# 计数标准微球分散及浓度对酿酒酵母计数的比较

徐娟，陈翔宇，李蒙蒙，林丽军*，陆利霞，刘元建，熊晓辉

（南京工业大学食品与轻工学院，江苏南京 211816）

**摘要：**针对计数标准微球在微生物计数中的微球聚集、使用浓度及统计数量进行分析比较。以计数标准微球和酿酒酵母ATCC9080为实验对象，研究了Tween 20、Tween 80对计数标准微球的分散效果以及标准微球浓度、统计数量对酿酒酵母计数结果的影响，并将标准微球计数结果与平板计数结果进行比较。实验表明计数标准微球在0.08% Tween 20或0.06% Tween 80中的分散效果适宜，可使分散指数为3.30。对每毫升$10^5$、$10^6$、$10^7$个酿酒酵母悬液进行计数时，统计的标准微球总数依次应不小于2 000、1 500、1 000个，统计的细胞总数分别应不小于200、400、2 600个。在每毫升$10^5$~$10^7$个酿酒酵母浓度范围，以每毫升$10^6$个标准微球最适宜，且对酿酒酵母的计数结果与平板计数结果呈线性关系（$R^2$=0.996 9）。结果表明Tween 20或Tween 80可有效分散计数标准微球，采用分散的、适宜浓度的计数标准微球可对微生物悬液进行准确计数，明确了计数标准微球用于微生物计数的适宜参数，补充GB/T 39730-2020标准微球使用条件。

**关键词：**计数标准微球；计数标准微球分散；酿酒酵母；计数标准微球浓度；统计数量

**文章编号：**1673-9078(2023)09-315-322 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.9.1129

# Comparison of Counting Standard Microsphere Dispersion and Concentration for enumerating *Saccharomyces cerevisiae*

**XU Juan, CHEN Xiangyu, LI Mengmeng, LIN Lijun*, LU Lixia, LIU Yuanjian, XIONG Xiaohui**

(College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China)

**Abstract:** The concentration and statistical numbers of counting standard microspheres used for cell counting of the *Saccharomyces cerevisiae* strain (ATCC9080) were selected for analyzing the effects of microsphere aggregation. The dispersion, concentration, and statistical numbers of microspheres in Tween 20 or Tween 80 suspension for *S. cerevisiae* counting were evaluated. In addition, we determined the linearity between standard microsphere counting and plate counting. Our study showed that the dispersion of microspheres in 0.08% Tween 20 or 0.06% Tween 80 suspension was suitable, with a dispersion index of 3.30. For counting $10^5$, $10^6$, and $10^7$ cells/mL of *S. cerevisiae*, the total statistical numbers of standard microspheres should not be less than 2 000, 1 500, and 1 000, respectively. In addition, the total statistical numbers of cells should not be fewer than 200, 400, and 2 600. At $10^5$ to $10^7$ cells/mL of *S. cerevisiae*, the counting results by standard microspheres were consistent with those of the plate counting ($R^2$=0.996 9), with $10^6$ beads/mL of standard microsphere being the most suitable concentration. Our results indicated the standard microspheres could be effectively dispersed by Tween 20 or Tween 80. Hence, microbial cells in suspension can be accurately counted by using an appropriate concentration of dispersed standard microspheres. The suitable parameters of the standard microspheres for microbial counting were identified to provide the application conditions of standard microspheres in GB/T 39730-2020.

**Key words:** counting standard microspheres; counting standard microspheres dispersed; *Saccharomyces cerevisiae*; concentration of counting standard microspheres; statistical amounts

引文格式：

徐娟,陈翔宇,李蒙蒙,等.计数标准微球分散及浓度对酿酒酵母计数的比较[J].现代食品科技,2023,39(9):315-322

XU Juan, CHEN Xiangyu, LI Mengmeng, et al. Comparison of counting standard microsphere dispersion and concentration for enumerating *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(9): 315-322

收稿日期：2022-09-07

基金项目：国家重点研发计划项目（2018YFC1602800）

作者简介：徐娟（1997-），女，硕士研究生，研究方向：食品安全，E-mail：XJahh7@qq.com

通讯作者：林丽军（1979-），男，硕士，讲师，研究方向：食品安全，E-mail：lljnjut@126.com

微球（聚苯乙烯微球）广泛应用于生物医学、分析化学、标准计量以及吸附等领域[1]。荧光修饰的微球可作为计数标准微球对细胞进行计数[2,3]。Cunningham等[4]添加已知浓度计数微球对样品中的病毒进行荧光显微镜计数，结果表明在每毫升 $2.17\times10^6$~$1.37\times10^8$ 个病毒的范围内该方法与膜过滤的计数结果无显著性差异（$P$=0.531）。Ou 等[5]在对浓度为每毫升 $10^4$~$10^8$ 个活死菌进行计数时，发现利用荧光微球的流式细胞术与琼脂平板计数之间线性关系一致。另外，用于流式细胞仪的标准微球类型不同，报道有浓度为每毫升 $1.0\times10^8$ 个的 6.0 μm 微球，浓度为每毫升 $10^6$ 个的 5.0~7.9 μm 微球等[6,7]。但未有研究报道标准微球用于计数不同浓度细胞（病毒）时的适宜使用浓度。

国家标准 GB/T 39730-2020《细胞计数通用要求流式细胞测定法》中对计数标准微球的使用浓度未说明，且对标准微球使用中的聚集问题缺少措施。ISO 20391-1:2018 中对悬浮液中的细胞及微球需要保证均一性，才可实现所取样反映实际样品中的数量。已有研究表明体积分数低于 1%的 Tween 20 和体积分数低于 5%的 Tween 80 可有效降低微生物聚集且不会对细胞活性造成影响[8,9]。但缺少使用 Tween 20 和 Tween 80 促进标准微球的分散研究。本研究中发现，标准微球在液体中会发生聚集、结团现象，导致细胞计数的不准确，且产生显著影响。

依据计数标准微球法，对细胞和微球直接计数时统计的细胞和微球数量与计数结果相关。在显微镜直接计数过程中，当载玻片上统计的细胞或微球数量大于 350 个时，才能获得可靠的结果[10,11]。Braun 等[12]在显微镜计数干燥土壤中的总细胞数实验中要求统计的细胞数量大于 1 000 个。而 GB/T 39730-2020 中仅说明需采集的微球及细胞的数量，但并未说明不同细胞浓度所对应的计数数量。

本文以计数标准微球和酿酒酵母 ATCC9080 为实验对象，研究了计数标准微球的分散条件及微球浓度对酿酒酵母细胞计数的影响，分析了标准微球及细胞统计数量对计数结果的影响，并将标准微球计数与平板计数结果进行了比较，为计数标准微球用于微生物的准确计数提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

计数标准微球（直径 8 μm），知益微球科技有限公司；酿酒酵母 ATCC9080（*S. cerevisiae*），本实验室保藏菌株；0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液（Phosphate Buffer Saline，PBS，pH 值 7.0），上海生工生物工程有限公司；Tween 20 和 Tween 80，国药集团化学试剂有限公司；酵母浸出粉葡萄糖培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基，青岛海博生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

生物显微镜 BM1000，南京江南永新光学有限公司；智能生化培养箱 SHP-100，上海三发科学仪器有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 计数标准微球的悬液制备及分散

##### 1.3.1.1 计数标准微球分散处理实验

（1）Tween 20 对计数标准微球分散的影响

在无菌 PBS 缓冲液中加入不同体积的 Tween 20，得到体积分数为 0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.10%、0.12%的 Tween 20，采用 0.22 μm 滤膜过滤后得到不同体积分数的 PBS 吐温 20 溶液（PBS-Tween 20，PBST2）。称取 0.0150 g 微球粉末分别溶解于 10 mL 无菌 PBS 缓冲液和不同体积分数的 PBST2 中，经超声（50 Hz）分散至无肉眼可见结块后得到待测微球溶液。每个处理组重复三次。以无菌 PBS 缓冲液处理组为对照组，计算不同体积分数 Tween 20 处理的计数标准微球分散指数（I）。

（2）Tween 80 对计数标准微球分散的影响

在无菌 PBS 缓冲液中加入不同体积的 Tween 80，得到体积分数为 0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.10%、0.12%的 Tween 80，采用 0.22 μm 滤膜过滤后得到不同体积分数的 PBS 吐温 80 溶液（PBS-Tween 80，PBST8）。其它同（1）处理，计算不同体积分数 Tween 80 处理的计数标准微球分散指数（I）。

##### 1.3.1.2 计数标准微球分散指数测定

使用血球计数板计数标准微球溶液，观察分散处理前后微球分散情况，分散指数（I）计算见公式 1[8]。

$$I=\frac{T_1-T_0}{T_0} \quad (1)$$

式中：

$I$——分散指数；

$T_1$——分散后标准微球在血球计数板五个中格总数，个；

$T_0$——对照组标准微球在血球计数板五个中格总数，个。

#### 1.3.2 酿酒酵母菌悬液的制备

取用酵母浸出粉葡萄糖培养基在 30 ℃，160 r/min 培养 18 h 的酿酒酵母液体培养液，重悬后用无菌的 PBS 溶液进行十倍稀释得到一系列菌悬液。采用血球计数板对菌悬液进行三次重复计数，选取其中浓度为

每毫升 $10^5$~$10^7$ 个的菌液作为计数标准微球法和平板计数法的计数样品。

### 1.3.3 酿酒酵母浓度计数

#### 1.3.3.1 标准微球计数酿酒酵母浓度

将 0.0150 g 微球粉末溶解于 5 mL 0.08%的 PBST2，用 0.08% PBST2 稀释后经血球计数板计数得到每毫升 $4.25\times10^4$、$8.60\times10^5$、$7.56\times10^6$、$2.17\times10^7$ 个的微球溶液。移取 100 μL 制备的不同浓度微球溶液分别与 100 μL 待测酿酒酵母溶液混匀，制成微球、酿酒酵母的混合溶液后，用扁平玻璃毛细管吸取部分混合溶液在 10×40 倍镜下进行显微镜计数”，随机获取 20~45 个显微镜图像，使用 ImageJ 软件计数图像中酿酒酵母和微球[13]。每个样品进行三次重复并计算平均值及标准差，计算结果间的变异系数（Coefficient of Variation，CV）。

标准微球计数酿酒酵母浓度计算参考 GB/T 39730-2020，见公式 2。

$$C=\frac{N_{cell}}{N_{ball}}\times\frac{Q_{ball}}{V}\times D \quad (2)$$

式中：

$C$——酿酒酵母浓度，个/mL；

$N_{cell}$——单个图像中酿酒酵母的平均数量，个；

$N_{ball}$——单个图像中标准微球的平均数量，个；

$Q_{ball}$——酿酒酵母中添加的计数标准微球总数量，个；

$V$——与标准微球混合的待测酿酒酵母溶液的原体积，mL；

$D$——酿酒酵母溶液的稀释倍数。

#### 1.3.3.2 平板计数酿酒酵母浓度

将标准微球与酿酒酵母混合悬液采用平板计数酿酒酵母浓度，依据 GB 4789.15-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验霉菌和酵母计数》进行。

### 1.4 数据分析

Microsoft Office Excel 2010 软件进行数据处理；Origin 2018 进行图像绘制；IBM SPSS Statistics 26 软件采用沃勒-邓肯法（Waller-Duncan）进行显著性分析，$P<0.05$ 为存在显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 计数标准微球分散处理结果

#### 2.1.1 Tween 20 对计数标准微球分散的影响

在使用流式细胞仪对荧光微球计数之前，先采用涡旋混合器对微球溶液进行混匀，但未说明标准微球是否分散及其效果[14]。图 1 是计数标准微球在不同体积分数 Tween 20 中的分布情况。

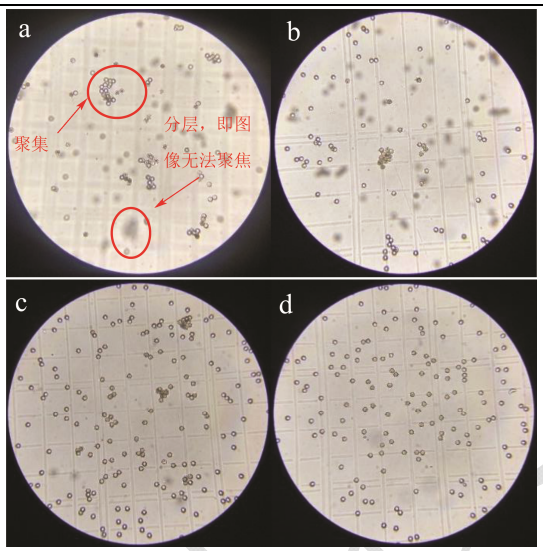



**图 1 不同体积分数的 Tween 20 对计数标准微球分散现象**

**Fig.1 Dispersion of counting standard microspheres with different volume fractions of Tween 20**

注：a：PBS 对照组；b：0.02% Tween 20 处理组；c：0.04% Tween 20 处理组；d：0.08% Tween 20 处理组。

由图 1a 可知计数标准微球在未添加 Tween 20 的 PBS 溶液中存在大量聚集和分层现象（在显微镜图像中有的微球模糊），可见多个计数标准微球聚集体以及部分微球悬浮或沉淀情况。而计数标准微球的聚集会直接影响标准微球计数结果的准确性，因此在计数之前需要对标准微球进行混匀或者分散处理。

由图 1b~1d 可发现，不同体积分数的 Tween 20 促进标准微球分散，并随着 Tween 20 的体积分数增加，微球的聚集和分层现象逐渐改善；且体积分数在 0.08%时微球聚集团变为单个分散的微球，不再分层。分散指数是指处理组与对照组在血球计数板五个中格总数的差值与对照组五个中格总数的比值。对于同一浓度微球悬液，处理后的分散指数越大，则说明与对照组相比，微球聚集减少，进入计数区的粒子数量越多，说明微球分层和聚集导致问题得到了改善。因此可通过分散指数判断分散效果。

由图 2 可知，不同体积分数的 Tween 20 处理组的分散指数较对照组均显著增加（$P<0.05$），表明该处理改善了微球的聚集情况，且随着 Tween 20 体积分数的增加，分散指数先增加后趋于稳定。其中当 Tween 20 体积分数为 0.08%时，酿酒酵母分散指数为 3.32，此后随着 Tween 20 体积分数增加，分散指数变化不显著（$P>0.05$），即体积分数为 0.08%~0.12%的 Tween 20 对标准微球均有促分散效果。但增大 Tween 20 体积分数，在分散时会产生较多气泡。Brando 等[15]发现涡旋或混匀时产生的微气泡会聚集微球并使得移取液中微球的数量发生变化。研究表明 0.2%~1.0% Tween 20 不

会影响酿酒酵母细胞活性[8]。因此采用更低体积分数的0.08% Tween 20的微球溶液计数酿酒酵母也不会对其活性造成影响。另外如图3所示，实验中发现在含0.08% Tween 20的微球溶液中，除去因出芽繁殖形成的少数聚集外，酿酒酵母并未出现明显的聚集。Cilliers等[16]在奶酪匀浆中回收微生物群时，使用0.02% Tween 20和1 mmol/L EDTA来对微生物进行分散。然而在0.08% Tween 20中微球仍会存在极少数2~3个微球聚集（图1d），但这部分聚集仅占计数区域微球总数的1%，并不会对计数结果造成误差。

计数标准微球易发生团聚现象并且表面具有疏水性，疏水作用使微球在PBS溶液中无法形成稳定的溶液[17]。Tween 20是一种常用的非离子型表面活性剂，能在微球表面增加羧基、醚类等亲水性基团，可改善微球在水溶液中的分散，使得微球在溶液中能够均匀分散[18]。Jodar-Reyes[19]等也报道两亲性分子吸附在聚苯乙烯乳胶颗粒表面主要是依靠表面疏水区域之间的疏水吸引。因此通过Tween 20可改善标准微球聚集。

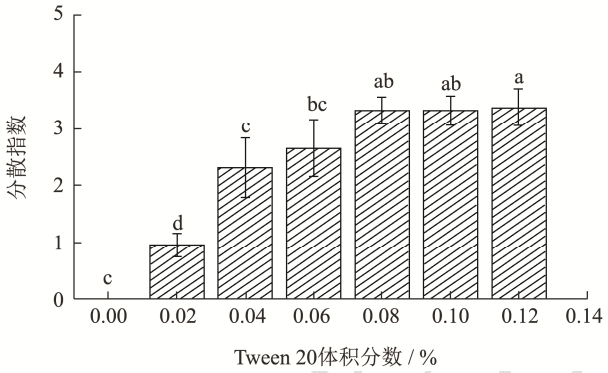



图2 不同体积分数的Tween 20对计数标准微球分散指数的影响

**Fig.2 Effect of different volume fractions of Tween 20 on the dispersion index of counting standard microspheres**

注：图中数据以平均值（mean）±标准差（SD）表示，其中不同字母表示有显著性差异（$P$<0.05）。图5同。

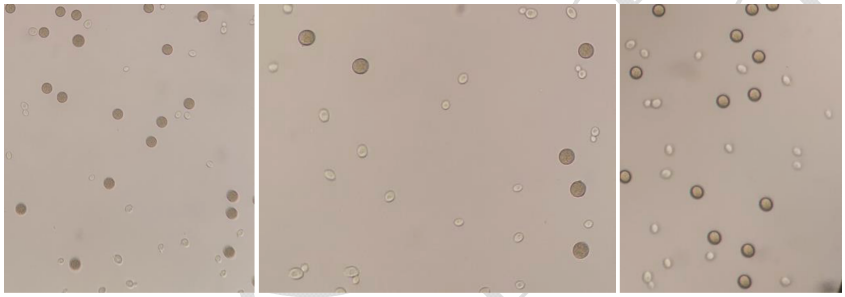


图3 酿酒酵母在含有0.08% Tween 20的微球溶液中的分散状态

**Fig.3 Dispersion of *S. cerevisiae* in a microsphere solution containing 0.08% Tween 20**

### 2.1.2 Tween 80对计数标准微球分散的影响

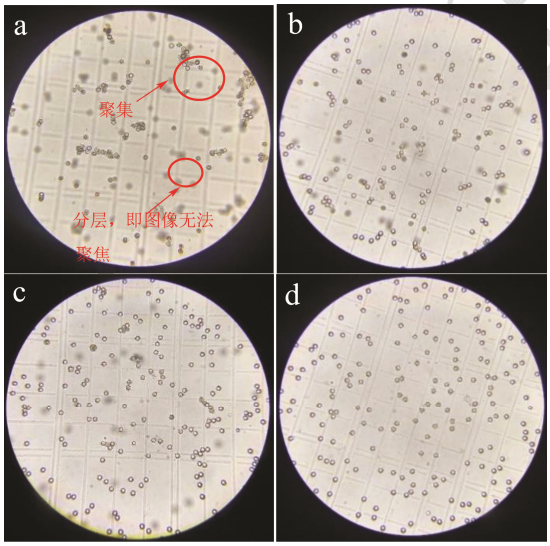



图4 不同体积分数Tween 80对计数标准微球分散现象

**Fig.4 Dispersion of counting standard microspheres with different volume fractions of Tween 80**

注：a：PBS对照组；b：0.02% Tween 80处理组；c：0.04% Tween 80处理组；d：0.06% Tween 80处理组。

图4是计数标准微球在不同体积分数的Tween 80中的分布情况。由图4a可知，计数标准微球在未添加Tween 80的PBS溶液中存在计数标准微球聚集体以及部分微球悬浮或沉淀情况。与对照组相比，随着Tween 80体积分数增加，微球聚集的现象逐渐改善，微球聚集团减少并呈现单个分散的微球，表明Tween 80有助于计数标准微球的分散。

根据图5可知，随着Tween 80体积分数的增加，分散指数先增加后趋于稳定。其中当Tween 80体积分数为0.06%时，酿酒酵母分散指数为3.37，此后随着Tween 80体积分数增加，分散指数变化不显著（$P$>0.05）。与对照组相比，Tween 80对计数标准微球的分散有显著效果（$P$<0.05），且当Tween 80体积分数达到0.06%~0.12%，分散结果达到最佳。与0.08% Tween 20相比，0.06% Tween 80也能使微球的最大分散指数达到3.30。

与Tween 20类似，Tween 80是一种亲水性的表面活性剂，其分子结构中含有亲脂性的脂肪链和亲水性的氧乙烯链，对疏水性物质有助溶作用。因此加入Tween 80可能改变聚苯乙烯微球表面的疏水性，从而促进微球聚集体的分散。此外，对油脂类样品中微

生物进行计数时，也常使用 Tween 80 形成均匀分散溶液，且 5% Tween 80 不会影响菌落总数的平板计数结果[9,20]。

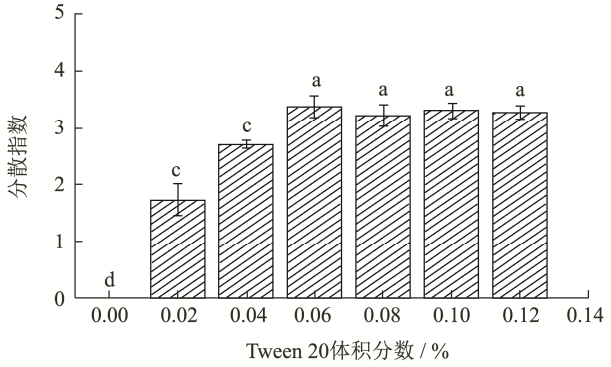



图 5 不同体积分数的 Tween 80 对计数标准微球分散指数的影响

**Fig.5 Effect of different volume fractions of Tween 80 on the dispersion index of counting standard microspheres**

## 2.2 计数标准微球浓度对不同浓度酿酒酵母细胞计数的影响

采用已知数量的微球对酿酒酵母进行计数是利用单个图像中酿酒酵母细胞与微球数量的比值等于原混合溶液中两者的比例，从而间接计算出待测酿酒酵母细胞的数量。当流式细胞仪无法精确控制或监测检测样本的体积，可通过加入已知数量的微球获得细胞的浓度[21]。为获得计数酿酒酵母细胞适宜的微球浓度，实验分别使用不同浓度的标准微球对酿酒酵母菌液进行计数。

实验发现，采用浓度小于每毫升 $10^5$ 个的标准微球进行计数，大量图像中无微球存在，单个图像中微球平均数量小于 1 个。即微球浓度太低会导致其在单个图像中分布的数量较少，计数结果的稳定性差。Seo 等[22]报道单个显微图像的细胞数小于 45 个会导致细胞计数结果之间的高度差异。当过滤器上细菌细胞数量小于 $10^5$ 个时，显微镜计数会高估真实细菌浓度且高估范围为 15.0%~99.3%[23]。另外，当标准微球的浓度大于每毫升 $10^7$ 个时，导致整个图像中全部被微球充满，而影响对酿酒酵母细胞的识别统计。因此实验选取每毫升 $10^5$、$10^6$、$10^7$ 个标准微球进行分析。

对不同浓度酿酒酵母分别添加不同浓度计数标准微球，采集显微图像后，计算获得酿酒酵母浓度结果见表 1。表 1 表明，同一酿酒酵母样品添加每毫升 $10^5$~$10^7$ 个微球，对酿酒酵母浓度结果无显著影响（$P$＞0.05）。但通过比较添加不同浓度微球计数酿酒酵母的变异系数 CV 可知，对每毫升 $10^5$~$10^7$ 个酿酒酵母进行计数使用每毫升 $10^6$ 个的微球更优，且不同比例时组内变异系数分别为 5.13%、1.56%、3.47%。

表 1 不同浓度计数标准微球对酿酒酵母的计数结果

**Table 1 Results of counting *S. cerevisiae* by different concentrations of counting standard microspheres**

| 指标 | 每毫升$10^5$个 | | | 每毫升$10^6$个 | | | 每毫升$10^7$个 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 微球浓度:菌浓度 | 1:1 | 10:1 | 100:1 | 1:10 | 1:1 | 10:1 | 1:100 | 1:10 | 1:1 |
| 图像数/个 | 45 | 45 | 45 | 30 | 30 | 30 | 20 | 20 | 20 |
| 酿酒酵母浓度/(个/mL) | $5.51\times10^{5a}$ | $6.16\times10^{5a}$ | $5.42\times10^{5a}$ | $1.74\times10^{6a}$ | $1.65\times10^{6a}$ | $1.62\times10^{6a}$ | $1.60\times10^{7a}$ | $1.59\times10^{7a}$ | $1.46\times10^{7a}$ |
| 标准差/(个/mL) | $3.87\times10^{4}$ | $3.16\times10^{4}$ | $2.94\times10^{4}$ | $1.05\times10^{5}$ | $2.58\times10^{4}$ | $4.54\times10^{4}$ | $7.85\times10^{5}$ | $5.52\times10^{5}$ | $6.08\times10^{5}$ |
| CV/% | 7.02 | 5.13 | 5.42 | 6.03 | 1.56 | 2.80 | 4.91 | 3.47 | 4.16 |

注：表中字母表示的显著性（$P$<0.05）均为同一浓度酿酒酵母样品加入不同比例标准微球后实验组间结果的比较。

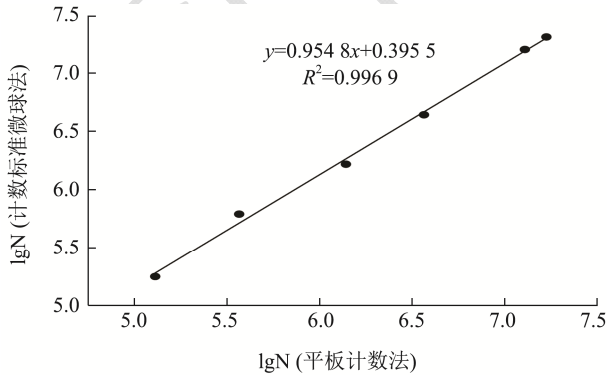



图 6 两种计数结果的相关性曲线

**Fig.6 Correlation curve between the counting results of the two methods**

图像计数结果的准确性与采集的图像数量有关。Muthukrishnan 等[10]发现当载玻片上细菌不均匀分布时，至少需要计算 20 个随机图像或 350 个细菌细胞，才能可靠地估算载玻片上的细菌总数。Lander 等[24]报道显微镜和原型激光扫描细胞仪对微球的计数结果存在波动，这是因为计数时随机选取的计数区域小，小于计数滤膜总面积的 10%，该方法的随机性在对低浓度的粒子计数时会变得更加明显。从表 1 结果表明与每毫升 $10^6$~$10^7$ 个的酿酒酵母相比，每毫升 $10^5$ 个酿酒酵母在单个图像中的分布数量差异大，进而使计数结果的变异系数大。因此对于低浓度样品需要统计更多的图像才能使计数结果趋于稳定。在本研究中也发现对每毫升 $10^5$~$10^7$ 个酿酒酵母计数，对应地采集图像数分别大于 32、20、12 个时计数结果趋于稳定。因

此为保证计数结果准确，对每毫升 $10^5$~$10^7$ 个酿酒酵母分别采集 45、30 和 20 个图像。

平板计数与标准微球计数酿酒酵母的结果如表 2 所示。统计学检验结果显示对于同一样品，两种定量检测结果间均无显著性差异（$P$＞0.05）。另外，如图 6 所示，两种计数方法的拟合曲线为 $y$=0.954 8$x$+0.395 5，相关系数 $R^2$=0.996 9，说明两者有较好的相关性，即使用标准微球计数的结果也是准确的。

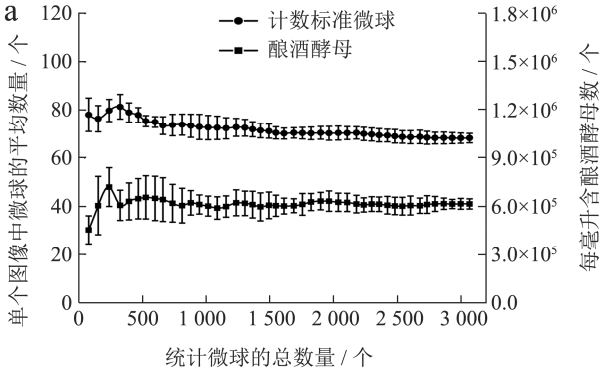
表 2 两种计数方法对酿酒酵母计数的结果

**Table 2 Results of counting *S. cerevisiae* by two counting methods**

| 样品编号 | 平板计数法 | | | 计数标准微球法 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 菌液浓度/(CFU/mL) | 菌液浓度 lg 值 | 变异系数/% | 菌液浓度/(个/mL) | 菌液浓度 lg 值 | 变异系数/% |
| 1 | $1.29\pm0.10\times10^5$ | 5.11 | 7.69 | $1.77\pm0.22\times10^5$ | 5.25 | 12.43 |
| 2 | $1.40\pm0.20\times10^6$ | 6.15 | 14.29 | $1.65\pm0.03\times10^6$ | 6.22 | 1.82 |
| 3 | $1.30\pm0.09\times10^7$ | 7.11 | 6.65 | $1.59\pm0.06\times10^7$ | 7.20 | 3.77 |
| 4 | $3.70\pm0.26\times10^5$ | 5.57 | 7.15 | $6.16\pm0.51\times10^5$ | 5.79 | 8.28 |
| 5 | $1.70\pm0.10\times10^7$ | 7.23 | 5.88 | $2.04\pm0.09\times10^7$ | 7.31 | 4.42 |
| 6 | $3.70\pm0.17\times10^6$ | 6.57 | 4.68 | $4.38\pm0.27\times10^6$ | 6.64 | 6.17 |

## 2.3 采集的计数标准微球数量对不同浓度酿酒酵母计数的影响

对于微生物计数，一般要求计数结果应保持在平均值±2SD 范围内。另外，计数标准微球法中要求采集微球的总数目不应少于 1 000 个[25]。实验选取每毫升 $10^6$ 个标准微球对每毫升 $10^5$~$10^7$ 个酿酒酵母进行计数，每个样品进行 3 次重复，不同标准微球统计量对酿酒酵母计数结果的影响如图 7 所示。从图 7 表明，统计的微球总数量分别大于 2 000 个（采集细胞总数量大于 200 个）、1 500 个（采集细胞总数量大于 400 个）、1 000 个（采集细胞总数量大于 2 600 个）时，酿酒酵母计数浓度和单个图像中微球的平均数量趋于稳定，标准差逐渐减小。此时图 7a~c 中单个图像中微球的平均数量分别为 68 个、69 个、72 个，表明单个图像中微球的平均数量始终保持在平均值±2SD 范围内（69.75±3.93 个）。该结果补充了 GB/T 39730 中需要统计的微球及细胞数量，可更准确、方便获得细胞计数结果。



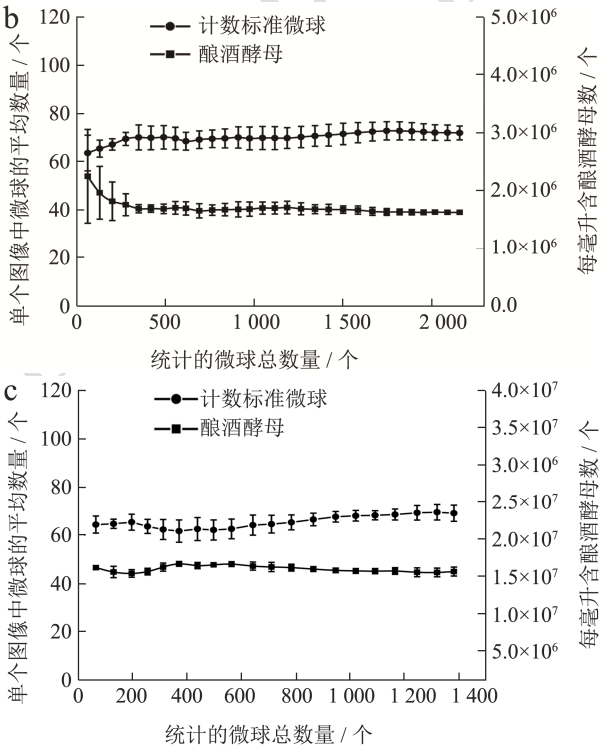




图 7 统计的微球总数量对酿酒酵母浓度和单个图像中微球的平均数量的影响

**Fig.7 Effect of total statistical amounts of microsphere on the concentration of *S. cerevisiae* and the average number of microspheres in individual image**

注：图 7 中数据以平均值（mean）±标准差（SD）表示，分别为以每毫升 $10^6$ 个标准微球对每毫升 $10^5$ 个（a），每毫升 $10^6$ 个（b），每毫升 $10^7$ 个（c）酿酒酵母计数的结果。

## 3 讨论

在采用标准微球对不同浓度微生物计数时，微球

的分散、使用浓度以及对应的统计数量对计数结果有重要意义。已有研究表明微球聚集或取样以及溶液中存在微气泡均会导致计数结果出现偏差[15]。ISO 20391-1:2018 中也提到聚集体或凝聚体会导致细胞计数不足，在计数前需制备分散良好的样品。为解决标准微球聚集问题，本研究表明 0.08% Tween 20 或 0.06% Tween 80 可有效分散计数标准微球，其较 PBS 对照组分散指数分别提高了 3.32 和 3.37，微球浓度提高了 4 倍，表明微球分散均匀对结果的重要作用。这与 Chae 等[11]的研究成果一致，他认为微球在滤膜表面的分布不均会导致计数有偏差，因此在对微球进行计数时需要保证分布均匀，提高计数结果的准确性。

为确定标准微球用于计数不同浓度细胞时的适宜使用浓度，本研究表明，与每毫升 $10^5$ 个微球对每毫升 $10^5$~$10^7$ 个酿酒酵母计数相比，使用每毫升 $10^6$ 个微球得到的计数结果数据稳定。这是因为当微球浓度过低时移取液中微球为泊松分布[26]。依据计数微球粒径，当标准微球的浓度高于每毫升 $10^7$ 个时，微球会铺满整个图像进而影响对目标细胞的识别与统计。因此，选择适宜的计数微球浓度可利于结果的准确性，也为计数标准微球的应用提供参数。

此外，对微生物进行直接计数需明确统计数量，如显微镜计数样品至少需要统计 400~1 000 个细菌细胞[12,27]。通过本研究的统计分析，确立不同浓度细胞需要统计的微球数量，不同于 GB/T 39730-2020 中统计 1 000 个微球的要求，表明为准确获得细胞浓度需增加微球数量至 2 000 个。

本研究将计数标准微球与显微镜图像结合，为微生物快速计数提供了依据。传统的显微镜计数需已知测定的体积或者面积，当载玻片上形成菌膜的具体面积未知时，需要对载玻片上涂片的全部区域进行采集[28]。本实验基于微球计数无需已知计数室体积，利用微球与酿酒酵母的比例进行计数，可在普通的载玻片上或者在不能准确定量计数溶液的体积或过滤面积时进行计数。而传统荧光显微镜计数是基于膜面积进行细菌计数，检测成本高[29,30]。因此可进一步研究在载玻片上采用计数标准微球法代替膜过滤的方法对细菌进行计数。

## 4 结论

实验表明 0.08% Tween 20 溶液和 0.06% Tween 80 溶液对微球的分散效果最佳，分散均匀的标准微球可用于微生物的准确计数。以每毫升 $10^5$~$10^7$ 个酿酒酵母为分析对象，每毫升 $10^6$ 个标准微球对酿酒酵母计数结果的稳定性最好，统计的微球数量分别应不小于 2 000、1 500、1 000 个，细胞数量分别应不小于 200、400、2 600 个。在该计数条件下，其计数结果与平板计数结果一致。使用同一标准微球对不同浓度酿酒酵母组计数的单个图像中微球平均数量始终保持在平均值±2SD 范围内，可准确获得酿酒酵母浓度，明确了 GB/T 39730-2020 标准微球使用条件。

## 参考文献


[1] 孟子晖,张峰.聚苯乙烯微球在污染物吸附领域的研究进展[J].包装工程,2021,42(10):32-36.

[2] Saraiva L, Wang L L, Kammel M, et al. Comparison of volumetric and bead-based counting of $CD34^+$ cells by single-platform flow cytometry [J]. Cytometry Part B Clinical Cytometry, 2019, 96(6): 508-513.

[3] Mortazavi S, Ardalan F A, Nodehi S R, et al. True volumetric method for flow cytometric enumeration of $CD34^+$ stem cells and its agreement with a standard bead-based single-platform protocol [J]. Cytotherapy, 2012, 14(5): 621-629.

[4] Cunningham B R, Brum J R, Schwenck S M, et al. An inexpensive, accurate, and precise wet-mount method for enumerating aquatic viruses [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(9): 2995-3000.

[5] Ou F, McGoverin C, Swift S, et al. Absolute bacterial cell enumeration using flow cytometry [J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(2): 464-477.

[6] Thermofisher Scientific. Live/dead® BacLight™ bcaterial viability and counting kit (L34856) product information [EB/OL]. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp34856. pdfr, 2004.

[7] 上海甄准生物科技有限公司.流式细胞仪用绝对计数荧光微球[EB/OL].https://www. biomart. cn/news/16/109200. htm, 2014.

[8] 陈翔宇,李雪松,徐娟,等.促进酿酒酵母在溶液体系中分散研究[J].食品与发酵工业,2022,48(15):102-109.

[9] 杨清山,王磊,程淑君,等.吐温 80 在油脂类样品微生物检测中的应用研究[J].食品研究与开发,2013,34(3):75-77.

[10] Muthukrishnan T, Govender A, Dobretsov S, et al. Evaluating the reliability of counting bacteria using epifluorescence microscopy [J]. Journal of Marine Science and Engineering, 2017, 5(1): 4.

[11] Chae G T, Stimson J, Emelko M B, et al. Statistical assessment of the accuracy and precision of bacteria-and virus-sized microsphere enumerations by epifluorescence microscopy [J]. Water Research, 2008, 42(6-7): 1431-1440.

[12] Braun B, Bockelmann U, Grohmann E, et al. Polyphasic

characterization of the bacterial community in an urban soil profile with in situ and culture-dependent methods [J]. Applied Soil Ecology, 2006, 31(3): 267-279.

[13] 何宝林,杨晚竹,陈婷,等.ImageJ 软件在显微图像细胞计数中应用的可行性研究[J].医疗卫生装备,2022,43(2):13-18,35.

[14] Wang L L, Zhang Y Z, Choquette S, et al. Measurement of microsphere concentration using a flow cytometer with volumetric sample delivery [J]. Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology, 2014, 199: 629-643.

[15] Brando B, Barnett D, Janossy G, et al. Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood [J]. Cytometry, 2000, 42(6): 327-346.

[16] Cilliers J J, Harrison S T L. Yeast flocculation aids the performance of yeast dewatering using mini-hydrocyclones [J]. Separation and Purification Technology, 2019, 209: 159-163.

[17] 王腾.聚苯乙烯的制备及其性能研究[D].西安:西安石油大学,2017.

[18] 苏琳,李洁,初巧妹,等.非离子型表面活性剂 Tween 20 对大尺寸双层空心微球制备的影响[J].强激光与粒子束,2015, 27(12):103-108.

[19] Jodar-Reyes A B, Ortega-Vinuesa J L, Martin-Rodriguez A, et al. Adsorption of different amphiphilic molecules onto polystyrene lattices [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2005, 282(2): 439-447.

[20] 田金秋,张萍,郑大威,等.Tween 80 与 Span 80 在食品添加剂微生物学检验中的应用[J].中国农学通报,2012,28(33):307-310.

[21] Ou F, Mcgoverin C, White J, et al. Bead-based flow-cytometric cell counting of live and dead bacteria [J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 1968: 123-134.

[22] Seo E Y, Ahn T S, Zo Y G, et al. Agreement, precision, and accuracy of epifluorescence microscopy methods for enumeration of total bacterial numbers [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(6): 1981-1991.

[23] Lisle J T, Hamilton M A, Willse A R, et al. Comparison of fluorescence microscopy and solid-phase cytometry methods for counting bacteria in water [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(9): 5343-5348.

[24] Lander D A, Lee B W, Clark M M. Laser scanning cytometry for enumeration of fluorescent microspheres [J]. Journal American Water Works Association, 2007, 99(3): 110-117.

[25] Grogan W M, Collins J M. Guide to Flow Cytometry [M]. USA: Dako Carpinteria, 2006.

[26] Cragg B A, Parkes R J. Bacterial and Archaeal direct counts: A faster method of enumeration, for enrichment cultures and aqueous environmental samples [J]. Journal of Microbiology Methods, 2014, 98: 35-40.

[27] Shibata A, Goto Y, Saito H, et al. Comparison of SYBR Green I and SYBR Gold stains for enumerating bacteria and viruses by epifluorescence microscopy [J]. Aquatic Microbial Ecology, 2006, 43(3): 221-231.

[28] 郑东辉.乳制品中细菌总数、酵母菌和霉菌快速检测方法的研究[D].长春:吉林大学,2013.

[29] Silva T P, Noyma N P, Duque T L A, et al. Visualizing aquatic bacteria by light and transmission electron microscopy [J]. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 2014, 105(1): 1-14.

[30] Maruyama F, Yamaguchi N, Kenzaka T, et al. Simplified sample preparation using frame spotting method for direct counting of total bacteria by fluorescence microscopy [J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 59(3): 427-431.