

技术与方法

一种快速的活菌计数新方法研究*

魏鸿刚 李元广** 刘健 沈国敏 武济民

(华东理工大学海洋生化工程研究所生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

摘要: 四唑盐 (MTT) 比色法是一种检测动物细胞活细胞数的方法。通过改变比色反应温度、反应时间和比色波长, 建立了一种快速、准确的活菌计数新方法并将其应用于细菌 PBW1 培养过程中活菌浓度的测定。结果表明, 新方法 with 平板稀释法的测定结果一致, 且具有快速、方便等优点。

关键词: 四唑盐比色法, 活菌计数

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 02-0089-05

STUDIES ON A NEW METHOD FOR COUNTING LIVING BACTERIAL CELL NUMBER

WEI Hong-Gang LI Yuan-Guang LIU Jian SHENG Guo-Min WU Ji-Min

(Marine Bioprocess Engineering Institute, State Key Laboratory of Bioreactor Engineering,
East China University of Science & Technology, Shanghai 200237)

Abstract: MTT Colorimetric method is usually applied for measuring the living animal cell number. By changing the reaction temperature and the reaction time as well as the colorimetric wavelength, the improved MTT colorimetric method was established to count the living bacterial cell number. This new method was used to measure the living cell concentration in the process of culturing bacteria PBW1. The results measured by the improved MTT colorimetric method and dilute plate method are similar. Compared with other methods including the dilute plate method, the improved MTT colorimetric method has many advantages such as accuracy, quickness.

Key words: MTT Colorimetric method, Bacterial cell counting

细菌活体及其代谢产物在工农业生产尤其在新兴的微生物农药和微生物肥料研究、生产中具有广泛的应用。活菌计数是非常重要的, 其测定方法有平板稀释法、MPN法、血球板计数法、自动菌数测定仪法、浊度法、菌体干重法等^[1]。但这些方法都有优缺点, 如耗时长、不能及时反映菌体生长情况、不能区分细胞死活、受培养基成分和代谢产物性质影响等。因此有必要探索一种能克服上述不足的活菌计数的方法。

四唑盐是一种能接受氢原子的染料, 化学名为 3-(4, 5-二甲基噁唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐, 商品名为噻唑蓝, 简称 MTT。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 的四唑环还原为难溶性的蓝紫色结晶物甲臜 (Formazan), 而死细胞无此作用。用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解此蓝紫色结晶物, 该溶液在一定波长下的光吸收值可间接反映活细胞数量^[2,3]。在一定细胞浓度范围内, 光吸收值与活细胞数成正比。MTT

* 上海市教育委员会重点学科研究资助项目

** 通讯联系人

收稿日期: 2001-04-09, 修回日期: 2001-09-09

法具有工作量小、操作简便、快速、重复性好等优点，该方法已广泛应用于动物细胞的活细胞计数、生物因子的活性检测、抗肿瘤药物的大规模筛选、细胞毒性试验等^[2,3]。迄今，MTT 法在微生物活菌数测定方面的应用却未见报道。笔者在利用细菌 PBW1^[4]开发微生物农药和微生物肥料过程中，需大量测定 PBW1 活菌数。由于 PBW1 培养基中含有较多的固型物，因而只能使用平板稀释法测活菌数，但工作量大、耗时长。故尝试对文献中现有的用于动物细胞活细胞计数的 MTT 法进行改进，使其能用于活菌计数。以期为细菌活菌数测定提供一种快速准确的新方法。本文对此研究结果进行报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种：试验用细菌为 PBW1。

1.1.2 试剂：MTT 溶液配制^[5]：称取 100mg MTT (AMRESCO 分装) 于小烧杯中，加 20mLPBS (0.01mol/L, pH7.4)，使其充分溶解，用 0.22 μ m 的微孔过滤器除菌，分装，4℃保存。两周内使用有效。二甲基亚砜 (DMSO)：AR (上海菲达工贸有限公司和桥分公司)。

1.1.3 仪器：752 紫外分光光度计 (上海第三分析仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 PBW1 的培养方法：PBW1 的培养在 500mL 摇瓶中进行，具体培养方法见文献 [4]。

1.2.2 发酵液处理：取发酵液，用无菌生理盐水稀释适当倍数，供活菌计数。

1.2.3 MTT 比色试验：0.3mL MTT 溶液加到 3mL 经适当稀释的发酵液中，混匀后 30℃ 下放置 2h，在 10,000r/min 下离心 10min，弃去上清液，加 2.5mL DMSO 充分溶解沉淀，在 525nm 下测其光吸收值。

1.2.4 活菌计数：平板稀释法^[1]。

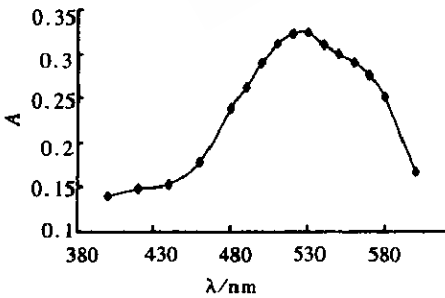


图 1 甲臞溶于 DMSO 中的光吸收

结果与分析

2.1 MTT 法中甲臞的光吸收值随波长变化情况

MTT 法中的显色物为 MTT 和琥珀酸脱氢酶反应生成的产物甲臞。将甲臞溶于 DMSO 后，在 400nm ~ 600nm 范围内测定光吸收值 (见图 1)，其最大吸收峰在 520nm ~ 530nm 处，故将 525nm 定为检测波长。这与文献报道的用于动物细胞测定时波长取 490nm^[6]有差别。

2.2 干扰物对测定结果的影响

以 DMSO 为参比，无菌生理盐水、无菌空白培养基、发酵上清液 (10,000r/min 离心后，吸取上清液) 和死菌体 (沸水浴 30min) 作为待测样，用 MTT 法测得的光吸收值见表 1。由该表可知，这些物质对测定结果干扰很小。由此可见，MTT 法是与活菌量有关，而与培养基中所含固型物以及代谢产物的性质无关，这在很大程度上解决了由于培养基含有固型物而给用浊度法与菌体干重法测活菌带来的严重干扰。

表1 不同物质为空白对照时的吸收值

	DMSO	无菌水	空白培养基	发酵清液	死菌体
A_{525nm}	0.000	0.000	0.002	0.006	0.003

2.3 不同菌龄对 MTT 法的影响

MTT 法的原理是琥珀酸脱氢酶作为还原剂参与氧化还原反应。故显色物甲臜的生成量不仅和参与反应的 MTT 量有关,而且与琥珀酸脱氢酶的量及其活性有关。该方法中,MTT 是过量的,琥珀酸脱氢酶量及其活性是由待测样品中的活菌数的量、菌体内琥珀酸脱氢酶的量及其酶活性等因素所决定,由于活菌体内的琥珀酸脱氢酶的量及其活性在培养过程中可能有变化。故需考察菌体处于不同生长阶段时对 MTT 法的测定结果是否有显著影响。表 2 给出了 500mL 摇瓶中 PBW1 培养过程不同阶段培养液中活菌浓度 X (10^8 个/mL) 与用 MTT 法测得的吸光值 (A_{525}) 之间实验结果,且每个实验 3 次重复。

从表 2 可见,当菌体处于不同生长阶段时,MTT 法测得的 A_{525} 都与 X 呈线性相关。表 2 所示的 500mL 摇瓶中 PBW1 培养过程活菌浓度用 MTT 法测得的 15 组数据的方差分析结果列于表 3。

表 2 不同生长阶段时 PBW1 光吸收值与菌体浓度关系

不同时期线性关系式	对数生长期前期 (12h)	对数生长期后期 (24h)	稳定生长期前期 (36h)	稳定生长期 (48h)	稳定生长期后期 (60h)
LR-1	$X = 1.6609A$	$X = 1.5254A$	$X = 1.4544A$	$X = 1.5128A$	$X = 1.4535A$
LR-2	$X = 1.5027A$	$X = 1.2027A$	$X = 1.1955A$	$X = 1.6554A$	$X = 1.4892A$
LR-3	$X = 1.6462A$	$X = 1.4585A$	$X = 1.4024A$	$X = 1.6247A$	$X = 1.3135A$
TLR	$X = 1.5989A$	$X = 1.3681A$	$X = 1.3396A$	$X = 1.5934A$	$X = 1.413A$
Total r	0.998	0.982	0.993	0.994	0.996

注: LR 线性关系, TLR 总线性关系, 总线性关系式由同时期的 3 组数据作总体线性回归而得到

表 3 PBW1 培养过程中活菌浓度 MTT 法所测结果的方差分析

$SS_{总}$	$SS_{间}$	S_2^2	$SS_{内}$	S_2^1	$F = S_2^2/S_2^1$	$F_{0.05}(5-1, 5 \times (3-1))$
0.362	0.1696	0.0424	0.1924	0.01924	2.204	3.48

注: $SS_{总}$: 总偏差平方和, $SS_{间}$: 不同时期之间偏差平方和, S_2^2 : 不同时期之间的方差, $SS_{内}$: 同一时期内各平行实验偏差平方和, S_2^1 : 同一时期内各平行实验的方差, F : 检验方差

由于 $F < F_{0.05}$, 故差异不显著。这表明 X 与 A_{525} 之间的线性关系式的斜率与菌龄关系不大, 即 MTT 法可用于 PBW1 培养过程中活菌浓度的测定。

2.4 光吸收值与菌数的关系

由于线性关系式的斜率与菌龄关系不大, 故用稀释平板法所测活菌浓度 X (10^8 个/mL) 对光吸收值 A_{525} 作线性回归, 得到一直线关系, 如图 2 所示:

$$X = 1.4027A_{525} \quad (1)$$

当待测样品中活菌体浓度在 1×10^7 个/mL ~ 1.4×10^8 个/mL 范围内时, 光吸收值与待测样品中的活菌浓度之间的线性关系较好, 其相关系数 r 为 0.983。

设 N 为原发酵液中活菌浓度 (10^8 个/mL), n 为稀释倍数, 有:

$$N = 1.4027nA_{525} \quad (2)$$

故可用 (2) 式来表示 PBW1 培养过程中培养液中活菌浓度 N 与 MTT 法测得的 A_{525}

之间的定量关系。

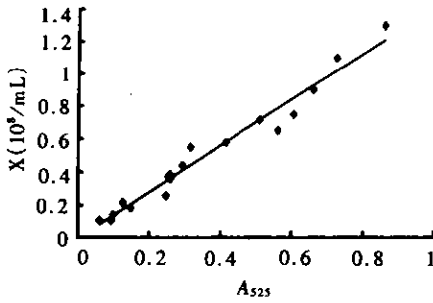


图2 光吸收值 A_{525} 与菌数 X 关系图

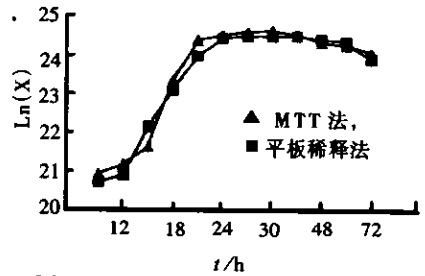


图3 MTT法与平板稀释法测菌体生长曲线

2.5 MTT法与平板稀释法的一致性

分别用 MTT 法与平板稀释法对 PBW1 生长过程中培养液中活菌浓度进行跟踪，其结果见图 3。由该图可见，在延滞期，由于菌数较低，故 MTT 法所测菌数波动较大。在此后的菌体生长过程中，MTT 法与平板稀释法所测菌数基本一致。

3 讨论

3.1 MTT 法改进处

本文所建立的用于细菌活菌计数的 MTT 法与文献中已有的用于动物细胞活细胞数测定方法^[5,6]相比，用于细菌活菌数测得的 MTT 法的改进之处有以下 3 点：(1) 酶与 MTT 反应温度变为 30℃，这是细菌 PBW1 生长的最适温度，对于不同的细菌，这个温度可能会有所变动。而动物细胞培养中一般为 37℃。(2) PBW1 活菌数测定中反应时间为 2h，这比动物细胞数测定中的 4h 减少 1 倍。(3) MTT 法用于细菌 PBW1 测定的比色波长为 525nm，而 MTT 法用于动物细胞活细胞数测定中的波长为 490nm。

3.2 MTT 法与现有各种活菌计数法之比较

目前细菌计数的方法主要有平板稀释法、MPN 法、血球板计数法、自动菌数测定仪法、浊度法、菌体干重法等^[1]。前面四种方法是直接计数法，后面两种是间接计数法。与 MTT 法相比，其优缺点分别见表 4。

表 4 不同细菌计数方法的优劣之比较

	优点	缺点
MTT 法	快速简便, 工作量小, 结果准确, 且不受培养基及代谢产物性质的影响	在接种后菌体浓度较低的一段时间内, 误差较大
平板稀释法	直接、准确	工作量大、耗时长, 不能及时反映菌体生长情况
MPN 法	可用于某些特殊微生物的测定	要求较高, 耗时较长, 且不够精确
血球板计数法	快速、直接	误差大, 且不能区分细胞死活
自动菌数测定仪法	快速、直接	只识别颗粒, 而不能区分是否是细胞及其死活
浊度法	快速	受培养基中固型物及代谢产物性质的影响, 并且菌体沉降不能太快
菌体干重法	快速	受培养基固型物及代谢产物性质影响, 且不能区别细胞死活

由于 PBW1 所用培养基中含有较多的固型物，如酵母粉、淀粉、碳酸钙等，故给浊度法、自动菌数测定仪法及菌体干重法测菌数带来很大的干扰。此外，血球板计数法

准确度较差,因此这些方法在 PBW1 培养过程中均难以应用。平板稀释法虽然可较准确地测定活菌数,但其工作量大,耗时长(一般需 24h),不能及时反映菌体生长情况。MTT 法由于只受单位体积内活菌数的影响,故结果准确,并且此法快速(需 2h)。且不受培养基及代谢产物性质的影响,故 MTT 法是一种细菌活菌数测定的好方法,值得进一步推广与应用。

3.3 MTT 法适用条件

MTT 法应用时有一个重要的前提条件,那就是假设单个菌体所含琥珀酸脱氢酶量及其酶活是一定的,并且在细菌的不同生长阶段基本维持不变。对于不同的细菌,单个菌体所含酶量可能会有所变化,这将导致回归直线的斜率会有所不同。故本文所建立的用于细菌活菌数测定的 MTT 法是否适用于其它细菌的活菌数测定,有待进一步研究。

致谢 本文在整理过程中得到上海创基生物技术公司陆德如教授的指导和帮助

参 考 文 献

- [1] 马绪荣,苏德模. 药品微生物学检测手册. 北京: 科学出版社出版. 2000, 70-74.
- [2] Mosmann T. *J Immun. Meth*, 1983, 65 (1): 55-57.
- [3] Carmichael J. *Cancer Res*, 1987, 47 (4): 936-939.
- [4] 杜云建,李元广. 无锡轻工业大学学报, 1999, 18 (6): 92-95.
- [5] 司徒镇强. 细胞培养. 北京: 世界图书出版社, 1996, 186-187.
- [6] 钱江潮,魏东芝,陈笑岚,等. 华东理工大学学报, 2000, 26 (1): 103-106.