

基于 Photoshop 和计数软件精准计数平板上菌落的新方法

张哲^{1,2} 杨峰² 李新圃² 罗金印² 刘龙海² 李宏胜^{2*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院 甘肃 兰州 730070)

(2. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所 农业部兽用药物创制重点实验室
甘肃省新兽药工程重点实验室 甘肃 兰州 730050)

关键词: 菌落计数方法, 计数软件, Photoshop

A new counting method for colonies on plating medium based on Photoshop and Counting software

ZHANG Zhe^{1,2} YANG Feng² LI Xin-Pu² LUO Jin-Yin² LIU Long-Hai² LI Hong-Sheng^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

(2. Key Laboratory of New Animal Drug Project of Gansu Province, Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutical Discovery, Ministry of Agriculture, Lanzhou Institute of Animal Husbandry and Pharmaceutical Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730050, China)

Keywords: Colony counting method, Counting software, Photoshop

“菌落总数”是农业、食品、医药卫生等行业进行质量检测的重要指标之一,目前常规的菌落计数方法是肉眼观察平皿逐个计数,需要花费较多的时间和精力^[1-2]。本文推荐一种简便的平板菌落计数方法,经过使用和验证,与目测直接计数法相比,其计数结果更加准确,且效果明显优于菌落自动计数仪计数结果。现将方法介绍如下。

1 原理

利用相机对平板上培养好的菌落进行拍照,通

过 Photoshop 软件对图像进行处理并使用软件中的画笔工具“画掉”图像上的菌落,同时使用鼠标点击计数软件对鼠标点击次数进行统计,即可精确得到平板上菌落数。

2 方法

2.1 样品的制备

将冻存管中保存的无乳链球菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌菌种分别接种到营养肉汤^[3]中,37 °C 培养 16–18 h,镜检无杂菌后,用无菌营养肉汤连

Foundation item: National Science & Technology Pillar Program during the 12th Five-year Plan Period (No. 2012BAD12B03); Science & Technology Pillar Program of Gansu (No. 144NKCA240); Agricultural Science & Technology Innovation Project of Gansu (No. GNCX-2013-59); Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences

***Corresponding author:** Tel: 86-931-2164183; Fax: 86-931-2114180; E-mail: myslhs@163.com

Received: January 27, 2016; **Accepted:** April 12, 2016; **Published online** (www.cnki.net): April 14, 2016

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(No. 2012BAD12B03); 甘肃省科技支撑计划项目(No. 144NKCA240); 甘肃省农业科技创新项目(No. GNCX-2013-59); 中国农业科学院创新工程项目

***通讯作者:** Tel: 86-931-2164183; Fax: 86-931-2114180; E-mail: myslhs@163.com

收稿日期: 2016-01-27; **接受日期:** 2016-04-12; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-04-14

续做 10 倍稀释至 10^{-7} 。为获得更多的可用平板样本, 选择不同的稀释倍数, 每个稀释梯度分别吸取 100 μL 和 200 μL 至琼脂表面上, 用接种环涂布均匀。待菌液全部吸干后, 倒置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 18–20 h, 取出进行菌落计数。

2.2 菌落数量的测定

2.2.1 软件计数法(图 1): (1) 图像采集: 将已培养好待计数的平板培养基正置于平面上, 打开平板上盖, 将相机置于培养基正上方的合适位置进行拍摄, 得到菌落照片(图 2)。

(2) 图像处理: 利用 PS 软件对步骤 1 采集得到的图片处理, 首先利用裁剪工具将图片裁剪到合适大小, 然后利用色阶功能提高图片对比度, 使得培养基中的菌落更易观察(图 3)。

(3) 菌落计数: 将 PS 软件中的画笔工具调节到合适大小, 在图片中有菌落的地方进行点击以“画掉”或“画上”菌落, 图片中每个菌落只能且必需点击一次, 同时打开鼠标点击计数软件对鼠标点击次数进行统计, 即得到平板上单菌落的总个数(图 4)。

2.2.2 菌落计数仪计数法: 试验用菌落计数仪有自动计数及手动计数两种功能, 分别使用两种方式对平板上的菌落进行计数, 每个平板重复计数 1 次。

2.2.3 目测直接计数法: 取出培养好的平板, 肉眼直接观察计数, 并使用记号笔进行逐个标记, 必要时使用放大镜辅助观察, 每个平板重复计数 1 次。

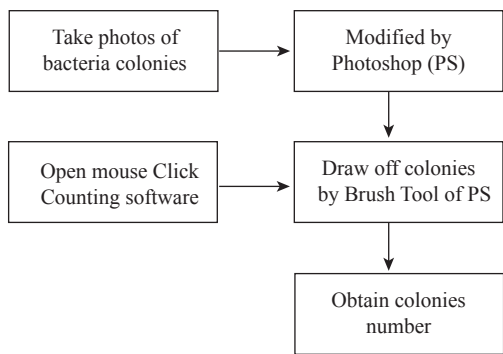


图 1 软件计数法流程图
Figure 1 Flowchart of counting method by software

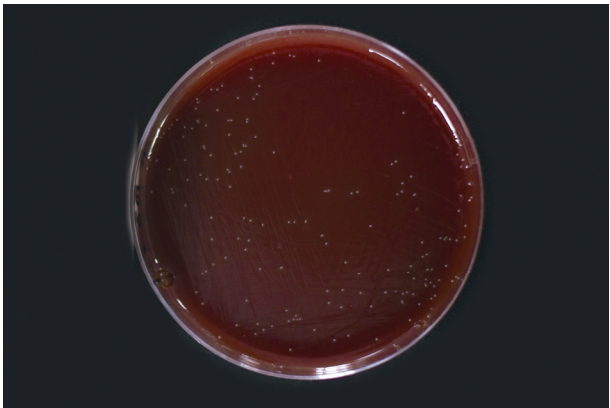


图 2 大肠杆菌在血平板上的菌落图像
Figure 2 Picture of *E. coli* on blood plate

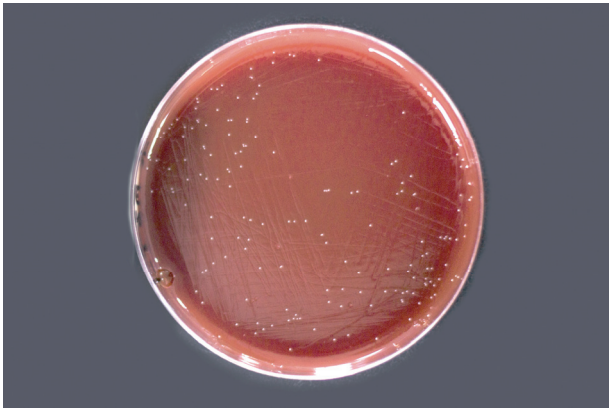


图 3 经 PS 处理后的菌落图像
Figure 3 Pictures of *E. coli* colonies after PS

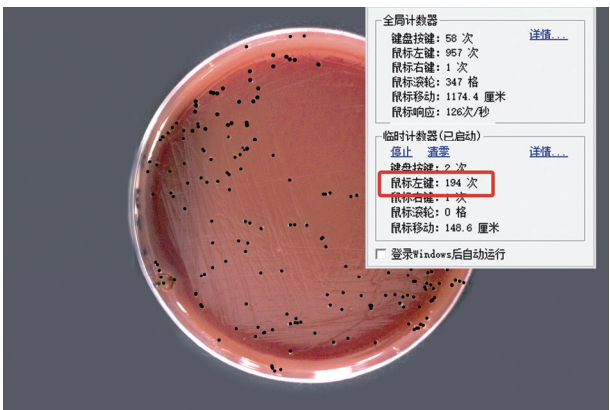


图 4 菌落计数结果
Figure 4 Results of colonies counting

3 结果

分别使用3种不同的计数方法对平板上的菌落进行计数,结果表明,菌落计数仪手动计数结果与目测直接计数结果基本相符,但该仪器自动计数结果与目测计数结果相差较大。在对平板菌落进行目测计数时,出现2次明显计数错误结果。本实验所建立的方法计数结果与目测直接计数结果基本一致,且未出现明显计数错误。比较不同计数方法对同一平板菌落的两次计数结果,本实验计数方法计数结果重复性最高,其次是目测直接计数法,菌落自动计数仪计数结果重复性最差。

4 软件计数法优点

软件计数法(即本实验的方法)能够快速、精确地计数平板上的菌落。与菌落计数仪方法相比,不需要购买昂贵的仪器(试验中所用相机也可以用手机替代,Photoshop 软件可用电脑自带的画图软件代替),且计数结果准确;与目测直接计数法相比,计数结果差异不显著($P>0.05$),并且计数通过软件进行记录,基本可以避免因人为数错而造成的误

差;此外,该方法可在 Photoshop 中对图像进一步处理,使得菌落更加明显、易读,不容易被漏数。然而该方法也存在不足之处,如果菌落颜色与平板上气泡颜色差异不大,易造成误判(气泡被误认为菌落),还需进一步的试验以寻找改进的方法。

该方法可用于平板菌落的计数,具有操作简便、测量成本低、测量结果精准度高以及适用面广等优点,并且当平板上的菌落大于300而小于800时,该方法仍可较准确地进行计数,在日常检测中有推广应用的潜力。

参考文献

- [1] Li H. Improved method for colonies counting[J]. Bulletin of Biology, 2006, 41(1): 51 (in Chinese)
李华. 平板菌落计数的改进方法[J]. 生物学通报, 2006, 41(1): 51
- [2] Zheng XY. Design and implement of portable intelligent colony counting system[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2012 (in Chinese)
郑晓悦. 便携式菌落智能计数系统的设计和实现[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2012
- [3] Quan GJ, Lei XY. Experiment guidance of microbiology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 19 (in Chinese)
全桂静, 雷晓燕. 微生物学实验指导[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 19