

分光光度法快速测定副鸡禽杆菌菌液浓度的应用

佟仁冬^{1,2}, 冯妍¹, 刘燕¹, 张一帆¹, 任小侠¹, 郝力力², 朱良全¹, 姚文生^{*1}

1 中国兽医药品监察所, 北京 100081

2 西南民族大学畜牧兽医学院, 四川 成都 610041

佟仁冬, 冯妍, 刘燕, 张一帆, 任小侠, 郝力力, 朱良全, 姚文生. 分光光度法快速测定副鸡禽杆菌菌液浓度的应用[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2702-2710.

TONG Rendong, FENG Yan, LIU Yan, ZHANG Yizhi, REN Xiaoxia, HAO Lili, ZHU Liangquan, YAO Wensheng. Spectrophotometry for rapid determination of the concentration of *Avibacterium paragallinarum*[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2702-2710.

摘要: 【背景】感染副鸡禽杆菌(*Avibacterium paragallinarum*)会引起一种鸡的急性上呼吸道感染病——传染性鼻炎。一般情况下该病潜伏期短、发病急且传染性强, 易给养殖场造成巨大的经济损失。【目的】比较分光光度法(spectrophotometry, SP)与平板菌落计数法(plate colony count, PCC)测定副鸡禽杆菌菌液浓度的准确性, 探究 SP 替代 PCC 的可行性。【方法】无菌生理盐水悬浮副鸡禽杆菌菌液沉淀物, 用 SP 测定不同稀释度菌悬液吸光度值(*OD*值), 用 PCC 测定活菌数。以不同波长(450、540、600 和 650 nm)测定的 *OD* 值为自变量, 活菌数为因变量, 获得标准曲线和线性方程, 比较分析确定最适测定波长。设置胰蛋白胨大豆肉汤培养基(tryptone soy broth, TSB)组和无菌生理盐水(sterile physiological saline solution, SPSS)组, 分别以 TSB 和 SPSS 为悬浮液和稀释液, 用 SP 和 PCC 法分别测定不同稀释度的副鸡禽杆菌菌悬液, 通过标准曲线和线性方程比较分析两种悬液对 *OD* 值与菌液浓度相关性的影响。取不同培养阶段(10、12、14、16 和 18 h)菌液, 以测定 *OD* 值直接输入线性方程获得菌液浓度, 同时进行平板菌落计数, 采用 SPSS 17.0 软件统计分析以验证 SP 法适用性。【结果】在波长 600 nm 下测定的 *OD* 值与 PCC 结果线性关系最佳($R^2>0.995$)。在该波长下, TSB 组与 SPSS 组测定的 *OD* 值与 PCC 结果无显著差异($R^2_{\text{差}}=0.000\ 5$), 且 TSB 组略优于 SPSS 组($R^2_{\text{TSB}}=0.998\ 9>R^2_{\text{SPSS}}=0.998\ 4$)。培养 10、12、14 h 时 SP 与 PCC 法测定结果差异不显著($P>0.05$), 而培养 16 h 和 18 h 时差异显著($P<0.05$)。【结论】在对数生长期及稳定期, 采用分光光度法测定 *OD*₆₀₀ 值可快速确定副鸡禽杆菌菌液浓度。

关键词: 副鸡禽杆菌; 分光光度法; 平板菌落计数法; 菌液浓度

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFF0711002); 中国兽医药品监察所公益性专项(GY202104, GY202103)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF0711002) and the Public Welfare Special Project of China Institute of Veterinary Drug Control (GY202104, GY202103).

*Corresponding author. E-mail: 1196314953@qq.com

Received: 2023-10-16; Accepted: 2023-12-05; Published online: 2024-03-08

Spectrophotometry for rapid determination of the concentration of *Avibacterium paragallinarum*

TONG Rendong^{1,2}, FENG Yan¹, LIU Yan¹, ZHANG Yizhi¹, REN Xiaoxia¹, HAO Lili², ZHU Liangquan¹, YAO Wensheng^{*1}

1 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

2 College of Animal & Veterinary Sciences, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

Abstract: [Background] The infection with *Avibacterium paragallinarum* (Apg) results in an acute upper respiratory disease known as infectious coryza in chickens. In general, the disease exhibits a short incubation period, an acute onset, and a high degree of infectivity, thereby causing substantial economic losses of breeding farms. **[Objective]** To assess the feasibility of spectrophotometry (SP) as a potential substitution of plate colony count (PCC) in determining the concentration of Apg. **[Methods]** The Apg precipitate was suspended in tryptone soy broth (TSB) or sterile physiological saline solution (SPSS), as two sets of diluents respectively. The absorbance (*OD*) values of the bacterial suspensions at different dilutions were determined by SP and the viable cell count was determined by PCC. With *OD* values measured at different wavelengths (450, 540, 600 and 650 nm) as the independent variables and the viable cell counts as the dependent variables, the standard curves and linear equations were established. Set up a tryptone soy broth (TSB) group and a sterile physiological saline solution (SPSS) group, using TSB and SPSS as suspensions and dilutions. Use SP and PCC methods to measure the suspension of different dilutions of *Streptococcus parahaemolyticus*, and compare and analyze the effect of the two suspensions on the correlation between *OD* value and bacterial concentration through standard curves and linear equations. The *OD* values of the bacterial suspension samples collected at different culture stages (10, 12, 14, 16 and 18 h) were measured and substituted into the linear equation to obtain the concentration of the bacterial suspension. PCC was carried out at the same time. SPSS 17.0 was used for statistical analysis to verify the applicability of SP. **[Results]** The *OD* value measured at 600 nm (*OD*₆₀₀) showed the best linear relationship with the PCC results ($R^2 > 0.995$). At this wavelength, the *OD* values measured in the TSB and SPSS groups were not different from the PCC results ($R^2_{\text{difference}} = 0.0005$), and the TSB group was superior to the SPSS group ($R^2_{\text{TSB}} = 0.9989 > R^2_{\text{SPSS}} = 0.9984$). The results of SP and PCC showed no differences at the incubation time points of 10, 12, and 14 h ($P > 0.05$) but had differences at the time points of 16 and 18 h ($P < 0.05$). **[Conclusion]** During the logarithmic and stationary phases, SP could rapidly measure *OD*₆₀₀ to determine the concentration of Apg.

Keywords: *Avibacterium paragallinarum*; spectrophotometry; plate colony count; bacterial suspension concentration

副鸡禽杆菌(*Avibacterium paragallinarum*, Apg)是鸡传染性鼻炎(infectious coryza, IC)的致病菌,可导致感染鸡生长缓慢、产蛋量下降,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^[1]。疫苗产品的研发需要建立动物感染模型,疫苗效力评价则常采用免疫攻毒法。动物感染模型研究和免疫攻毒法检验中,感染动物用的副鸡禽杆菌攻毒菌液普遍采用平板菌落计数法(plate colony count, PCC)测定其含活菌数(俗称菌液浓度),确定感染动物的活菌数量,以评价动物感染模型的可行性和疫苗的有效性^[2]。PCC 是通过梯度稀释后接种固体培养基,一般培养 24–48 h,形成肉眼可见菌落,计算菌落数。该方法是测定细菌菌液浓度的经典方法,但操作要求较高,且存在延迟性,常导致动物感染实验结果不够理想。

朗伯·比尔定律(Lambert-Beer law)是描述物质对某一波长光吸收的强弱与吸光物质的浓度及其液层厚度间的关系。分光光度法(spectrophotometry, SP)是朗伯·比尔定律的实际应用,通过分光光度计测定某一物质对一定波长的吸光度来对该物质进行定性或定量分析^[3-4],检测单位用 *OD* 值表示。细菌由于其本身存在荚膜和细胞壁等结构,且在生长繁殖过程中会产生一些悬浮物,从而使培养至不同浓度的菌液具有不同的透光性^[5]。可根据菌液的透光量间接测定细菌的浓度,且细菌悬浮液的浓度在一定范围内与吸光度成正比,用吸光度值(*OD* 值)可间接测定菌液浓度^[6]。肖敏等^[7-13]使用 SP 在一定波长条件下测定菌液的 *OD* 值,与 PCC 获得的菌液含活菌数进行回归分析后获得标准曲线和线性方程,建立 *OD* 值与菌液浓度的线性关系,其研究结果表明不同细菌的菌液浓度与 *OD* 值呈良好的线性关系。相较于 PCC, SP 具有时效性优点,可快速测定菌液浓度,以保证动物感染实验的成功率。

本研究通过比较 PCC 测定副鸡禽杆菌菌液含活菌数和 SP 测定副鸡禽杆菌菌液 *OD* 值的相关性,探究 SP 测定副鸡禽杆菌菌液浓度的最适条件,以期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 材料

1.1.1 试验菌种

副鸡禽杆菌 Hpg-668, Page 氏血清分型为 C 型,由中国兽医药品监察所引进、鉴定、保存,中国兽医菌种目录编号 CVCC256。

1.1.2 培养基、主要试剂及仪器

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(tryptone soy broth, TSB), BD 公司;氧化型辅酶 I (NAD), 生工生物工程(上海)股份有限公司;新生鸡血清,兰州民海生物工程有限公司;无菌生理盐水(sterile physiological saline solution, SPSS), 北京中海生物科技有限公司。SpectraMax Plus 384 全波长分光光度计,北京美谷科技有限公司;生物安全柜,海尔(集团)有限公司;CO₂ 培养箱, SANYO 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液的制备

将-80 °C保存的副鸡禽杆菌 Hpg-668 株冻存菌液化冻,接种至 10 mL 含 5% NAD 和 10% 鸡血清的 TSB 中,37 °C、5% CO₂ 环境下培养 12–14 h。传代培养 2 次后,再接种至含 5% NAD 和 10% 鸡血清的无菌 TSA 表面,37 °C、5% CO₂ 环境下培养 24 h,获得纯化的副鸡禽杆菌。将纯化后的副鸡禽杆菌单个菌落接种于 10 mL 含 5% NAD 和 10% 鸡血清的 TSB 中,37 °C、5% CO₂ 环境下静置培养 12 h 后于 4 000 r/min 离心 15 min,去上清液,加入 10 mL 无菌生理盐水重悬菌泥,制备成副鸡禽杆菌 SPSS 菌悬液。

1.2.2 分光光度法测定不同稀释梯度菌悬液 OD 值

为确定副鸡禽杆菌 SPSS 菌悬液的最适测定波长, 参考文献[5-12]分别测定波长 450、540、600 和 650 nm 的 OD 值。取 6 支无菌试管并编号 1-6, 向 1-6 号分别加入 0、1、3、4、4.5 和 4.75 mL 无菌生理盐水, 再依次添加 5、4、2、1、0.5 和 0.25 mL 的副鸡禽杆菌 SPSS 菌悬液, 使每支试管总体积达到 5 mL。充分混匀后, 配制成稀释梯度为 100%、80%、40%、20%、10% 和 5% 的菌悬液, 以无菌生理水为空白对照, 各取 2 mL 菌悬液加入比色皿, 用 SpectraMax Plus 384 全波长分光光度计分别测定波长 450、540、600 和 650 nm 的 OD 值, 每个样品重复测定 3 次, 计算平均值。

1.2.3 平板菌落计数法测定不同稀释梯度菌悬液浓度

取上述不同稀释梯度的菌悬液, 分别用无菌生理盐水按 10 倍比例稀释成不同梯度的菌悬液。选取菌落数在 30-300 个的平板作为菌落总数测定的标准, 经预实验, 确定稀释梯度为 100%、80%、40% 的取 10^{-6} 稀释的菌悬液, 稀释梯度为 20%、10%、5% 的取 10^{-5} 稀释的菌悬液, 用于平板菌落计数。取 10^{-6} 或 10^{-5} 稀释菌液各 0.1 mL 于含 5% NAD 和 10% 鸡血清的 TSA 平板上, 每个稀释倍数设置 3 个重复, 涂布均匀后放入 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h。记录各平板上的菌落数, 取 3 个平板菌落数平均值乘以其对应的稀释倍数, 最终计算出不同稀释梯度菌悬液的浓度。

1.2.4 标准曲线的建立与最适测定波长的确定

以不同稀释梯度副鸡禽杆菌 SPSS 菌悬液 OD 值为自变量 x , 以 PCC 获得的对应稀释梯度菌悬液菌液浓度为因变量 y , 输入 Microsoft Excel 2010 进行回归分析, 获取标准曲线和线性方程。比较分析不同稀释梯度标准曲线和测定系数(R^2),

确定副鸡禽杆菌菌液浓度的最适测定波长。

1.2.5 不同悬浮稀释方式对比分析

挑取 1.2.1 纯化的副鸡禽杆菌单菌落接种于 10 mL 含 5% NAD 和 10% 鸡血清的 TSB, 置 37 °C、5% CO₂ 环境下培养 12 h 用于后续检测。设置 SPSS 组和 TSB 组, SPSS 组按照 1.2.1 制备 SPSS 菌悬液, 再参照 1.2.2 测定在最适波长条件下的 OD 值并参照 1.2.3 进行平板菌落计数; TSB 组直接用 TSB 稀释副鸡禽杆菌培养液, 分别测定 100%、80%、40%、20%、10% 和 5% 稀释梯度在最适测定波长条件下的 OD 值, 测量 OD 值时设置 TSB 为空白本底对照, 同时用 TSB 进行 10 倍稀释后进行平板菌落计数。参照 1.2.4 分别获取 SPSS 组和 TSB 组的标准曲线和线性方程, 对比 SPSS 组和 TSB 组的标准曲线和测定系数(R^2), 分析用无菌生理盐水悬浮稀释和直接用 TSB 稀释对副鸡禽杆菌 OD 值与菌液浓度相关性的影响。

1.2.6 分光光度法适用性的验证

挑取 1.2.1 纯化的副鸡禽杆菌单菌落接种于 25 mL 含 5% NAD 和 10% 鸡血清的 TSB, 置 37 °C、5% CO₂ 环境下培养, 分别取培养 10、12、14、16 和 18 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 值并代入线性方程计算对应的菌液浓度, 同时 10 倍稀释后进行平板菌落计数, 将不同时间点的两组数据使用 SPSS 17.0 软件进行差异性分析, 以验证分光光度法的适用性。

2 结果与分析

2.1 副鸡禽杆菌 SPSS 菌悬液的 OD 值和平板菌落计数结果

副鸡禽杆菌 SPSS 菌悬液不同稀释梯度在 4 个波长条件下 OD 值测定结果以及平板菌落计数结果见表 1。

表 1 不同稀释梯度菌悬液的 OD 值和平板菌落计数结果

Table 1 OD values and plate colony counting results of bacterial suspensions with different dilution gradients

稀释梯度 Dilution gradient (%)	OD ₄₅₀	OD ₅₄₀	OD ₆₀₀	OD ₆₅₀	平板菌落计数结果 Plate count result ($\times 10^8$ CFU/mL)
100	0.416	0.315	0.265	0.234	4.07
80	0.336	0.244	0.195	0.177	2.76
40	0.176	0.131	0.105	0.095	1.47
20	0.087	0.066	0.054	0.049	0.75
10	0.044	0.033	0.027	0.022	0.45
5	0.023	0.017	0.013	0.011	0.22

2.2 回归分析结果与最适测定波长

分别将表 1 中波长 450、540、600 和 650 nm 的 OD 值与平板菌落计数结果进行回归分析, 获得标准曲线和线性方程(图 1) (表 2)。从图 1 可以看出, 波长 600 nm (图 1C) 6 个点与标准曲线的离散度最小; 同时比较不同波长线性方程的测定系数(R^2), 波长 600 nm 的 R^2 值为 0.995 7 (表

2), 相较于 450、540、650 nm 更接近 1.0。 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), 数值为 0-1.0, 数值越大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的最适测定波长。

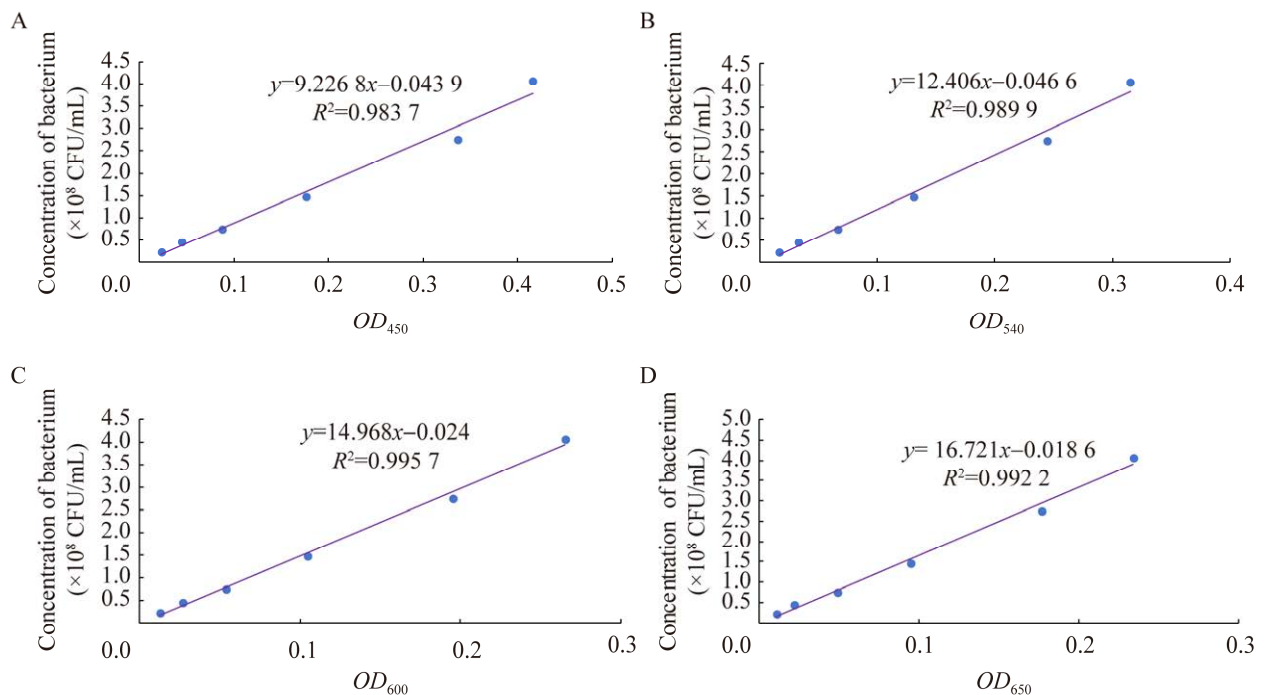


图 1 不同波长的标准曲线

Figure 1 Standard curve for different wavelengths. A: 450 nm. B: 540 nm. C: 600 nm. D: 650 nm.

表 2 不同波长的线性方程

Table 2 Linear equation for different wavelengths

波长 Wavelength (nm)	OD 值范围 OD value range	线性方程 Linear equation	R ²
450	0.023–0.416	y=9.226 8x-0.043 9	0.983 7
540	0.017–0.315	y=12.406x-0.046 6	0.989 9
600	0.013–0.265	y=14.968x-0.024	0.995 7
650	0.011–0.234	y=16.721x-0.018 6	0.992 2

2.3 不同悬浮稀释组测定结果与分析

TSB 组和 SPSS 组的不同稀释梯度在波长 600 nm 条件下测定的 OD 值和平板菌落计数结果见表 3。将表 3 数据分别进行回归分析, 获得图 2 和表 4。从图 2 和表 4 可以看出, 在波长 600 nm 条

件下 TSB 组和 SPSS 组均呈良好的线性关系, TSB 组的 R² 更接近于 1.0, 表明 TSB 组的线性关系优于 SPSS 组, 说明分光光度法测定副鸡禽杆菌菌液浓度时, 无须离心后再用无菌生理盐水悬浮后测定 OD 值, 可直接用副鸡禽杆菌培养液进行测定。

表 3 TSB 组与 SPSS 组的 600 nm 波长下 OD 值与平板菌落计数结果

Table 3 OD value at 600 nm wavelength and plate colony count results for TSB group and SPSS group

组别 Group	稀释倍数 Dilution gradient (%)	OD 值 OD values	平板菌落计数结果 Plate colony count results (×10 ⁸ CFU/mL)
TSB	100	0.521	7.60
	80	0.410	5.87
	40	0.225	3.00
	20	0.119	1.58
	10	0.057	0.76
	5	0.028	0.36
SPSS	100	0.611	8.13
	80	0.505	6.37
	40	0.255	3.17
	20	0.127	1.61
	10	0.061	0.78
	5	0.032	0.37

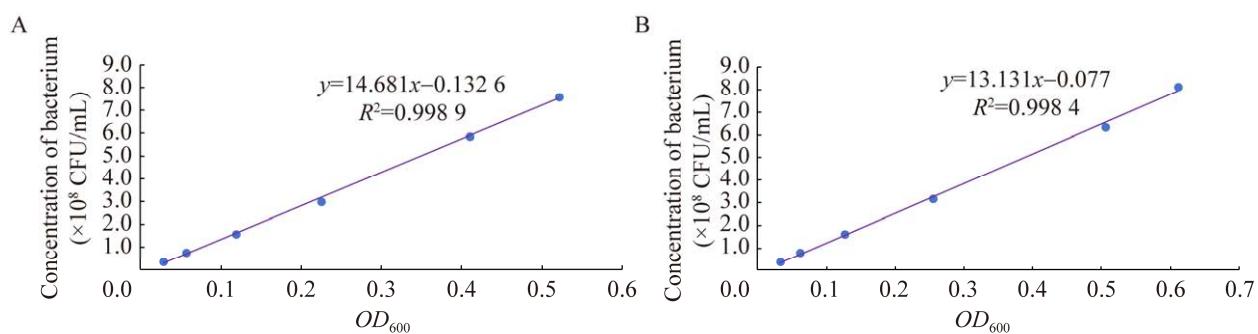


图 2 TSB 组与 SPSS 组的标准曲线

Figure 2 Standard curve for TSB group and SPSS group. A: TSB group. B: SPSS group.

表4 TSB组与SPSS组的线性方程

Table 4 Linear equation for TSB group and SPSS group

稀释组	OD_{600} 值范围	线性方程	R^2
Dilution group	OD_{600} value range	Linear equation	
TSB group	0.028–0.521	$y=14.681x-0.013\ 26$	0.998 9
SPSS group	0.032–0.611	$y=13.131x-0.077$	0.998 4

2.4 分光光度法适用性验证结果与分析

取培养 10、12、14、16 和 18 h 菌液原液，在波长 600 nm 条件下测定的 OD 值并代入线性方程 $y=14.681x-0.013\ 26$ 中计算菌液浓度，同时平板菌落计数，将不同时间点的两组数据使用 SPSS 17.0 软件进行差异性分析，相关结果见表 5。从表 5 可以看出，培养 14 h 内分光光度法与平板菌落计数法测定的副鸡禽杆菌菌液浓度差异不显著($P>0.05$)，具有很好的适用性。

3 讨论与结论

PCC 是检测菌液浓度的直接方法，SP 是检测菌液浓度的间接方法。前者所得结果直接反映出细菌菌液含活菌数，而后者通过测定 OD 值来间接反映菌液的菌体数量。由于菌液中除活菌外，还包括死亡的菌体以及微生物的分泌物等，也具有一定的吸光度，因此需要将两种方法结合起来测定，可使计数结果更为可靠。细菌生长周期包括平台期、对数生长期、稳定期和衰亡期等

4 个阶段，细菌在对数生长期内呈几何级数增加，活菌量远大于死菌量，可忽略不计死菌量，认为细菌的活菌浓度等于细菌浓度，因此可认为吸光度值和细菌活菌浓度之间为成正比关系。同时，因细菌大小不同，其最佳测定波长也不同。如肖敏等^[7-8]在波长 450 nm 条件下测定金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)菌液的 OD 值并建立其与菌液浓度的线性关系；周谔等^[9]在波长 540 nm 条件下测定鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的菌液 OD 值并建立其与菌液浓度的线性关系；马培培等^[10]、谢祯璐等^[11]、王晓旭等^[12]在波长 600 nm 条件下测定大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)、猪链球菌(*Streptococcus suis*)的菌液 OD 值并建立其与菌液浓度的线性关系，曹凯欣等^[13]在波长 650 nm 条件下测定副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌的菌液 OD 值并建立其与菌液浓度的线性关系。本研究借鉴前人

表5 分光光度法测定副鸡禽杆菌菌液浓度适用性验证结果

Table 5 Validation results of the applicability of spectrophotometer for determining the concentration of Apg

培养时间	OD_{600} 值	方程计数结果	平板菌落计数结果
Culture time (h)	OD_{600} value	Curve count result ($\times 10^8$ CFU/mL)	Plate colony count result ($\times 10^8$ CFU/mL)
10	0.491	7.08a	6.97a
12	0.604	8.73b	8.55b
14	0.691	10.01c	9.70c
16	0.741	10.75d	6.83D
18	0.778	11.44e	4.13E

同行数据字母分别为同一字母的大写表示差异显著($P<0.05$)；字母同为同一字母的小写表示差异不显著($P>0.05$)

The labels of peer data indicate significant differences ($P<0.05$) when the letters are in the same case and lowercase; The lowercase letters with the same marker letter indicate no significant difference ($P>0.05$).

经验,选择 450、540、600 和 650 nm 这 4 个波长测定副鸡禽杆菌菌液浓度,并确定波长 600 nm 为其最适测定波长。

因培养基本身也是物质,为排除培养基吸光干扰,在选择最适测定波长研究中,本研究先将副鸡禽杆菌菌液离心沉淀,再用无菌生理盐水稀释以研究不同波长测定的 *OD* 值与菌液浓度的相关性。但是,采用无菌生理盐水稀释后测定菌液浓度既人为地增加实验步骤,又易因操作不当造成误差。从以上研究数据对比分析也可发现,生理盐水悬浮稀释后测定的菌液浓度与用培养基直接稀释的菌液浓度误差为 2.78%–6.97%。为此,本研究设置 SPSS 组和 TSB 组,分别在波长 600 nm 条件下测定 *OD* 值并与 PCC 测定的菌液浓度进行回归分析,结果显示 TSB 组的线性关系优于 SPSS 组的线性关系,说明可直接用 SP 测定菌液原液的 *OD* 值来快速确定菌液浓度。

在细菌动物感染模型研究和免疫攻毒法评价细菌类疫苗效力中,需要知道感染动物的活菌数,以确定细菌对动物的毒力和疫苗的保护效力。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,传统上常采用 PCC 测定活菌数。该方法需要培养 24–48 h 后才能获知结果,而细菌在此期间一直在生长和死亡,工作中只能凭经验估计接种动物的活菌数,易导致模型研究实验或疫苗效力评价失败,需要重新进行实验或评价,浪费时间、精力和动物。本研究通过比较研究 PCC 测定副鸡禽杆菌菌液浓度和 SP 测定菌液 *OD* 值的相关性,初步建立了一种快速测定副鸡禽杆菌菌液浓度的方法,可在短时间内准确测定菌液浓度,大大提高了菌液浓度测定的时效性。

本研究使用的血清 C 型副鸡禽杆菌,据我们前期研究,其平台期为 0–6 h、对数生长期为 6–14 h。在分光光度法适用性验证过程中,其培

养特性符合该细菌的生长规律。正如前文所述,细菌数量在稳定期之前在培养基内呈几何级数增加,培养液中死亡的细菌对 *OD* 值测定的干扰可忽略不计。但是,进入衰退期后死亡的细菌会极大地干扰 *OD* 值的测定(表 5)。因此,该 SP 仅适用于稳定期之前菌液浓度的测定。

REFERENCES

- [1] 刘栋辉,郭梦娇,张昊,谭惠惠,靳逸昆,张小荣,吴艳涛. 副鸡禽杆菌研究进展[J]. 动物医学进展, 2022, 43(7): 95-98.
LIU DH, GUO MJ, ZHANG H, TAN HH, JIN YL, ZHANG XR, WU YT. Progress in the study of *Avibacterium paragallinarum*[J]. Advances in Animal Medicine, 2022, 43(7): 95-98 (in Chinese).
- [2] 杨波,崔倩,刘琳豆,董小艳,张美云,王琼. 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 LD, DONG XY, ZHANG MY, WANG Q. Research advances in the application of animal models for SARS-CoV-2 infection[J]. Journal of Environmental Hygiene, 2022, 12(10): 747-756 (in Chinese).
- [3] MÖRSCHBÄCHER AP, DULLIUS A, DULLIUS CH, BANDT CR, KUHN D, BRIETZKE DT, MALMANN KUFFEL FJ, ETGETON HP, ALTMAYER T, GONÇALVES TE, ORESTE EQ, RIBEIRO AS, de SOUZA CFV, HOEHNE L. Validation of an analytical method for the quantitative determination of selenium in bacterial biomass by ultraviolet-visible spectrophotometry[J]. Food Chemistry, 2018, 255: 182-186.
- [4] ZHENG LB, QI P, ZHANG D. A simple, rapid and cost-effective colorimetric assay based on the 4-mercaptophenylboronic acid functionalized silver nanoparticles for bacteria monitoring[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 260: 983-989.
- [5] 杜青平,王倩,曹立创,张晓彤,曾起豪,邓通初. 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 QP, WANG Q, CAO LC, ZHANG XT, ZENG QH, DENG TC. A study of bacterium growth curve and suspended matter in the medium[J]. Journal of Guangdong University of Technology, 2012, 29(3): 77-80 (in Chinese).

- [6] 代群威, 李琼芳, 杨丽君, 张伟. 环境工程微生物学实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
DAI QW, LI QF, YANG LJ, ZHANG W. Experiments in Microbiology for Environmental Engineering[M]. Beijing: Chemical Engineering Press, 2010 (in Chinese).
- [7] 肖敏, 杨峰, 王旭荣, 罗金印, 李新圃, 陈昊然, 李宏胜. 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 XR, LUO JY, LI XP, CHEN JR, LI HS. Establishment of concentration determination of *Staphylococcus aureus* by spectrophotometry[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2014, 35(11): 40-43 (in Chinese).
- [8] 肖敏, 杨峰, 王旭荣, 罗金印, 李新圃, 贾宁, 李宏胜. 奶牛乳房炎无乳链球菌活菌数与吸光度之间相关性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(5): 271-274.
XIAO M, YANG F, WANG XR, LUO JY, LI XP, JIA N, LI HS. Relations between bacterial count and absorbance of *Streptococcus agalactiae* in bovine mastitis[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(5): 271-274 (in Chinese).
- [9] 周谔, 李睿, 朱鸿雁, 张志超, 方静, 唐黎明. 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): 62-66.
ZHOU S, LI R, ZHU HY, ZHANG ZC, FANG J, TANG LM. An optical density method for determining bacterial concentrations in the *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay[J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2020, 32(1): 62-66 (in Chinese).
- [10] 马培培, 苏梦茹, 李鑫鑫, 刘沉, 李妍, 姚倩, 郭抗抗. 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 PP, SU MR, LI XX, LIU C, LI Y, YAO Q, GUO KK. Establishment and application of *Escherichia coli* counting method based on spectrophotometer[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2020, 41(5): 29-33 (in Chinese).
- [11] 谢祯璐, 杨梦婕, 顾康蝶, 赵雨欣, 周成希, 赖先军, 颜朗. 分光光度计法测定不同分离源青枯雷尔氏菌菌液浓度[J]. 西昌学院学报(自然科学版), 2022, 36(2): 13-16.
XIE ZL, YANG MJ, GU KD, ZHAO YX, ZHOU CX, LAI XJ, YAN L. Spectrophotometric method for the determination of bacterial liquid concentration of *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of Xichang University (Natural Science Edition), 2022, 36(2): 13-16 (in Chinese).
- [12] 王晓旭, 徐峰, 沈丽萍, 宁昆, 张维谊. 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.
WANG XX, XU F, SHEN LP, NING K, ZHANG WY. Determination of *Streptococcus suis* suspension concentration by spectrophotometry[J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017(5): 40-41 (in Chinese).
- [13] 曹凯欣, 邱佩佩, 贺锦灿, 邹志辉, 白研, 毋福海. 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.
CAO KX, QIU PP, HE JC, ZOU ZH, BAI Y, WU FH. Rapid determination of three kinds of bacterial suspension by resonance Rayleigh scattering method and spectrophotometry[J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2019, 35(5): 619-623 (in Chinese).