

doi:10.16104/j.issn.1673-1891.2022.02.004

# 分光光度计法测定不同分离源青枯雷尔氏菌菌液浓度

谢祯璐, 杨梦婕, 顾康蝶, 赵雨欣, 周成希, 赖先军, 颜 朗\*

(西昌学院攀西特色作物研究与利用四川省重点实验室, 四川 西昌 615013)

**摘要:** [目的] 准确测定青枯雷尔氏菌的菌液浓度。 [方法] 选用胰蛋白胨大豆肉汤培养基和生理盐水为稀释液稀释青枯雷尔氏菌 RsA(烟草分离源)和 RsB(番茄分离源)菌悬液, 利用血球计数板计数法测定菌悬液浓度, 并利用分光光度计法测定菌悬液在 600 nm 处的吸光度值, 建立青枯雷尔氏菌菌悬液浓度与吸光度值间的线性关系。 [结果] 线性回归方程表明: 胰蛋白胨大豆肉汤培养基和生理盐水作为稀释液测定菌悬液浓度结果差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 但 RsA 和 RsB 菌悬液的吸光度值具有差异, 回归方程分别为  $y=6.578 4x+0.158 28$  ( $r^2=0.998 99$ ) 和  $y=5.162 7x-0.125 82$  ( $r^2=0.998 99$ ), 回归方程间斜率和截距均差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。 [结论] 建立的青枯雷尔氏菌的菌液浓度标准曲线可用于测定吸光度值后快速计算不同分离源青枯雷尔氏菌菌悬液浓度, 且无需将菌悬液培养基置换为生理盐水进行吸光度测定, 具有一定的便捷性和实用性。

**关键词:** 青枯菌; 血球计数板计数法; 分光光度计法; 菌液浓度; 线性关系

**中图分类号:** S432.4+2; O657.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1891(2022)02-0013-04

## Spectrophotometric Method for the Determination of Bacterial Liquid Concentration of *Ralstonia solanacearum*

XIE Zhenlu, YANG Mengjie, GU Kangdie, ZHAO Yuxin, ZHOU Chengxi,  
LAI Xianjun, YAN Lang\*

(Panxi Crops Research and Utilization Key Laboratory of Sichuan Province, Xichang University,  
Xichang, Sichuan 615013, China)

**Abstract:** [Objective] Accurately determine the concentration of *Ralstonia solanacearum*. [Method] Tryptone soy broth medium and physiological saline were used as diluents to dilute *Ralstonia solanacearum* RsA (tobacco source) and RsB (tobacco source). The concentration of bacterial suspension was measured by hemocytometer method, and the absorbance value of bacterial suspension at 600 nm was measured by spectrophotometer. The linear relationship between the concentration of *Ralstonia solanacearum* and the absorbance value was established. [Result] Linear regression equation demonstrated that there was no significant difference in slopes between two diluents. However, the absorbance values of RsA and RsB bacterial suspensions were significantly different, and the regression equations were  $y=6.578 4x+0.158 28$  ( $r^2=0.998 99$ ) and  $y=5.162 7x-0.125 82$  ( $r^2=0.998 99$ ) respectively. [Conclusion] The concentration standard curve of *Ralstonia solanacearum* established in this study can be used to determine the absorbance value and quickly calculate the concentration of *Ralstonia solanacearum* suspension from different sources without replacing the bacterial suspension medium with normal saline for absorbance determination. The method reported in the study was provided with convenience and practicality.

**Keywords:** *Ralstonia solanacearum*; hemocytometer counting method; spectrophotometric method; concentration of bacterium; linear relation

## 0 引言

由茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*, 简称

青枯菌)引起的植物细菌性青枯病是世界范围内传播广泛、危害严重、防治困难的土传细菌病害之一。该菌可侵染 54 个科、450 余种植物, 严重制约了烟

收稿日期: 2021-11-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060720)。

作者简介: 谢祯璐(2001—), 女, 四川成都人, 本科生, 研究方向: 分子生物学。\* 通信作者: 颜朗(1988—), 女, 四川成都人, 副教授, 博士, 研究方向: 根际微生物组学。

草、马铃薯、番茄和花生等多种经济作物的生产<sup>[1-2]</sup>。植物青枯病害的发生主要是由于病菌经植株根部侵入木质部后产生大量胞外多糖堵塞维管束,并在纤维素酶和果胶酶的共同作用下破坏植物导管,造成植株萎蔫并在短期内迅速枯死<sup>[3]</sup>。由于目前尚未建立青枯雷尔氏菌浓度鉴定的准确方法,这使得青枯病发病程度的快速检测出现一定困难。因此,建立一种快速而准确的青枯雷尔氏菌浓度测定方法将为青枯雷尔氏菌定量检测提供帮助。

目前,已有多种细菌浓度测定的方法,如平板计数法、选择性分离鉴定法、聚合酶链式反应(PCR)法、显微镜计数法和紫外分光光度计法等<sup>[4-5]</sup>。其中,平板计数法主要测定菌液中的活菌数量,操作较复杂且耗时较长<sup>[6]</sup>。选择性分离鉴定法可检测出活菌数量,可反映病菌致病力的信息,但耗时长且灵敏度较低<sup>[7]</sup>。基于 PCR 的检测技术应用最为广泛,RT-qPCR 成为了一种简单、快速、高通量的细菌定量检测方法,但是该方法所使用的仪器和试剂耗材都相对昂贵<sup>[8]</sup>。显微镜计数法中最常见的是血球板计数法,即用血球计数板在光学显微镜下直接计数细菌总量<sup>[9]</sup>。紫外分光光度计法是运用分光光度计测定细菌悬浮液的吸光度值,然后与相关细菌的标准曲线进行比较,根据建立的回归方程确定细菌数量<sup>[10]</sup>。有研究根据朗伯-比尔定律表明,细菌悬浮液的吸光度与菌液浓度之间呈正相关<sup>[11-12]</sup>。因此,通过测定菌液的吸光度,并结合显微镜计数结果绘制出标准曲线,即可根据吸光度值计算出菌液浓度<sup>[10,13]</sup>。

本研究结合显微镜计数法和分光光度计法,根据青枯雷尔氏菌菌液浓度与吸光度之间的线性关系,构建青枯雷尔氏菌菌悬液浓度标准曲线,同时分析不同分离源青枯雷尔氏菌以及不同稀释液用于菌液浓度测定的差异,实现快速且准确测定青枯雷尔氏菌菌液浓度的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂及仪器

#### 1.1.1 菌种

青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*) BMZ147860 菌株,分离自江西省抚州市南丰县烟草烟杆(RsA 菌株);B112711 菌株,分离自福建福州番茄植株(RsB 菌株)。

#### 1.1.2 化学试剂

生理盐水(0.9%NaCl);胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB):胰蛋白胨 17 g/L、大豆蛋白胨 3 g/L、NaCl

5 g/L、磷酸氢二钾 2.5 g/L、葡萄糖 2.5 g/L、琼脂 15 g/L。

#### 1.1.3 主要仪器

Nanophotometer N60 超微量分光光度计(德国 Implen 公司);CX40M 正置显微镜(宁波舜宇公司);BS-1G 恒温振荡器(常州市国旺公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌悬液的制备

从平板挑取青枯雷尔氏菌单菌落接种至 TSB 液体培养基中,在 37℃、200 r/min 条件下振荡培养 36 h 用于检测。

#### 1.2.2 菌悬液浓度梯度稀释

将不同分离源的菌悬液采用 2 种稀释液处理,一是用 TSB 液体培养基直接稀释菌悬液,二是将 TSB 液体培养基置换为生理盐水进行稀释。为将菌液浓度控制在分光光度计检测范围内,首先将原液初步稀释为待检测菌液,然后按照稀释倍数 1:1、1:1.25、1:1.5、1:2、1:2.5、1:4、1:6 将待检测 RsA 菌液用 TSB 液体培养基进行浓度梯度稀释;采取同样方法按照稀释倍数 1:1、1:1.5、1:1.75、1:2.25、1:3、1:4、1:6 将待检测 RsB 菌液稀释浓度梯度。同理,将培养基置换为生理盐水后按 1:1、1:1.25、1:1.75、1:2、1:2.5、1:3、1:4 稀释 RsA 菌液,按 1:1、1:1.125、1:1.25、1:1.375、1:1.5、1:2、1:2.5 稀释 RsB 菌液。

#### 1.2.3 血球计数板法计数

用移液枪吸取 20 μL 菌悬液滴于血球计数板上,将血球计数板置于显微镜下观察。计算计数室左上、左下、右上、右下、中央 5 个中号方块的细菌数并取其平均数。利用公式  $M = N \times 25 \times 10 \times 1\ 000$  计算菌液浓度,其中  $N$  代表细菌个数平均数, $M$  代表每毫升菌液浓度(cfu/mL)。

#### 1.2.4 吸光度值的测定

取上述浓度梯度的菌液,按照溶质类型分别对应的生理盐水或 TSB 液体培养基作为空白对照对分光光度计进行调零,用超微量分光光度计 Nanophotometer N60 测定在 600 nm 波长处菌液吸光度值,重复 3 次。

#### 1.2.5 标准曲线的建立

将吸光度值作为横坐标,菌液浓度为纵坐标,用基于 R 语言的 BasicTrendline 函数建立青枯雷尔氏菌菌液浓度与吸光度值之间线性关系。

## 2 结果

### 2.1 青枯雷尔氏菌菌悬液浓度与吸光度值测定

为消除 TSB 液体培养基本身的成分对吸光度

的干扰, 本研究分别使用 TSB 液体培养基和生理盐水稀释 RsA 和 RsB 青枯雷尔氏菌菌悬液, 以未接菌种的对应稀释液为对照, 使用超微量分光光度计测定 600 nm 处的吸光度, 使用血球计数板计数法对不同浓度梯度的菌液进行显微镜下计数。结果表明: 2 个菌株在 2 种稀释液稀释后吸光度值均在 0.1~1.0 范围内(表 1)。RsA 菌株经 TSB 液体培养基 6 倍稀释后的吸光度值为 0.169 0, RsB 菌株为 0.196 0(表 1)。将稀释液更换为生理盐水后, RsA 菌株经 2.5 倍稀释后的吸光度值为 0.168 0, RsB 菌株为 0.166 0。该结果表明: 在原检测液吸光度值相近的情况下, 采用生理盐水稀释后的菌液吸光度比用 TSB 液体培养基稀释更低, 即在分光光度计有效检测范围内, 使用生理盐水作为稀释液时的可稀释倍数范围更窄。

表 1 不同稀释液在 600 nm 波长下的吸光度值

菌株(稀释液)	稀释倍数	吸光度	计数结果( $\times 10^7$ cfu/mL)
RsA(TSB)	1.000	0.879 0	6.000
	1.250	0.698 0	4.674
	1.500	0.610 0	4.200
	2.000	0.487 0	3.300
	2.500	0.368 0	2.585
	4.000	0.236 0	1.770
RsA(生理盐水)	6.000	0.169 0	1.125
	1.000	0.898 0	6.400
	1.250	0.717 0	5.110
	1.750	0.525 0	3.625
	2.000	0.375 0	2.600
	2.500	0.168 0	1.100
RsB(TSB)	3.000	0.143 0	0.800
	4.000	0.106 0	0.625
	1.000	0.990 0	5.054
	1.500	0.734 0	3.610
	1.750	0.632 0	3.083
	2.250	0.483 0	2.360
RsB(生理盐水)	3.000	0.379 0	1.825
	4.000	0.288 0	1.375
	6.000	0.196 0	0.925
	1.000	0.980 4	5.150
	1.250	0.733 0	3.900
	1.125	0.562 0	2.900
RsB(生理盐水)	1.375	0.460 0	2.450
	1.500	0.391 0	2.050
	2.000	0.222 0	1.165
	2.500	0.166 0	0.850

## 2.2 青枯菌菌悬液浓度与吸光度的线性关系分析

为确定青枯菌菌液浓度和吸光度间的相关线性关系, 将不同分离源的 2 个菌株用 TSB 液体培养基和生理盐水分别稀释成 7 个浓度梯度, 并以菌液吸光度为横坐标, 菌液浓度为纵坐标拟合线性曲线并建立相关线性回归方程(图 1、表 2)。结果表明, 2 个菌株菌液浓度和吸光度间均呈现线性关系。

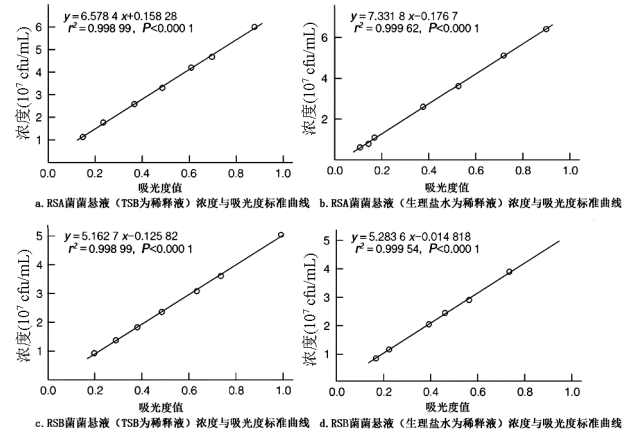
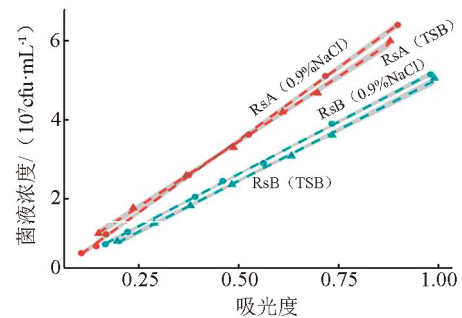


图 1 青枯菌菌悬液浓度与吸光度相关性标准曲线

表 2 分光光度计测定青枯菌菌悬液的方法特征

菌株(稀释液)	线性范围/ ( $\times 10^7$ cfu/mL)	线性方程	相关系数 $r^2$
RsA(TSB)	1.125~6.0	$y=6.5784x+0.15828$	0.99899
RsA(生理盐水)	0.625~6.4	$y=7.3318x-0.1767$	0.99962
RsB(TSB)	0.925~5.054	$y=5.1627x-0.12582$	0.99899
RsB(生理盐水)	0.85~5.15	$y=5.2836x-0.014818$	0.99954

由表 2 可知, 使用 TSB 液体培养基和生理盐水作为稀释液稀释 RsA 和 RsB 均得到可靠的线性关系, 线性方程相关系数均达 0.99 以上。同一菌种在 2 种稀释液稀释条件下拟合曲线的斜率比较接近, RsA 在不同稀释液中吸光度平均值差异为  $(0.071 \pm 0.077)$ , RsB 为  $(0.027 \pm 0.031)$ 。通过 R 语言 simba 函数包 `diffslope()` 对回归方程斜率比较分析表明其差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。



注: 括号内表示稀释液。

图 2 2 种分离源青枯菌在 2 种稀释液中吸光度和浓度间线性关系比较

分离自不同物种的 RsA 和 RsB 菌株间拟合曲线斜率差异显著(图 2)。在 TSB 稀释液条件下, RsB 菌液吸光度值高于 RsA 菌液吸光度值,拟合曲线斜率差异有统计学意义( $P=0.004$ )。同样,在生理盐水稀释条件下, RsB 菌液吸光度值高于 RsA 菌液吸光度值,拟合曲线斜率差异有统计学意义( $P=0.011$ )。该结果表明:不同分离源的青枯菌在相同菌液浓度下的吸光度不同,在本研究中,番茄分离源的青枯菌吸光度值大于烟草分离源的青枯菌。

### 3 讨论

不论是田间病害检测还是实验室条件下对致病微生物进行培养鉴定,对特定环境下目标微生物浓度的精确测定是开展微生物研究和分子诊断的必要条件。本研究基于溶液对光的吸收和物质的浓度呈线性关系的原理<sup>[11-12]</sup>,使用分光光度计对不同分离源和不同稀释液条件下的菌株吸光度进行

了测定,同时利用显微镜下的血球计数板计数法计算菌液浓度,并基于二者间的线性关系建立线性回归方程,相关系数  $r^2$  均达 0.998 99 以上。

本研究之所以选择胰蛋白胨大豆肉汤培养基和生理盐水作为稀释液并进行比较实验,是因为前人研究中曾以生理盐水替换微生物培养基以避免培养基本身的颜色对吸光度值的干扰<sup>[14]</sup>。然而,替换培养基步骤较为烦琐,不利于微生物浓度的快速测定。在本研究针对青枯菌菌液浓度的测定中,使用原培养基稀释和生理盐水稀释建立的拟合曲线斜率较接近,且斜率差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。另外,虽然使用生理盐水为稀释液时回归方程相关系数  $r^2$  也能达到 0.999 以上,但是其稀释范围较窄,当稀释倍数大于 3 时吸光度值 $<0.1$ ,处于检测值下限边缘,也增加了稀释过程的操作难度。因此,为了简化操作步骤,本研究推荐在测定青枯菌菌悬液时直接使用原培养基作为稀释液。

#### 参考文献:

- [1] WICHER E, GRASSART L, CORANSOA-BEAUDU, et al. *Ralstonia solanacearum* strains from martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2007, 73(21): 6790-6801.
- [2] ZHANG C, CHEN H, CAI T, et al. Overexpression of a novel peanut NBS-LRR gene AhRRS5 enhances disease resistance to *Ralstonia solanacearum* in tobacco [J]. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15(1): 39-55.
- [3] 李石力. 有机酸类根系分泌物影响烟草青枯病发生的机制研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- [4] 王元甲. 食品卫生微生物学检测菌落总数的测定方法分析 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(10): 100.
- [5] 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.
- [6] 吴征王, 孔新平, 孙建春, 等. 大肠杆菌活菌计数方法的优化 [J]. *高原农业*, 2019, 3(2): 79-83.
- [7] 王胜坤, 王军, 徐大平. 植物青枯菌检测方法研究进展 [J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2007, 31(2): 118-122.
- [8] 黄家权, 晏立英, 叶小文, 等. 青枯菌定量检测方法的建立及其在花生中的应用 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(1): 58-66.
- [9] 袁洪威, 陈湖芳, 高东民, 等. 分光光度法测定黑曲霉孢子浓度的研究 [J]. *中国酿造*, 2017, 36(4): 122-126.
- [10] 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(11): 40-43.
- [11] 陈婷, 孟建昇, 谢华相. 朗伯-比尔定律在血红蛋白浓度检测中的应用研究 [J]. *科技创新导报*, 2015(24): 32-33.
- [12] 王晓旭, 徐峰, 沈丽萍, 等. 分光光度法测定猪链球菌菌悬液浓度 [J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2017(5): 40-41.
- [13] 董自艳, 戴翠, 马仕洪, 等. 紫外-可见分光光度法快速确定细菌菌液的浓度 [J]. *中国药品标准*, 2014(2): 120-121.
- [14] 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, 35(5): 619-623.