

壳聚糖生物降解研究中菌数统计的新方法^{*}

尹鸿翔 张 杰 侯若彤 杨志荣

(四川大学生命科学学院, 成都, 610064)

TQ92 A

摘 要 噻唑兰法主要用于动物细胞的生物学及医学研究。文中尝试对该方法进行改进, 以建立一种适用于在含壳聚糖不溶物的发酵液中菌数统计的新方法。对实验数据的数理统计分析表明, 原方法改进后完全适用, 且具有简单、准确的优点。有希望应用于食品发酵、卫生检疫方面的科研、生产。

关键词 菌数统计, 噻唑兰法, 方差分析, 回归关系

壳聚糖是自然界中含量仅次于纤维素的生物高分子, 被称为第六生命元素。其降解产物氨基寡糖素具有改良肠道微生物区系的良好人体微生态效应, 因而可用做食品添加剂和保健品。本实验室在进行壳聚糖生物降解菌 CHI1 的研究中需要做活菌计数。

细菌活体数量是食品卫生、发酵工业以及医学检疫等方面科研生产的重要指标, 众所周知, 活菌计数在食品卫生、发酵工业以及医学检疫等方面具有重要意义。常用的方法有血球板计数法、浊度法、菌体干重法、平板稀释法以及 MPN 法、流式细胞计数仪法, 在动物细胞和医学生物学研究中还有染料排斥法和掺入同位素的释放法。这些方法各有特点, 但是也存在或耗时长、或准确性低、或需特殊仪器、不能区分细胞死活、易受其他因素制约等缺点。1983 年, Mosman 首创了噻唑兰(MTT)比色分析法^[1], 该方法是一种间接测定方法。其基本原理是活细胞线粒体琥珀酸脱氢酶可将淡黄色的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物甲 蓝(formazan), 而死细胞无此功能, 用二甲亚砜(DMSO)溶解结晶物^[5], 溶液用紫外分光光度计测定在 550 nm 紫外光的 OD 值, 在适宜的细胞浓度范围内, OD 值与活细胞的数量成正比。该方法操作简便, 耗时少, 结果准确。笔者结合本实

验的特点将其加以改进, 尝试建立一种适用于发酵工业中活菌计数的新方法。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 壳聚糖液体培养基

取胶状壳聚糖 12.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, KH_2PO_4 1.36 g, NH_4NO_3 0.57 g, 酵母膏 0.25 g, H_2O 1000 mL, pH 8.0。

1.1.2 试 剂

PBS 缓冲液(pH 7.2): 将 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na_2HPO_4 , 0.24 g KH_2PO_4 溶于 800 mL 蒸馏水中, 用 HCl 调节 pH 至 7.2, 加水定容至 1 L, $1.034 \times 10^5 \text{ Pa}$ 高压蒸汽灭菌 20 min, 室温保存。

MTT, 购自上海生工生物工程有限公司(AMRESCO 分装), 称取 100 mg 于小烧杯中, 加入 20 mL PBS (0.01 mol/L, pH 7.2) 溶解, 用 0.22 μm 的微孔过滤器除菌, 分装于 1.5 mL EP 管中, 4℃ 保存。

二甲亚砜(DMSO): 分析纯, 购自成都化学试剂公司, 使用前用 10% 碱性甘氨酸缓冲液调至 pH 10.5^[2]。

1.1.3 仪 器

TU-1800 紫外分光光度计(北京通用普析仪器有限公司); Eppendorf Centrifuge

第一作者: 硕士研究生(杨志荣教授为本文通讯作者)。

* 863 计划项目资助(No. 2001AA214061)

收稿时间: 2003-06-07

5415R 低温离心机。

1.2 方法

1.2.1 供试菌液

在 250 mL 三角瓶中装 50 mL 壳聚糖液体培养基,按体积比 1/1 000 接种,于 33℃,180 r/min 摇床培养 48 h。

1.2.2 预试验

目的是论证原方法用于本实验的可行性;建立具体的操作方法;检测主要影响因素;确定菌体浓度和直接数据之间的回归关系,以便基于直接数据迅速得出结果。

(1) 确定适用的菌体浓度范围

取培养 48 h 的原菌液,用无菌生理盐水稀释至 2.87、2.30、1.53、1.15、0.92、0.77、0.58、0.46、0.38、0.29 ($\times 10^8$ 个/mL) 共 10 个菌体浓度水平,终体积均为 1 000 μ L,装于

1.5 mL EP 管中。然后每管加入 100 μ L 的 MTT 溶液,33℃ 放置 4 h(不同菌种因其活性不同而反应时间也不一样)。13 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,每管加 1.5 mL DM-SO 充分溶解沉淀,轻微振荡使溶液混匀,转移至 5 mm 比色皿中测定 550 nm 的 OD 值。菌数统计采用稀释平板法。

(2) 确定适当的培养时间范围

以菌种培养时间为可变因素,不同培养时间为不同水平,菌液均适当稀释,操作同 1.2.2 节的(1)步骤。

对所有水平均进行 3 次平行试验平行 3 次,对试验结果做统计分析,完成预试验的目的。背景对照:分别设定无菌体培养基和无 MTT 两组对照,以消除背景干扰(表 1)。

表 1 背景对照结果

稀释度/倍	8	10	15	20	25	30	40	50	60	80
浓度 $\times 10^8$ 个 \cdot mL ⁻¹	2.87	2.30	1.53	1.15	0.92	0.77	0.58	0.46	0.38	0.29
培养液背景 OD 值	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.002	0.001
MTT 背景 OD 值(3 次平均值)	0.027									

2 结果与分析

2.1 MTT 法中产物甲莖在碱性 DMSO 溶剂中的光吸收值

甲莖的 DMSO 溶液呈蓝紫色,有文献报道其吸收峰在 570 nm 处^[4],也有报道在 560 nm 处^[2]。考虑到实验的具体影响因素不同,需具体测定实验中甲莖溶液的吸收光谱。扫描范围为 450~650 nm,结果见图 1。由图 1 结果可知,吸收峰位于 550 nm 处。

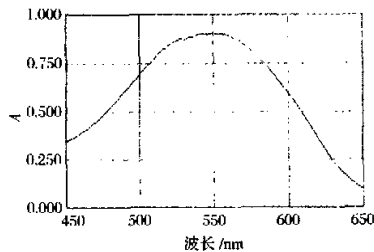


图 1 甲莖溶液的吸收光谱图

2.2 设立空白对照的必要性

根据报道,MTT 可与 DMSO 发生反应,产物会增加背景,降低灵敏度^[4]。所以笔者采用了无菌培养基做对照,测量 MTT 残留对于结果的干扰。同时用 100 μ L 无菌水代替 MTT 做另一对照,测量培养液中固形物、菌体及其产物对于结果的干扰。通过消除残留 MTT 和培养液本身的干扰,可得到较为准确的 OD_{550nm} 值。

由结果可见,MTT 残留的干扰是主要的影响因素,而培养液的干扰很小。后者也说明 MTT 法不受培养基中固形物及其他杂质的影响,只与活菌数量及甲莖生成量有关。这也是该方法较为明显的优势之一。

2.3 预试验结果及分析

2.3.1 稀释平板法

通过稀释平板法作活菌计数,测得原菌液浓度为 2.3×10^9 个/mL,各稀释度的菌体浓度均由此算得。

2.3.2 各浓度水平的 OD_{550nm} 值(表 2)

表 2 各浓度的 OD_{550nm} 值(原始数据)

浓度 $\times 10^8/\text{个} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.87	2.30	1.53	1.15	0.92	0.77	0.58	0.46	0.38	0.29
	1.107	0.852	0.574	0.413	0.345	0.282	0.214	0.194	0.116	0.063
OD 值	1.198	0.834	0.583	0.422	0.346	0.291	0.236	0.165	0.121	0.060
(3 次平行)	1.075	0.846	0.567	0.406	0.347	0.281	0.254	0.180	0.118	0.065
平均值	1.097	0.844	0.575	0.414	0.346	0.285	0.235	0.180	0.118	0.063

MTT 法是一种间接测定方法,实际 OD_{550nm} 值是否符合理论预期在各种菌体浓度下都与菌体浓度呈线性相关,即不同浓度是否对于线性关系有显著影响?这需要对数据作统计分析加以确认。

表 3 数据的 F 检验

SS _t	SS _b	SS _w	Sl ²	Sw ²	df ₁	df ₂	F	F _{0.05} (df ₁ , df ₂)
126.21	122.49	3.72	12.25	0.17	9	20	25.95	2.39

注:SS_t为总离差平方和;SS_b为不同浓度之间的离差平方和;SS_w为同一浓度各平行试验的离差平方和;Sl²为不同浓度之间的方差;Sw²为同一浓度各平行试验的方差;df 为自由度;F 为检验方差。

由表 3 可见 $F > F_{0.05}(df_1, df_2)$, 所以假定不成立,上述浓度水平对于线性关系影响显著,整体上不适合 MTT 法的使用,应对所有数据作 Q 检验(Q-test),排除影响显著的浓度水平,以得到适宜的浓度水平区间,结果见表 4。

表 4 数据的 Q 检验

Q _{0.05}	D 值	被排除的有显著影响的	
(10, 20)	(否定域限定值)	浓度水平($\times 10^8/\text{个} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
5.01	1.238	0.38	0.29

表 5 数据的二次 F 检验

SS _t	SS _b	SS _w	Sl ²	Sw ²	df ₁	df ₂	F	F _{0.05} (df ₁ , df ₂)
6.10	2.52	3.58	0.36	0.22	7	16	1.61	2.66

注:同表 3。

2.3.4 适当培养时间的确定

随着培养时间的不同,细胞的活性和琥珀酸脱氢酶的活力有可能变化,这将导致生成甲基的量变化,因而需检验培养时间是否

2.3.3 结果的单因素方差分析 (analysis of variance of single factor)

假定浓度水平对线性关系无显著影响,由此可将测定数据乘以相应稀释倍数还原为原菌液的 OD_{550nm} 值。然后以浓度水平作单一影响因素,进行方差分析,结果见表 3。

因为 0.38、0.29 所对应的 OD_{550nm} 值在参与两两比较时结果都 $> D$ 值,所以首先被排除。然后对余下数据作二次方差分析,结果见表 5。可知 $F < F_{0.05}(df_1, df_2)$, 假定成立,即浓度水平对于线性关系影响不显著,适合 MTT 法的使用。所以在本实验中浓度 $\geq 0.46 \times 10^8$ 个/mL 是 MTT 法的适用菌体浓度范围。低于该浓度,菌体浓度与其 OD_{550nm} 值的线性关系明显减弱,方法不再可用。

对于菌体浓度和 OD_{550nm} 值的线性关系有显著影响。假设无显著影响,对结果作单因素方差分析,分析步骤同 2.3.3。结果见表 6,表 7,数据分析见表 8。

表 6 各培养时间稀释菌液的 OD_{500nm} 值

培养时间/h	12	24	36	48	60	72
待测稀释菌液浓度(10^8 个/ml)	0.065	0.18	0.651	0.809	0.663	0.426
OD 值(三次平行)	1	0.041	0.064	0.247	0.300	0.161
	2	0.038	0.069	0.241	0.310	0.152
	3	0.042	0.070	0.251	0.308	0.171
平均值	0.040	0.068	0.246	0.306	0.251	0.161

根据假设的线性关系, 计算了各培养时间稀释菌液 OD_{550nm} 值与菌液浓度的比值, 见表 7。

表 7 各培养时间 OD_{550nm} 值与稀释菌液浓度的比值

培养时间/h		12	24	36	48	60	72
稀释菌液浓度与 相应 OD 值的比值	1	1.585	2.813	2.636	2.697	2.652	2.646
	2	1.711	2.609	2.701	2.610	2.717	2.803
	3	1.548	2.571	2.594	2.627	2.560	2.491
平均值		1.615	2.664	2.643	2.644	2.643	2.647

表 8 数据的 F 检验

SS _t	SS _b	SS _w	Sb ₂	Sw ₂	df ₁	df ₂	F	F _{0.05} (df ₁ , df ₂)
0.106	0.001	0.105	0.0002	0.01	4	10	0.023	3.48

可见 $F < F_{0.05}(df_1, df_2)$, 假定成立, 即除了在延滞期 ($< 12h$) 因菌体浓度太小而不适用于本方法外, 其余时间水平对线性关系无显著影响 ($P < 0.05$)。

2.3.5 OD_{550nm} 值与菌体浓度 C 的回归关系

由 2.3.3 可知, 菌体浓度范围在 $\geq 0.46 \times 10^8$ 个/mL 时与 OD_{550nm} 值的线性关系明显, 二者的相关系数 $r = 0.999$ 。由于试验中一般要对原菌液稀释, 所以设稀释倍数为 N , 得回归关系:

$C = 2.645 \times N \times OD_{550nm}$ ($OD_{550nm} \geq 0.180$), 菌种不同时关系系数及 OD_{550nm} 取值下限相应变化, 所以, 该关系式具有菌种特异性。

2.4 MTT 法所需时间

根据本方法的具体操作, 所需时间主要

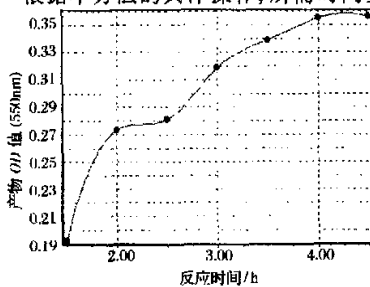


图 2 MTT 法操作时所需时间
(取样时间间隔 0.5h)

由平均值可见, 12h 的比值相对于其他时间的比值偏差明显, 所以可直接排除, 而剩余数据仍需作 F 检验, 见表 8。

是加入 MTT 液后的反应时间, 它将根据菌种的不同而变化, 本实验中为 4 h, 其依据见图 2。

由图示结果可知, 当反应时间超过 4 h 后, OD_{550nm} 值不再升高, 反应完全。所以测定 4 h 的 OD_{550nm} 值是可靠的。正式的测定中, 整套操作从取出待测样品到利用回归关系得到结果可以在 5 h 内完成。

3 讨论

(1) MTT 法作为一种间接测定方法, 其使用的前提在于建立待测菌种的直接数据与菌体浓度之间的回归关系或标准曲线(预试验中已经完成); 使用的关键在于待测菌液的浓度必须调整到适用范围之内。而适用浓度下限存在的原因在于整套方法本身的灵敏度, 当菌体数量太低时, 由于系统误差造成的数据偏差相对于测定结果已经非常显著, 因而线性关系弱化, 方法不再适用。扩大 MTT 法的适用菌体浓度范围的办法在于提高操作的精确性, 采用更加精密和灵敏的仪器, 尽量减小系统误差。但是, 这样也会抬高 MTT 法的使用条件, 影响其推广。实际上, 文中所建立的 MTT 法, 对于一般的微生物学实验和食品、发酵工业生产已经具有良好的可靠性和实用性, 这在笔者相关的工作中得到了验证。

(2) MTT 法的优势明显, 耗时少 $\leq 5h$,

而稀释平板法一般 ≥ 24 h且工作量大;易操作,不需特殊仪器(相对于流式细胞计数仪法和掺入同位素释放法);结果准确可靠,而血球板计数法易受主观影响,误差大^[3]。特别是不受培养基中固形物的影响,且只与活菌数有关,浊度法和菌体干重法受此限制,而大部分其他方法无法区分菌体死活。近年来,其衍生方法即XTT法和MTS法更加强化了以上优点^[6],但所用试剂价格偏高,MTT法相对经济。笔者认为,MTT法不仅适用于动物细胞学研究和医学试验,也可以推广至食品生产、卫生检验及微生物学试验中。

参 考 文 献

- 1 Mosman T. J Immunol Meth, 1983, 65(1): 55~57
- 2 郑 耘, 杨善民, 颜江华等. 福建医学院学报, 1995, 6, 29(2): 195~198
- 3 郝新保, 张利朝, 段缨等. 第四军医大学学报, 1997, 18(4): 390
- 4 郭于川, 王元正, 蒋 英等. 泸州医学院学报, 1996, 19(3): 189~191
- 5 彭 涛, 刘晓波, 田伏洲等. 中国免疫学杂志, 1999, 15: 180
- 6 宋锦平, 钟 萍, 汪 涛等. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(3): 292~295
- 7 Brian Williams. Biostatistics, London: Chapman & Hall, 1993

A New Method for Count of Living Cell Number in the Research on Biodegradation of Chitosan

Yin Hongxiang Zhang Jie Hou Ruotong Yang Zhirong

(Faculty of Life Science of Sichuan University, Chengdu, 610064)

ABSTRACT Thiazoyl blue colorimetric method is wildly used in the human and zoic cell research as well as medical research. In this article, efforts on the innovation of this method for used in the count of living bacteria number in fermented liquor containing undissoluble chitosan has been made. After the work on innovation, the statistic analysis of results showed the innovation of original method was also completely practical and features easy for operation and reliable outcome. It is promising to apply this method in the research and industry of food fermentation and sanitation quarantine.

Key words count of living bacteria number, thiazoyl blue colorimetric method, analysis of variance, regression relation

市场动态

2002年世界啤酒大国产量

据日本麒麟啤酒公司公布的调查结果显示,2002年世界主要国家啤酒产量比2001年增长1.4%,为1440.7亿L。至此,世界主要国家啤酒产量连续18年增长。

产量居第1位的是中国,为235.9亿L,同比增加5.0%。其次为美国,234.6亿L,增加0.7%;德国108.4亿L,减少0.1%;巴西84.1亿L,减少0.5%;俄罗斯70.2亿L,增加12.0%;日本69.9亿L,减少2.8%;墨西哥63.7亿L,增加2.2%;英国56.7亿L,减少0.2%;西班牙27.9亿L,增加0.5%;波兰26.0亿L,增加7.7%。

行业动态

日本三得利集团在上海成立生产开发中心

居全球500强之列的日本三得利集团宣布,在上海成立“三得利中国生产开发中心”,专门研究上海人的口味,以便三得利的啤酒和饮料更加适合上海人的口味。同时,三得利宣布,已斥资数千万元投产纯生啤酒,这也是目前上海首条已投入生产的纯生啤酒生产线。

三得利拟通过生产适合上海人口味的清爽型啤酒,占据上海啤酒市场大部分的份额。2003年1~7月,三得利啤酒的销量预计达到15.9万t,比2002年同期增长10%。