

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

T/CVDA

团 体 标 准

T/CVDA XXXX—XXXX

紫外-可见分光光度法测定活菌浓度指南

Guidelines for the determination of Viable Bacterial Concentration by Ultraviolet-Visible spectrophotometry

（征求意见稿）

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

中国兽药协会 发 布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语与定义 1

4 缩略语 1

5 试验材料 1

6 试验操作 1

 6.1 安全防护 1

 6.2 建立细菌生长曲线 1

 6.3 最佳测定波长的确定 2

 6.4 适用性验证 2

 6.5 注意事项 3

附录 A（资料性） 细菌生长曲线图例..... 4

参考文献 5

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由中国兽药协会提出并归口管理。

本文件起草单位：中国兽医药品监察所、中国动物卫生与流行病学中心、山东省动物疫病预防与控制中心、中国合格评定国家认可中心

本文件主要起草人：姚文生、马欣、王秀丽、王甲、刘元杰、刘燕、岳怀宁、王君玮、王苗利、陶雨风、富宏坤。

紫外-可见分光光度法测定活菌浓度指南

1 范围

本文件规定了紫外-可见分光光度法测定活菌浓度的实验操作方法以及其应用。
本文件适用于紫外-可见分光光度法测定细菌菌悬液活菌浓度的操作。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求
中华人民共和国兽药典

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

测定系数 (R^2) R-squared

是统计学中用来衡量回归模型拟合优度的一个指标，数值介于0~1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。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件

OD: 吸光度 (Optical Density)

CFU: 菌落形成单位 (Colony-forming Unit)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate-Buffered Saline)

5 试验材料

无菌生理盐水、硫酸盐缓冲液 (PBS)、细菌培养基、比色杯 (测量精度 $\leq \pm 0.005$ OD, 测值范围0~2.0 OD)、细菌培养皿、移液器、吸头、吸管、试管、生物安全柜、恒温培养箱、分光光度计 (可用波长范围应包括450nm~650nm, 测量精度 $\leq \pm 0.003$ OD, 光度准确度 $\pm 1\%$, 测值范围0~2.0 OD)、离心机、漩涡仪。

6 试验操作

6.1 安全防护

实验应在符合GB 19489的生物安全实验室内进行。实验人员个人防护应符合GB 19489要求。实验废物应经消毒或灭菌处理。

6.2 建立细菌生长曲线

6.2.1 在生物安全柜将细菌接种于适宜固体培养基平板，置于适宜温度条件下培养适宜时间。

6.2.2 从培养基平板上选取单个菌落，接种适宜液体培养基，置于适宜温度条件下培养适宜时间。

6.2.3 选取不同培养时间（如：2h、4h、6h 等）的新鲜菌液，分别按照《中华人民共和国兽药典》三部附录 3405 活菌（芽孢）计数法进行活菌计数，计算不同培养时间的菌液浓度（CFU/ml）。

6.2.4 依据菌液浓度计数结果，建立细菌生长曲线（见附录 A），确定细菌生长迟缓期、对数期、稳定期和衰亡期。

6.3 最佳测定波长的确定

6.3.1 菌悬液制备

6.3.1.1 培养新鲜菌液，选择细菌生长对数期或稳定期前期的培养菌液，用于测定 OD 值和活菌计数。

6.3.1.2 将新鲜菌液离心后弃去上清液，用无菌生理盐水或 PBS 恢复至原体积，在漩涡仪震荡悬浮，制备成菌悬液原液。

6.3.1.3 吸取菌悬液原液，用无菌生理盐水或 PBS 进行适当倍数稀释，震荡悬浮，制备成不同稀释度的待测菌悬液，稀释梯度不少于 5 个。

6.3.2 测定 OD 值

6.3.2.1 在可见光波长范围（450nm~650nm）内选择几个波长（如：450nm、540nm、600nm、650nm 等），作为测定波长。

6.3.2.2 打开分光光度计，预热适当时间。吸取 1~2ml 无菌生理盐水或 PBS，作为空白对照，置于比色杯，使用分光光度计在所选波长条件下测定 OD 值并调零。

6.3.2.3 吸取 1~2ml 待测菌悬液，置于比色杯，使用分光光度计测定相同波长条件下不同稀释度的待测菌悬液 OD 值各 3 次（重复性 $\pm 2\%$ ），计算平均值。因菌体数量太少或太多可能会影响测定结果，OD 值控制在 0.2~0.8 之间为宜。

6.3.3 活菌计数 将不同稀释度的待测菌悬液分别按照《中华人民共和国兽药典》三部附录 3405 活菌（芽孢）计数法进行活菌计数，获得活菌浓度（CFU/ml）。

6.3.4 数据分析与判定

6.3.4.1 选择至少 5 个在 0.2~0.8 范围内 OD 值和对应的活菌浓度，输入 Microsoft EXCEL 进行回归分析。以 OD 值为横坐标（x）、活菌浓度为纵坐标（y），绘制散点图，点击任一散点，添加趋势线。点击趋势线，设置趋势线格式，勾选“显示公式”、“显示 R 平方值”，获得不同波长测定的 OD 值与活菌浓度的回归方程和测定系数（ R^2 ）。Microsoft EXCEL 默认趋势线选项为“线性”，也可将趋势线选项勾选为“指数”，比较 R^2 值大小，选择线性回归方程或曲线回归方程。

6.3.4.2 比较分析不同波长的测定系数（ R^2 ），确定最佳测定波长。

6.3.4.2.1 若有 1 个波长 OD 值与活菌浓度的回归方程测定系数（ R^2 ）大于 0.95，则该波长为该细菌活菌浓度的最佳测定波长。

6.3.4.2.2 若有 2 个以上波长 OD 值与活菌浓度的回归方程测定系数（ R^2 ）大于 0.95，则确定 R^2 最接近 1 的波长为该细菌活菌浓度的最佳测定波长。

6.3.4.2.3 若所有选定的波长 OD 值与活菌浓度的回归方程测定系数（ R^2 ）均小于 0.95，则紫外-可见分光光度法不适宜该细菌活菌浓度的测定。

6.4 适用性验证

6.4.1 培养新鲜菌液，在细菌生长对数期初期至稳定期前期的培养时间段中，选择至少 5 个不同培养时间的菌液，参照 6.3.1.2 制备成待测菌悬液。

6.4.2 参照 6.3.2.2 测定待测菌悬液在最佳测定波长条件下测定 OD 值。参照 6.3.3 进行活菌计数，获得活菌浓度。

6.4.3 参照 6.3.4.1，将 6.4.2 测定的 OD 值和获得的活菌浓度进行回归分析，获得回归方程和测定

系数 (R^2)。若 R^2 值大于 0.95, 则紫外-可见分光光度法适用于该细菌生理盐水或 PBS 菌悬液活菌浓度的测定; 若 R^2 值小于 0.95, 则紫外-可见分光光度法不适宜该细菌生理盐水或 PBS 菌悬液活菌浓度的测定。

6.4.4 扩展验证

6.4.4.1 培养新鲜菌液, 在细菌生长对数期初期至稳定期前期的培养时间段中, 选择至少 5 个不同培养时间的新鲜菌液各 2 份, 3~5ml/份。

6.4.4.2 1 份菌液离心后吸取上清液 1~2ml, 置于比色杯, 使用分光光度计在最佳测定波长条件下测定 OD 值并调零后, 测定另 1 份未离心菌液的 OD 值, 测定前应震荡混匀。将未离心菌液参照 6.3.3 进行活菌计数, 获得活菌浓度。

6.4.4.3 选取至少 5 个在 0.2~0.8 范围内 OD 值和对应的活菌浓度, 参照 6.3.4.1 获得回归方程和测定系数 (R^2)。若 R^2 值大于 0.95, 则紫外-可见分光光度法适用于该细菌培养液活菌浓度的直接测定; 若 R^2 值小于 0.95, 则紫外-可见分光光度法不适宜该细菌培养液活菌浓度的直接测定。

6.5 注意事项

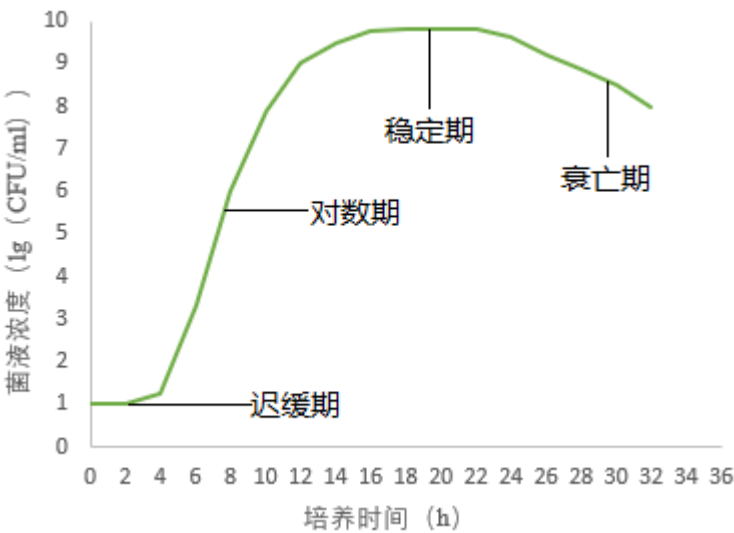
6.5.1 装有液体的比色杯不应有气泡, 否则会影响测量精度。

6.5.2 比色杯使用前应用纯化水清洗干净并晾干。

6.5.3 为确保测量结果准确, 应参照《中华人民共和国兽药典》一部附录 0401 紫外-可见分光光度法, 定期对分光光度计进行校正。

6.5.4 紫外-可见分光光度法测定活菌浓度存在局限性, 不适用于细菌生长稳定期后期和衰亡期活菌浓度的测定。

附 录 A
(资料性)
细菌生长曲线图例



参 考 文 献

- [1] 陆承平, 刘永杰. 2021. 兽医微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社.
 - [2] 肖敏, 杨峰, 王旭荣, 罗金印, 李新圃, 陈炅然, 李宏胜. 2014. 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.
 - [3] 马培培, 苏梦茹, 李鑫鑫, 刘沉, 李妍, 姚倩, 郭抗抗. 2020. 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.
 - [4] 佟仁冬, 冯妍, 刘燕, 张一帆, 任小侠, 郝力力, 朱良全, 姚文生. 2024. 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.
-