doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2024.04.05

分光光度法与活菌计数法测定副鸡禽杆菌菌液 浓度的相关性研究

佟仁冬^{1,2},冯 妍¹,张一帜¹,任小侠¹,刘 燕¹,朱良全¹,郝力力²,姚文生^{1*} (1.中国兽医药品监察所(农业农村部兽药评审中心),北京 100081;2.西南民族大学畜牧兽医学院,成都 610041) [收稿日期] 2023-11-21 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280 (2024) 04-0034-09 [中图分类号]5852.61

[摘 要] 为建立一种快速测定副鸡禽杆菌菌液浓度的方法,本研究选取副鸡禽杆菌血清 A、B 和 C 型代表性菌株(CVCC254 株、CVCC257 株和 CVCC256 株),培养制备菌液,分别在 450、540、600、650 nm 波长测定其吸光度值(OD 值),同时测定活菌计数值。回归分析两组数据,获取回归方程及标准曲线,分析回归方程的测定系数(R^2)和标准曲线的点线离散度,确定最适测定波长。再选取不同培养时间点(10、12、14、16、18、20 h)的菌液,在最适波长下测定其 OD 值并代入回归方程获取活菌数,同时采用活菌计数法获取活菌计数值,将两组数据使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,进一步验证分光光度法与活菌计数法测定菌液浓度的相关性。结果显示,3 株菌液在 600 nm 波长测定的OD 值与活菌计数值之间均呈最佳的线性关系,确定其菌液浓度最适测定波长均为 600 nm,其回归方程分别为 $y=14.302x-0.1441(R^2=0.9962)$ 、 $y=14.464x-0.2746(R^2=0.995)$ 和 $y=14.681x-0.01326(R^2=0.9989)$,对为活菌计数值(×10 8 CFU/mL),x为 OD₆₀₀值。3 株培养至衰退期前的菌液在 600 nm 波长测定的 OD 值代入回归方程计算获得的活菌数值与其活菌计数值无显著差异(P>0.05)。研究结果表明,衰退期前副鸡禽杆菌菌液的分光光度法与活菌计数法具有良好的相关性。因此,该分光光度法可用于快速测定衰退期前副鸡禽杆菌菌液浓度。

[关键词] 副鸡禽杆菌;菌液浓度;分光光度法;活菌计数法

Study on the Correlation between Spectrophotometric Method and Live Bacterial Count Method for Determining the Concentration of Bacterium Solution of Avibacterium paragallinarum

TONG Ren – $dong^{1,2}$, FENG Yan¹, ZHANG Yi – zhi^1 , REN Xiao – xia^1 , LIU Yan¹, ZHU Liang – $quan^1$, HAO Li – li^2 , YAO Wen – $sheng^{1*}$

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

 $2.\ Animal\ Husbandry\ and\ Veterinary\ College\ of\ Southwest\ University\ for\ National ities\ ,\ Chengdu\ 610041\ , China)$

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFF0711002);中国兽医药品监察所 - 兽药行业公益性重点专项(GY202103,GY202104) 作者简介: 佟仁冬,硕士研究生,从事细菌致病机理研究;冯 妍,与佟仁冬同为第一作者。

通讯作者:姚文生。E - mail: 1196314953@ qq. com

Abstract: In order to establish a rapid method for determining the concentration of *Avibacterium paragallinarum* in liquid form, representative strains of Avibacterium paragallinarum serotypes A, B and C were selected in this study (strains CVCC254, CVCC257 and CVCC256), The viable bacterial count value was determined at the same time. Regression analysis of the two sets of data, obtain the regression equation and the standard curve, analyse the coefficient of determination (R^2) of the regression equation and the dispersion of the point line of the standard curve, and determine the optimal measurement wavelength. Then the bacterial solutions at different incubation time points (10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 18 h, 20 h) were selected, and their OD values were measured at the optimum wavelength and substituted into the regression equation to obtain the number of viable bacteria, the viable bacteria counting method was also used to obtain the viable bacteria count values, and the two sets of data were statistically analysed using SPSS 17.0 software to further validate the correlation between the spectrophotometric method and the viable bacteria counting method to determine the concentration of bacterial fluids. The results showed that there was an optimal linear relationship between the OD values and the viable bacterial count values of the three strains of bacterial fluids measured at 600 nm, and it was determined that the optimal wavelength for the determination of their bacterial concentration was 600 nm for all of them. The regression equations were $\gamma =$ 14. 302x - 0.1441 ($R^2 = 0.9962$), y = 14.464x - 0.2746 ($R^2 = 0.995$), and y = 14.681x - 0.01326 ($R^2 = 0.9962$) 0.9989), respectively, with y as the viable bacteria count value ($\times 108$ CFU/mL) and x is the OD₆₀₀ value. The values of viable bacteria obtained by substituting the OD values of the three strains cultured to the pre - decline stage measured at 600 nm into the regression equation were not significantly different from their viable count values (P > 0.05). The results of the study showed that the spectrophotometric method of pre - decline Avibacterium paragallinarum bacterial fluids correlated well with the viable count method. Therefore, the spectrophotometric method can be used for the rapid determination of the concentration of Avibacterium paragallinarum bacterial fluids before the decline period.

Key words: Avibacterium paragallinarum; bacterial concentration; spectrophotometric method; viable count method

副鸡禽杆菌(Avibacterium paragallinarum, Apg)是一种兼性厌氧的革兰氏阴性菌,Page 氏血清分型为 A、B 和 C型^[1]。Apg 是鸡传染性鼻炎(Infectious coryza,IC)的致病菌,可引起鸡的急性呼吸道疾病,造成育成鸡生长不良和产蛋鸡产蛋明显下降(10%~40%)^[1]。国内外普遍使用副鸡禽杆菌制备的灭活疫苗预防鸡传染性鼻炎,我国已批准鸡传染性鼻炎单价、双价和三价灭活疫苗共计11种,还有新的疫苗在研发中。免疫攻毒法效力检验和动物感染模型研究均需测定感染实验动物攻毒菌液浓度(即活菌数),其中菌液浓度的准确测定是动物感染模型研究和疫苗效力评价的关键环节,目前普遍采用活菌计数法测定菌液浓度^[2]。该方法是测定菌液浓度的经典方法,早在 1979 年就开始应用

于生物制品领域,且此法是细菌生物制品不可缺少的质量检验方法之一,是细菌学研究的重要手段^[3]。如今更是广泛应用于生物制品生产检验和参考品的研究中,其结果直接影响疫苗产品头份数核定的准确性,影响产品安全性和免疫保护效力^[4-6]。该法计数准确性高,常作为其他计数方法的参照,在各个领域广泛应用,同时也在不断被优化和改良。例如,王银环等^[7]通过流式细胞技术和活菌计数法2种方法检测地衣芽孢杆菌活菌制剂中的活菌数和芽孢数,结果表明两方法检测结果无显著差异,得出了流式细胞术有望代替活菌计数法,成为微生态活菌制剂检测的现代新技术。Takano等^[8]在强酸条件下使用琼脂平板和结冷胶平板培养嗜酸性细菌,评估了两种平板在酸性条件

下细菌培养时间和菌落分离平板培养方法的极限范围。但活菌计数法也存在一定局限性,比如对厌氧微生物进行计数就需要将平板置于严格的厌氧培养环境;同时需要将菌液梯度稀释后接种于固体培养基平板,培养 24 h ~ 48 h 形成肉眼可见菌落后进行计数^[9],而细菌在等待计数结果期间一直在生长和死亡,工作中只能凭经验预估接种动物的活菌数,易导致模型研究实验或疫苗效力评价失败,须重新进行实验或评价,浪费时间、精力和动物。

分光光度法是运用分光光度计测定某一物质对特定波长的吸光度来对该物质进行定性或定量分析^[10-11]。因细菌其本身存在荚膜和细胞壁等结构,不同浓度菌液的吸光度值不同,可运用分光光度法测定菌液的吸光度值(OD值)来间接测定其含活菌数^[12]。肖敏等人使用分光光度法在波长450 nm、540 nm、650 nm分别测定金黄色葡萄球菌^[13]、鼠伤寒沙门氏菌^[14]、大肠埃希菌^[15]、副溶血性弧菌^[16]菌液的OD值,与活菌计数值进行回归分析后获得回归方程,建立了OD值与菌液浓度的线性关系,其研究结果表明不同细菌菌液的最适测定波长各不相同,活菌计数值与最适波长下测定的OD值呈良好线性关系。相较于活菌计数法,分光光度法具有时效性优点,可快速测定菌液浓度。

本研究选取副鸡禽杆菌血清 A、B、C 型各一株,适宜条件下培养制备菌液,分别测定其 OD 值和活菌计数值,比较研究两方法的相关性,并通过适应性试验予以验证,以期探索建立一种快速测定副鸡禽杆菌菌液浓度的方法。

1 材料与方法

- 1.1 菌种 副鸡禽杆菌血清 A型 CVCC254 株、副鸡禽杆菌血清 B型 CVCC257 株、副鸡禽杆菌血清 C型 CVCC256 株,均由中国兽医药品监察所引进、鉴定和保存。
- 1.2 培养基及试剂 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (Tryptone Soy Agar, TSA)和胰蛋白胨大豆肉汤培养基(Trypticase Soy Broth, TSB),购自美国 BD 公司;氧化型辅酶 I (NAD),购自上海生工生物工程有限公司;新生鸡血清,购自兰州民海生物工程有限

公司

- 1.3 主要仪器 美国 MD 公司 SpectraMax Plus 384 全波长分光光度计;海尔 HR1500 Ⅱ A2 生物安全柜;SANYO 二氧化碳培养箱。
- 1.4 测试菌液制备
- 1.4.1 细菌培养 将 -80 ℃保存的 3 株副鸡禽杆菌(A型、B型和 C型各 1 株)冻存菌液化冻,在生物安全柜内用灭菌接种环蘸取菌液放入 10 mL 含 5% NAD 和 10%鸡血清的 TSB 传代培养两次后,再在含 5% NAD 和 10%鸡血清的 TSA 平板表面进行连续划线接种,置于 37 ℃、5% CO₂环境下培养 24 h,获得纯化的副鸡禽杆菌。挑取纯化后的单菌落接种于 20 mL 含 5% NAD 和 10%鸡血清的 TSB,置 37 ℃、5% CO₂环境下静置培养 12 h,制备成副鸡禽杆菌液。
- 1.4.2 制备不同稀释梯度菌液 取6支无菌试管并编号1~6,从1至6号分别加入0、1、3、4、4.5、4.75 mL的TSB,再依次添加5、4、2、1、0.5、0.25 mL的副鸡禽杆菌菌液,使每只试管总体积达到5 mL。充分混匀后,配制成稀释梯度为100%、80%、40%、20%、10%、5%的菌液。
- 1.5 测定 OD 值与活菌计数值 从1~6号试管分别取 2 mL 菌悬液,加入比色皿,用 SpectraMax Plus 384 全波长分光光度计分别在波长 450、540、600、650 nm 条件下测定 OD 值,每个样品重复测定 3次,计算平均值,并设置以 TSB 为空白对照。同时,以 50~200个活菌/皿为标准,将 1~6号试管菌液分别用 TSB 系列稀释后,取最大稀释倍数菌液涂布于含 5% NAD 和 10% 鸡血清的 TSA 平板(每个梯度 3 个平板),涂布均匀后放入 37℃、5% CO₂恒温培养箱中培养 24 h后,点数平板上菌落,取 3 个平板菌落数的平均值乘以其对应稀释倍数,获得 1~6号试管菌液的活菌计数值。
- 1.6 回归分析与建立标准曲线 分别将 $1 \sim 6$ 号试管不同波长测得的 OD 值与活菌计数值输入 Microsoft EXCEL 2010 进行回归分析,获得回归方程及其测定系数(R^2),并以 OD 值为 X 坐标,以活菌计数值为 Y 坐标,建立标准曲线。比较分析回归

方程的测定系数(R^2)和标准曲线的点线离散度,确定副鸡禽杆菌菌液的最适测定波长。

1.7 验证 挑取 1.4.1 项纯化的副鸡禽杆菌 CVCC254、CVCC257 和 CVCC256 株单菌落接种于 25 mL 含 5% NAD 和 10% 鸡血清的 TSB,置 37 ℃、5% CO₂环境下培养,分别取培养 10、12、14、16、18、20 h 的菌液,用 SpectraMax Plus 384 全波长分光光 度计在最适测定波长条件下测定 OD 值并代入回

归方程计算对应的菌液活菌数,同时系列稀释后进行活菌计数,将不同培养时间点的两组数据使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,以验证分光光度法的适用性与准确性。

2 结果与分析

2.1 菌液 OD 值和活菌计数结果 副鸡禽杆菌菌液不同稀释梯度在4个波长条件下 OD 值测定结果及活菌计数结果见下表1、表2和表3。

表 1 CVCC254 不同稀释梯度菌液的 OD 值和活菌计数值

Tab 1 OD values and viable counts for different dilution gradient bacterial solution of CVCC254

试管号 Test tube number	稀释梯度/% Dilution gradient -	不同波长下的 OD 值 OD values at different wavelengths				活菌计数值 (×10 ⁸ CFU/mL)
		450 nm	540 nm	600 nm	650 nm	viable count values
1	100%	0.672	0.441	0.377	0.327	5.27
2	80%	0.585	0.383	0.301	0.286	4.01
3	40%	0.303	0.178	0.169	0.135	2. 15
4	20%	0.133	0.101	0.094	0.072	1.02
5	10%	0.063	0.045	0.045	0.035	0.52
6	5%	0.034	0.018	0.022	0.019	0.32

表 2 CVCC257 不同稀释梯度菌液的 OD 值和活菌计数值

Tab 2 OD values and viable count results for different dilution gradient bacterial solution of CVCC257

试管号 Test tube number	稀释梯度/% Dilution gradient -	不同波长下的 OD 值 OD values at different wavelengths				活菌计数值 (×10 ⁸ CFU/mL)
		450 nm	540 nm	600 nm	650 nm	viable count values
1	100%	0.480	0.432	0.391	0.354	5.37
2	80%	0.465	0.371	0.301	0.253	4.04
3	40%	0.264	0.201	0.169	0.163	2.15
4	20%	0.146	0.113	0.099	0.090	0.90
5	10%	0.065	0.060	0.051	0.044	0.53
6	5%	0.038	0.031	0.028	0.023	0.30

表 3 CVCC256 不同稀释梯度菌液的 OD 值和活菌计数值

Tab 3 OD values and viable count results for different dilution gradient bacterial solution of CVCC256

试管号 Test tube number	稀释梯度/% Dilution gradient -	不同波长下的 OD 值 OD values at different wavelengths				活菌计数值 (×10 ⁸ CFU/mL)
		450 nm	540 nm	600 nm	650 nm	viable count values
1	100%	0.778	0.588	0.521	0.437	7.60
2	80%	0.689	0.519	0.410	0.376	5.87
3	40%	0.391	0.267	0.225	0.194	3.00
4	20%	0.177	0.139	0.119	0.103	1.58
5	10%	0.089	0.061	0.057	0.037	0.76
6	5%	0.047	0.031	0.028	0.018	0.36

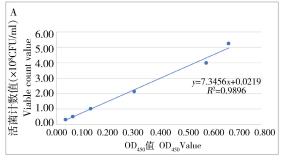
2.2 回归分析结果与标准曲线的建立 分别将表 1、表 2 和表 3 中波长 450、540、600、650 nm 的 OD 值与活菌计数值进行回归分析,获得回归方程(y

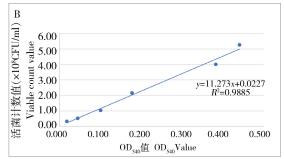
为活菌计数值($\times 10^8$ CFU/mL),x 为 OD 值)及其测定系数 R^2 (表 4)并建立标准曲线(图 1、图 2 和图 3)。

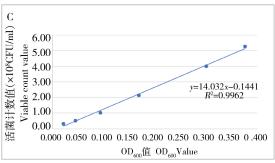
表 4 不同波长测定 CVCC254、CVCC257、CVCC256 菌液的回归方程

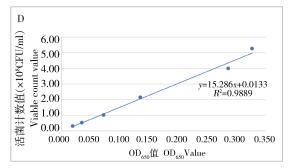
Tab 4 Regression equation for bacterial solutions of CVCC254, CVCC257 and CVCC256 at different wavelengths

菌株号(血清型) Strain number (serotype)	波长 Wavelength	回归方程 Regression Equation	测定系数(R ²) Determined coefficient
	450 nm	y = 7.3456x + 0.0219*	0.9896
CNCC254(A FIL)	540 nm	y = 11.273x + 0.0227	0.9885
CVCC254(A型)	600 nm	y = 14.032x - 0.1441	0.9962
	650 nm	y = 15.286x - 0.0133	0.9889
	450 nm	y = 10.384x - 0.315	0.9533
CVCC257 (D #ll)	540 nm	y = 12.3483x - 0.2612	0.9869
CVCC257(B型)	600 nm	y = 14.295x - 0.2695	0.9954
	650 nm	y = 15.99x - 0.2168	0.9888
	450 nm	y = 9.3243x - 0.1787	0. 9845
CVCC25((C #II))	540 nm	y = 12.335x - 0.1071	0.9898
CVCC256(C型)	600 nm	y = 14.681x - 0.1326	0.9989
	650 nm	y = 16.562x - 0.0225	0.9919





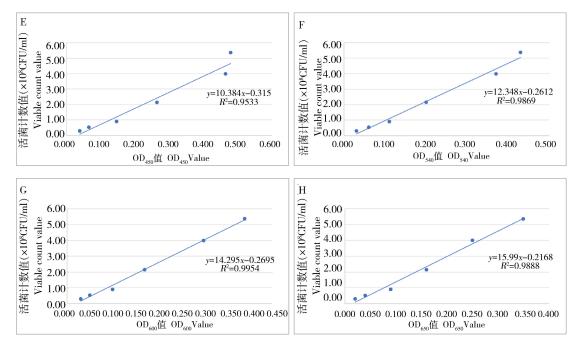




A:450 nm; B:540 nm; C:600 nm; D:650 nm

图 1 不同波长测定 CVCC254 菌液的标准曲线

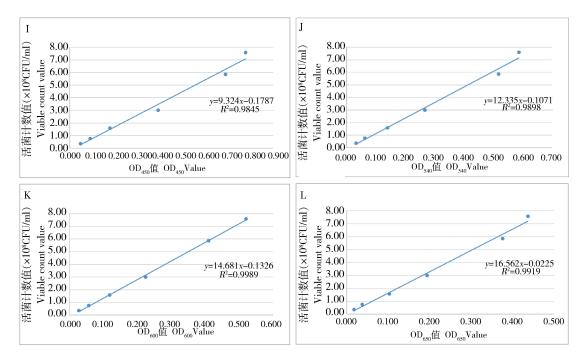
Fig 1 Standard curve for measuring bacterial solutions of CVCC254 at different wavelengths



E:450 nm; F:540 nm; G:600 nm; H:650 nm

图 2 不同波长测定 CVCC257 菌液的标准曲线

Fig 2 Standard curve for measuring bacterial solutions of CVCC257 at different wavelengths



I:450 nm; G:540 nm; K:600 nm; L:650 nm

图 3 不同波长测定 CVCC256 菌液的标准曲线

Fig 3 Standard curve for measuring bacterial solutions of CVCC256 at different wavelengths

2.3 最适测定波长确定 从图 1~图 3可看出,3 个菌株在波长 600 nm 测定的 6 个点与标准曲线的 离散度均最小(图1 C、图 2 G 和图 3K);同时比较不同波长测定系数(R^2),3 个菌株在波长 600 nm

的 R^2 值相较于 450、540、650 nm 更接近 1.0(表 4)。 R^2 又叫拟合优度,是相关系数 R 的平方,等于回归分析 SS /(回归分析 SS + 残差 SS),数值在 0~1.0之间,数值越接近于 1 越代表回归模型与实际数据的拟合程度越高。综合以上分析,确定波长 600 nm 是分光光度法测定副鸡禽杆菌菌液浓度的最适测定波长。

2.4 验证结果 分别取 3 株副鸡禽杆菌培养至 $10\sqrt{12}\sqrt{14}\sqrt{16}\sqrt{18}\sqrt{20}$ h 的菌液,在波长 600 nm 条件下测定的 OD 值并代入回归方程 y=14. 032x-0. $1441\sqrt{y}=14$. 295x-0. 2695 和 y=14. 681x-1

0.1326 中计算菌液中的活菌数,同时采用活菌计数 法进行计数,将不同培养时间点的两组数据使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,相关结果见下表 5、表 6 和表 7。从表 5 看,CVCC254(血清 A 型)培养 10~16 h 内分光光度法与活菌计数法测定的菌液浓度差异不显著(P>0.05);从表 6 看,CVCC257(血清 B 型)培养 10~14 h 内分光光度法与活菌计数法测定的菌液浓度差异不显著(P>0.05);从表 7 看,CVCC256(血清 C 型)培养 10 h~14 h 内分光光度法与活菌计数法测定的菌液浓度差异不显著(P>0.05)。

表 5 分光光度法测定 CVCC254 菌液浓度验证结果

Tab 5 Verification results of determining the concentration of CVCC254 bacterial solution by spectrophotometry

培养时间/h Culture time	OD ₆₀₀ 值 OD ₆₀₀ value	方程计数结果(×10 ⁸ CFU/mL) Curve count result	活菌计数值(×10 ⁸ CFU/mL) viable count values
10	0.332	4.51 a *	4.60ª
12	0.411	5.77 ^b	5.83 ^b
14	0.478	6.56°	6.60°
16	0.521	7.17 ^d	7.10 ^d
18	0.596	8.22°	6.40^{E}
20	0.634	8.75 ^f	5.63 ^F

[&]quot;*":同行数据肩标字母分别为同一字母的大写和小写表示差异显著(P < 0.05);肩标字母同为同一字母的小写表示差异不显著(P > 0.05),下同。

表 6 分光光度法测定 CVCC257 菌液浓度验证结果

Tab 6 Verification results of determining the concentration of CVCC257 bacterial solution by spectrophotometry

培养时间/h Culture time	OD ₆₀₀ 值 OD ₆₀₀ value	方程计数结果(×10 ⁸ CFU/mL) Curve count result	活菌计数值(×10 ⁸ CFU/mL) viable count values
10	0.341	4.60°*	4.63°
12	0.432	5.91 ^b	$5.90^{ m b}$
14	0.492	6.76°	6.80°
16	0.546	7.54 ^d	6.03 ^D
18	0.611	8.46^{e}	5.33 ^E

表 7 分光光度法测定 CVCC256 菌液浓度验证结果

Tab 7 Verification results of determining the concentration of CVCC254 bacterial solution by spectrophotometry

培养时间/h Culture time	OD ₆₀₀ 值 OD ₆₀₀ value	方程计数结果(×10 ⁸ CFU/mL) Curve count result	活菌计数值(×10 ⁸ CFU/mL) viable count values
10	0.491	7.08 ^{a*}	6.97ª
12	0.604	8.73 ^b	8.55 ^b
14	0.691	10.01°	9.70°
16	0.741	10.75 ^d	6.83 ^D
18	0.778	11.44°	4.13 ^E

3 讨论与结论

分光光度法广泛应用于物质的定性或定量分 析,其运用的原理是朗伯・比尔定律(Lambert – Beer law) 关于物质对某一波长具有吸光性,测定值 以吸光度值(OD值)表示。物质不同,其最适测定 波长不同。不同的细菌,其大小、结构各不同,因此 其最适测定波长也应不相同。马培培[15]将在450、 570、600、650 nm 波长条件下测定的大肠杆菌菌液 浓度与活菌计数结果进行比较分析,得出 600 nm 是测定大肠杆菌菌液浓度最适波长。周谡[8] 选择 在 540、600 nm 波长条件下测定鼠伤寒沙门氏菌菌 液浓度,发现 540 nm 更适合用于测定菌液浓度。 鉴于此,在研究副鸡禽杆菌菌液吸光度值与活菌计 数值的相关性中,作者参照前人经验,选择 450、 540、600、650 nm 波长作为条件分别测定副鸡禽杆 菌菌液的 OD 值。经对表 4、图 1、图 2 和图 3 进行 比较分析,确定 600 nm 波长是测定副鸡禽杆菌菌 液浓度的最适波长(R^2 均 > 0.995)。

细菌生长需经历迟缓期、对数期、稳定期和衰 亡期[17]。从表 5、表 6 和表 7 来看,副鸡禽杆菌 CVCC254 株(血清 A 型)约从 16 h 开始进入衰退 期,CVCC257 株(血清 B 型)和 CVCC256 株(血清 C型)约从14 h 开始进入衰退期。培养基本身也是 物质,同时细菌在生长过程中会吸收培养基的营养 成分、分泌代谢产物并死亡,可以说细菌培养物是 一个多物质混合物。唐翠明等[18]认为在衰退期前 的细菌培养液中其它物质(相对于活细菌)对 OD 值测定的干扰可忽略不计。为验证副鸡禽杆菌培 养物中其它物质对 OD 值的干扰,作者将副鸡禽杆 菌培养物离心并用无菌生理盐水重悬浮后测定 OD 值,与直接用副鸡禽杆菌培养物测定 OD 值进行比 较分析。结果表明,无需对副鸡禽杆菌培养液进行 离心后再用无菌生理盐水悬浮菌泥后测 OD 值,可 直接用副鸡禽杆菌培养液测定 OD 值(另文发表)。 表 5、表 6 和表 7 结果也表明, 衰退期前的 CVCC254 株(血清 A 型)、CVCC257 株(血清 B 型)和 CVCC256 株(血清 C 型)回归方程计算获得的菌液 浓度与活菌计数法获得的菌液浓度之间差异不 显著。

将表 1、表 2 和表 3 的 OD₆₀₀ 值代入表 4 的相应 回归方程计算获得菌液活菌数,并将其与相应的活 菌计数值进行比较分析,发现 OD₆₀₀ 值高于 0. 3 的 回归方程计算结果与活菌计数结果相对误差在 2. 35%以内,但 OD₆₀₀ 值低于 0. 3 的回归方程计算 结果与活菌计算结果部分误差大于 5%。再将表 5、表 6 和表 7 差异不显著的各两组数据进行比较 分析,回归方程计算结果与活菌计数结果相对误差 均小于 3. 2%。分析结果表明,当 OD₆₀₀ 值低于 0. 3 时,可能存在分光光度法测定结果与活菌计数结果 的比值超出 95% 置信区间。

本研究通过比较研究分光光度法和活菌计数 法测定副鸡禽杆菌菌液浓度的相关性,初步建立了 分光光度法快速测定副鸡禽杆菌菌液浓度的方法, 该方法与传统的活菌计数法相比,具有操作简单、 快速、准确等特点,可作为副鸡禽杆菌菌液浓度的 测定新方法,但仅适用于衰退期前的菌液浓度测 定,且 OD 值最好不低于 0.3。

最后要说明的是,细菌生长受培养基、培养条件的影响,本研究仅证明了分光光度法用于测定副鸡禽杆菌浓度的可行性,其它实验室如运用分光光度 法测定副鸡禽杆菌浓度,应确保培养基和培养条件相同的情况下,研究建立自己的回归方程,这样才能保证分光光度法测定副鸡禽杆菌浓度的准确性。

参考文献:

- [1] David E. Swayne 主编, 刘胜旺等主译. 禽病学(第 14 版) [M]. 辽宁科学技术出版社,2021;896-906. Edited by David E. Swayne and translated by Liu Shengwang, et al. Avian Pathology (14th ed.) [M]. Liaoning Science and Technology Press, 2021;896-906.
- [2] 杨 波,崔 倩,刘琳豆,等. 新型冠状病毒感染动物模型应用研究进展[J]. 环境卫生学杂志,2022,12(10):747-756.

 Yang B, Cui Q, Liu L D, et al. Progress in the application of a novel animal model of coronavirus infection [J]. Journal of Environmental Health, 2022, 12(10):747-756.
- [3] 杨正时. 生物制品中常用细菌计数法[J]. 微生物学通报, 1979(02):41-43.

[7]

- Yang Z S. Bacterial enumeration methods commonly used in biological products [J]. Microbiology Bulletin, 1979 (02): 41-43.
- [4] 刘博,张媛,袁璐,等. 猪丹毒活疫苗活菌计数参考品的研究
 [J]. 中国兽医杂志,2020,56(05):115-118.
 Liu B, Zhang Y, Yuan L, et al. Study on the reference product for live bacterial counting of live swine dengue vaccine [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2020, 56(05):115-118.
- [5] 王秀丽,刘 博,辛凌翔,等. 多条性巴氏杆菌类活疫苗活菌计数 参考品的研究[J]. 中国兽医杂志,2019,55(09);34-37+42. Wang X L, Liu B, Xin L X, et al. Study on the reference product for live bacterial counts of Bartonella multicidal species live vaccines[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 55 (09);34-37+42.
- [6] 辛凌翔,王秀丽,吕文静,等. 链球菌病类活疫苗活菌计数参考品的研制[J]. 生物工程学报,2021,37(07):2554-2562.

 Xin L X, Wang X L, Lv W J, et al. Development of a reference product for live bacterial counting of *streptococcal* disease like vaccines [J]. Journal of Bioengineering, 2021, 37 (07): 2554-2562.

王银环,钱凌,董芳华,等.流式细胞术和平板计数法用于地

- 衣芽孢杆菌活菌制剂检测的比较研究[J]. 中国现代应用药学,2018,35(03):352-356.
 Wang Y H, Qian L, Dong F H, et al. Comparative study of flow cytometry and plate counting methods for the detection of live Bacillus licheniformis preparations [J]. China Modern Applied Pharmacy, 2018, 35(03):352-356.
- [8] Takano C, Aoyagi H. Determination of available breaking stress of agar and gellan gum plate culture methods and the duration of bacterial culture under strong acidic conditions [J]. Journal of applied microbiology, 2021, 130(1):157-164.
- [9] 张一帜,张媛,李 建,等. 兽用生物制品活菌计数方法改进的研究[J]. 中国兽药杂志,2020,54(11):22 29.

 Zhang Y Z,Zhang Y,Li J,et al. A study on the improvement of live bacterial counting method for veterinary biological products
 [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2020, 54(11): 22 29.
- [10] Ana Paula Morschbacher, Anja Dullius, Carlos Henrique Dullius, et al. Validation of an analytical method for the quantitative determination of selenium in bacterial biomass by ultravioletvisible spectrophotometry [J]. Food Chemistry, 2018, 255 (7): 182-186.
- [11] Laibao Zheng, Peng Qi, Dun Zhang. A simple, rapid and costeffective colorimetric assay based on the 4 -

- mercaptophenylboronic acid functionalized silver nanoparticles for bacteria monitoring [J] . Sensor Actuators B Chemical ,2018 ,260 (5):983 –989.
- [12] 杜青平,王 倩,曹立创. 悬浮物变化引起细菌 JS17 生长曲线的波动规律[J]. 广东工业大学学报,2012,29(3):77 80. Du Q P, Wang Q, Cao L C. Fluctuation patterns of bacterial JS17 growth curves caused by changes in suspended solids[J]. Journal of Guangdong University of Technology, 2012, 29(3):77 80.
- [13] 肖 敏,杨 峰,王旭荣,等. 分光光度法测定金黄色葡萄球菌菌液浓度方法的建立[J]. 动物医学进展,2014,35(11):40-43.

 Xiao M, Yang F, Wang X R, et al. Establishment of a method for determining the concentration of Staphylococcus aureus bacterial fluids by spectrophotometry[J]. Advances in Animal Medicine, 2014, 35(11): 40-43.
- [14] 周 谡,李 睿,朱鸿雁,等. 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验中通过吸光度值测定菌液浓度的方法研究[J]. 癌变·畸变·突变,2020,32(1):62-65.
 - Zhou S, Li R, Zhu H Y, et al. Study on the method of determining the concentration of bacterial fluid by absorbance value in Salmonella typhimurium revertant mutation test [J]. Cancer Mutations Mutations, 2020, 32(1): 62–65.
- [15] 马培培,苏梦茹,李鑫鑫,等. 大肠埃希菌细菌计数分光光度 计法的建立及应用[J]. 动物医学进展,2020,41(5):29-33. Ma P P,Su M R,Li X X,et al. Establishment and application of a spectrophotometric method for bacterial counting of Escherichia coli[J]. Advances in Animal Medicine, 2020, 41(5): 29-33.
- [16] 曹凯欣,邱佩佩,贺锦灿,等. 共振瑞利散射法和分光光度法快速测定 3 种细菌悬液的浓度[J]. 广东药科大学学报,2019,36(5):619-623.
 - Cao K X, Qiu P P, He J C, et al. Rapid determination of the concentration of three bacterial suspensions by resonance Rayleigh scattering and spectrophotometry [J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2019, 36(5): 619 623.
- [17] 陆承平. 兽医微生物学(第五版)[M]. 中国农业出版社, 2012:27. Lu C P. Veterinary microbiology (fifth edition)[M]. China

Agricultural Press, 2012: 27.

[18] 唐翠明,王振江,邝哲师,等. 桑树青枯病菌紫外分光度计菌方法的研究[J].广东蚕业,2008,42(3):42-44.

Tang C M, Wang Z J, Kuang Z S, et al. Research on ultraviolet spectrophotometric bacteriological method of mulberry green blight [J]. Guangdong Sericulture, 2008, 42(3): 42-44.