

一种微生物生长动态的研究仪器 Biotran III 的用法

徐浩 董光军

(中国科学院微生物研究所,北京)

微生物生长动态的重要参数是细胞群体中细胞数目、形态和大小的变化。这些参数的测量虽很重要,但由于实验费时、费力,且有操作人员主观上的误差,从而影响了我国这方面研究工作的开展。最近由美国引入一批自动计数及求积的仪器——Biotran III,是 New Brunswick Scientific Co. Inc. 生产的,该仪器能自动计数菌落,而且在与显微镜或其它图象放大仪联用时,还能自动测量细胞或图形的面积和对细胞计数。这种仪器引入后由于我国的实验条件与国外有些不同,使此仪器的使用遇到一些困难。如国内使用玻璃培养皿,这同国外的无气泡塑料培养皿相比,底部欠平,气泡也多。另外培养基杂质含量不一,用透射光自动计数菌落时,往往得不到很好结果。为此,我们探讨了该仪器的使用方法,并扩展了它的应用范围。

一、菌落计数

菌落计数依据人工计数法,以 20 个人在 10 个实验室中对 300 个培养皿,每皿 30—300 个菌落的计数,表明 95% 的计数结果其误差均在 $\pm 24\%$ 以内,用图形表示如下:

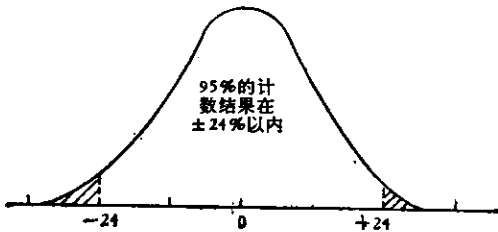


图 1. 人工计数误差的概率分布

在图 1 的高斯分布中,与平均数相差百分数为 0 的出现频率数最多,与平均数相差百分数递增或递减时,出现频数亦递减。与平均数相差 $\pm 24\%$ 的计数出现的频数不超过 5%。这

说明人工计数相当可靠,只有约 5% 的计数是不能使人满意的。

但是,人工计数常受到实验人员观察的敏感程度、疲劳状态、细心程度、照明及放大的质量和菌落分散状态以及有否异物的影响。尽管如此,Biotran III 的计数仍应以人工计数相核对。计数时理想的条件是菌落在 9cm 平皿中为 50—500 个,菌落大小为 0.4—3mm。若人工计数与机器计数完全一致时,依图 2 显然可得出其 45° 的分角线即为其等量线(line of equality),而实际上机器计数的数值较人工计数为低,往往为虚线下方的曲线(实线)。若求出人工计数与机器计数在各段菌落数中之比,就可以在 Biotran III 的校正键上校正之。

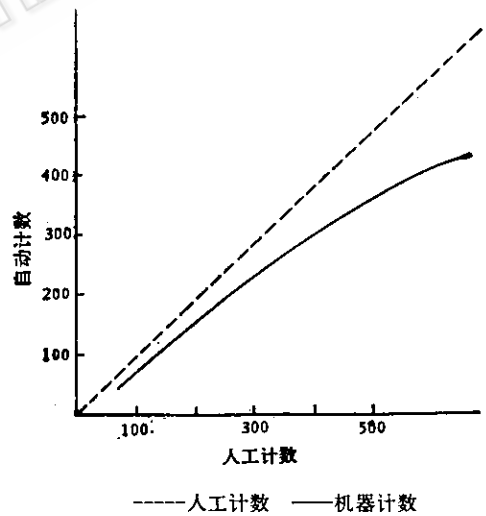


图 2. 人工计数对机器计数的校正曲线

因此, Biotran III 上校正值为:

$$\text{机上校正} = \frac{\text{人工计数}}{\text{机器计数}} - 1$$

在我们进行校正时,由于考虑到在不同稀释度时,机器测试值曲线有可能起伏。因此,更可取的是只做 100 个菌落水平的稀释度,校正

值也可以此作为标准。

由于在我们实验室条件下,培养基内异物较多,培养皿底部又不平坦,我们将生长好菌落的培养基平皿改用 0.5% 硫堇 (thionin) 水溶液染色 2 分钟,然后用落射光计数。所用培养基为牛肉汁培养基,所用菌为分离后的纯菌或曝气后的杂菌,菌落直径大于 1 mm。得出的比值为 1.15,即校正值为 $1.15 - 1 = 0.15$ 。

二、细胞大小的测量

将 Biotran III 与东德产的 Amplival 研究显微镜联用,在荧光屏上就能显示出细胞的形态来。由于细菌分类上要求测量细胞宽度,因此用浓涂布 (dense smear) 法,以便一次量度平行紧密排列的 2—3 个细菌的总宽度,再除以细胞数,求出每个细胞的宽度。

在进行细胞宽度测量前,先要用标准尺度求出各种显微镜倍率下 Biotran III 上所显示的数字所乘的放大因子。

我们所用的标准尺度是物镜测微尺,其最小刻度是 10μ 。另外,也采用了圆形的 Dow-latex,其直径为 0.94μ 。这样直接测出 Dow-latex 的显示数字,求直径后算出放大倍数,或用内接的圆形电子屏蔽窗或用边长一定的同刻度长度相等的方形电子屏蔽窗,显示了面积的数字,经过由圆面积求直线长度,或由矩形面积开方后求边长。这样我们得到了在我们的一套仪器下各种镜头的放大倍数 (表 1)。

表 1 各种镜头下的放大倍数

投影镜	物镜	总放大倍率
8:1	$3.2 \times \text{NA}0.10$	127.6
8:1	$10 \times \text{NA}0.25$	393.8
8:1	$40 \times \text{NA}0.65$	1158.5
8:1	$100 \times \text{NA}1.25$	3689

根据我们的经验,圆形求积误差较矩形屏蔽窗为大,因此以用镜台测微尺标定倍数为宜。

有了以上的倍率,就可以很容易地求得自动测量的细胞尺度了。

三、长度测量

由于 Biotran III 只能测量面积,而不能测量复杂的圆形边长,一些工作人员希望能用它测量电镜照片中 DNA 的长度,为此我们特制了一个点触轮,即在小杆上装有齿轮的推轮,用它印出的虚线上的点,可将线条变为点数,经 Biotran III 计数后,求出线长。我们的齿轮,每 100 个点约为 1cm,因此很便于长度的测量。

综上所述,我们依据我国特有的实验条件与要求,取得了三项方法上的推进:

1. 硫堇法计数菌落,
2. 细菌细胞宽度的测量,
3. DNA 链长的测量。

以上方法可用于教学及研究工作中,对微生物动态进行定量的探索。