1)所示。求解方程组1就可以分别计算出小菌、大菌和大菌芽孢的浓度。由于测定多个波长下的吸光度值,与波长扫描相似,因此本文称其为多波长扫描法(Multiwavelength Scanning method, 简称MSM法)。

$$\begin{aligned} & \left( \sum_{i=1}^m \varepsilon_{1i}^2 \right) \cdot c_1 + \left( \sum_{i=1}^m \varepsilon_{1i} \cdot \varepsilon_{2i} \right) \cdot c_2 \\ & + \left( \sum_{i=1}^m \varepsilon_{1i} \cdot \varepsilon_{3i} \right) \cdot c_3 = \left( \sum_{i=1}^m \varepsilon_{1i} \cdot A_{\lambda i} \right) \\ & \left( \sum_{i=1}^m \varepsilon_{2i} \cdot \varepsilon_{1i} \right) \cdot c_1 + \left( \sum_{i=1}^m \varepsilon_{2i}^2 \right) \cdot c_2 \\ & + \left( \sum_{i=1}^m \varepsilon_{2i} \cdot \varepsilon_{3i} \right) \cdot c_3 = \left( \sum_{i=1}^m \varepsilon_{2i} \cdot A_{\lambda i} \right) \quad (1) \\ & \left( \sum_{i=1}^m \varepsilon_{3i} \cdot \varepsilon_{1i} \right) \cdot c_1 + \left( \sum_{i=1}^m \varepsilon_{3i} \cdot \varepsilon_{2i} \right) \cdot c_2 \\ & + \left( \sum_{i=1}^m \varepsilon_{3i}^2 \right) \cdot c_3 = \left( \sum_{i=1}^m \varepsilon_{3i} \cdot A_{\lambda i} \right) \end{aligned}$$

其中:  $c_1, c_2, c_3$ : 分别为小菌、大菌和大菌芽孢的浓度; 浓度单位  $\varepsilon_{1i}, \varepsilon_{2i}, \varepsilon_{3i}$ : 分别为小菌、大菌和

大菌芽孢在  $i(i = 1, 2, \dots, m)$  波长下的吸光系数, 由实验确定; 浓度单位  $^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

## 2 材料和方法

### 2.1 菌种

由巨大芽孢杆菌(大菌)(*Bacillus Megaterium*)和氧化葡萄糖酸杆菌(小菌)(*Gluconobacter oxydans*)组成混合菌体系。

### 2.2 培养基及培养条件

摇瓶培养基组成(g/L): 山梨糖 20, 玉米浆 5, 葡萄糖 2, 尿素 1,  $\text{CaCO}_3$  2, pH7.0~7.2。121℃灭菌 15min。培养条件: 按 80mL 培养液接 1 环大菌和 2 环小菌的比例从培养好的平皿上刮取菌体接种, 置  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  摇床上培养 24h。

平皿培养基组成(g/L): 酵母膏 3, 玉米浆 3, 蛋白胨 10, 牛肉膏 3,  $\text{MgSO}_4$  0.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1, 尿素 1,  $\text{CaCO}_3$  1, 山梨糖 20, 琼脂 20, pH7.0~7.2。1 × 10<sup>5</sup>Pa 灭菌 15min。培养条件: 将摇瓶培养液稀释 10<sup>7</sup>倍, 取 0.1mL 稀释液涂布于平皿培养基上, 置  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  培养箱中根据不同目的培养 1~5d (培养小菌营养体 3d, 培养大菌 12h, 培养大菌芽孢 3~5d)。

### 2.3 实验步骤

**2.3.1 标准样品的配制:** 标准样品的配制及吸光系数的测定: 分别刮取培养好的小菌、大菌和芽孢, 在蒸馏水中配成浓度适中的菌悬液, 按所需要的浓度和比例配制菌悬液, 置于 25ml 容量瓶中, 加入 0.5ml 6mol/L 盐酸并用蒸馏水稀释到刻度, 以蒸馏水为空白, 在 UV-3000 分光光度计上分别测定 350、400、450、500、520、550、570、600、620、650、670、700、750 和 800nm 波长下的吸光度。再用线性回归的方法计算出  $\varepsilon_{1i}$ ,  $\varepsilon_{2i}$ ,  $\varepsilon_{3i}$  ( $i = 1 \sim 14$ )。

**2.3.2 分析样品的测定:** 取发酵液 1ml, 加入蒸馏水约 10ml, 振荡后在离心机上离心 5min (14000r/min), 吸去上清液, 再加入蒸馏水离心一次(操作同前), 将菌用适量蒸馏水洗入 25ml 容量瓶中, 加入 0.5ml 6mol/L 盐酸, 用蒸馏水稀释至刻度。以蒸馏水为空白, 测量上述波长下的吸光度, 再由 1 式计算小菌、大菌和

大菌芽孢的浓度。

## 3 结果和讨论

### 3.1 小、大菌及大菌芽孢浓度与吸光度关系

从图 1 可以看出, 在适当的浓度范围内, 小

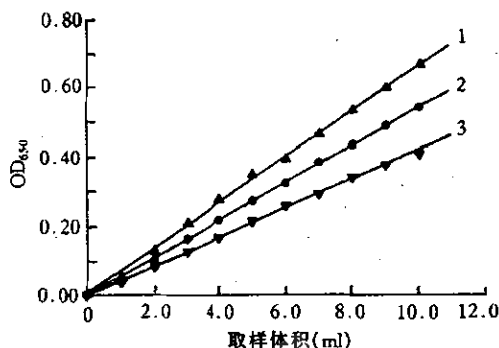


图 1 小菌、大菌及大菌芽孢浓度与吸光度的关系

1: 大菌; 2: 小菌; 3: 芽孢

菌、大菌及大菌芽孢的浓度与吸光度成正比, 符合比尔定律, 同样在所选的 14 个波长下均符合该定律。

分别取大菌悬液 0.1~9ml, 每个样品分别加入 0.2、4、6ml 小菌悬液配成大菌、小菌混合液样(40 个样品); 取芽孢悬液 0.1~9ml, 每个样品分别加入 0.1、2、3ml 小菌悬液配成芽孢、小菌混合液样(40 个样品)。测定样品在 650nm 下的吸光度, 分别得到图 2 和图 3, 可看出, 在菌液较稀时, 向大菌、芽孢中分别加入小菌, 并不影响二者浓度和吸光度之间的线性关

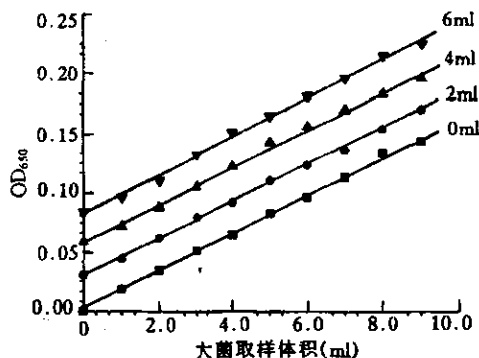


图 2 大、小菌混合液中 大菌浓度(取样体积)与吸光度的关系

图中数据为小菌浓度(取样体积)

系;小菌以恒定的增量加入时,直线的斜率不变,且以恒定值向上平移,其截距值就为相应浓度小菌的吸光度。实验证明,大菌和芽孢之间

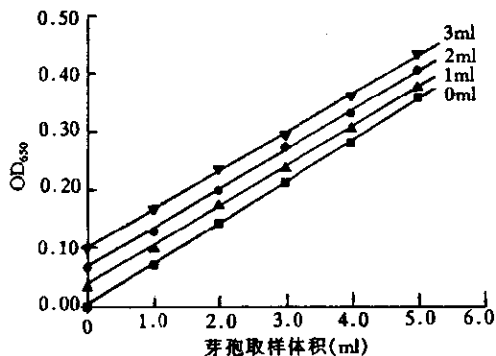


图3 芽孢、小菌混合液中芽孢浓度(取样体积)与吸光度的关系

图中数据为小菌浓度(取样体积)

也同样遵循这一规律。所以,当小菌、大菌和大菌芽孢浓度在一定范围内时符合混合物吸收定律。

### 3.2 吸光系数 $\epsilon$ 的测定

通过测定不同浓度大、小菌及芽孢悬液在350~800nm中14个波长下的吸光度,进行线性回归得到大、小菌及芽孢在各个波长下的 $\epsilon$

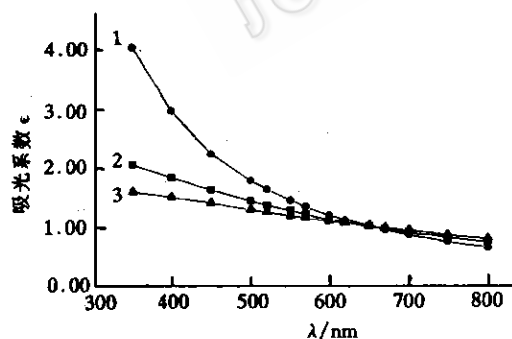


图4 大、小菌及芽孢的吸光系数 $\epsilon$ 与波长的关系  
1:大菌; 2:小菌; 3:芽孢

值。从图4中可以看出不同物质、不同波长下的吸光度不同,可以用1式的归一化方法求解,分别计算出大菌、小菌及芽孢的浓度。

### 3.3 MSM法测定混合菌量

从数学角度看,三个线性方程,求取三个未知数,完全可以求得唯一解;但微生物是有生命的,其组成复杂,光学性质绝不象一般化学物质那样简单、单一;在测定的过程中也存在种种导致误差的可能,如取样误差,仪器本身的误差等。由于这些误差,使仅测定三个波长下的吸光度来计算浓度的方法具有显著的误差。如果测定多个波长下的吸光度,再用最小二乘法来优化拟合,结果和准确度将大大提高。表1是三波长法与多波长法的比较,三波长法选取的波长为350nm、500nm和800nm,基本是所选择波长的边点和中间点。三波长法结果误差很大,而MSM法平均相对误差为3.8%。

表1 MSM法与三波长法计算精度的比较

菌浓度 ( $OD_{630}$ )	大菌	小菌	芽孢	误差 平均值
已知样品浓度	0.074	0.023	0.023	—
多波长法计算值	0.076	0.024	0.022	—
相对误差(%)	2.8	4.3	4.3	3.8
三波长法计算值	0.099	0.034	-0.017	—
相对误差(%)	33.8	47.8	174	85.1

以上的结果说明,MSM法是一种比较准确的测定混合菌浓度的方法,而且测定及时快速、操作方便,为及时了解混合发酵体系菌体生长规律提供了一个较好的方法。

### 参考文献

- [1] 高培基,曲音波,钱新民等.微生物生长与发酵工程.济南:山东大学出版社,1990,5~11.
- [2] 丹尼尔等著(华侨大学化工系生物工程组译).发酵与酶工艺学.福州:福建科学技术出版社,1984,77~87.
- [3] Dawes I W等著(中科院植生所微生物室译).微生物生理学.北京:科学出版社,1980,50.
- [4] 张治琰.国外医学(抗菌素分册),1983,4(2):105.
- [5] Malleter M E. Methods in Microbiology, 1969,6:521.

(下转第375页)

(上接第 378 页)

## CONCENTRATION MEASUREMENT OF MIXCELL BY MULTIWAVELENGTH SCANNING METHOD

Li Qiang    Chen Huiqing    Cao Zhu'an

*(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)*

**Abstract** A method was studied to measure concentration of each kind of strains in a mixcell system during the fermentation of 2-Keto-L-Gluconic Acid. Based on measuring cellmass with Absorbance Method, the new effective way, which was named Multiwavelength Scanning Method (MSM Method), regressed absorbance data at 14 specific wavelength to obtain different cellmass in mixcell suspension respectively. It was successfully applied in measuring the concentration of Bacillus Megaterium, Gluconobacter Oxydans and spore of the former in the mentioned fermentation system. The average error was lower than 4 percent.

**Key words** Mixcell, Cell mass analysis method