

Turbidimetriás sejtsűrűség-mérés

VAS KÁROLY

Konzerv-, Hús- és Hűtőipari Kutatóintézet, Budapest

Bevezetés

Mikroorganizmusok tenyészeiben az egységnyi térfogatban lévő sejtek számát («csiraszám»), illetőleg a sejtanyag mennyiségét («sejtsűrűség») sokféleképpen szokták mérni. Ha csak az élő (szaporodásra képes) sejtek számáról van szó, tenyésztési eljárásokat kell alkalmazni (lemezöntést vagy a hígítási módszert). Ha az összes jelenlevő sejtek meghatározása a cél, akkor sok, részben direkt, részben közvetett eljárás jöhet számításba. Így pl. a mikroszkópos számolás (hemacitóméterrel), a sejtszárazanyag szűrés vagy centrifugálás utáni meghatározása, a sejttömeg nitrogéntartalmának mérése, valamely jellegzetes anyagcseretermék meghatározása stb. Ujabbán leginkább a mikrobajelzők szuszpenziójának zavarosságát szokták mérni, mégpedig vagy az általa elnyelt fényel (turbidimetria) vagy a ráeső fény szóródásával (nefelometria). Ezek ma a legkényelmesebb, leggyorsabb és így sorozatvizsgálatokra legalkalmasabb eljárások.

A tapasztalat azt bizonyítja [például Monod (3)], hogy ha egyforma alakú, de különböző nagyságú sejtekről van szó, a kapott fényelnyelés, illetőleg fényelnyelés nem annyira a ml-enkénti sejtszámtól, mint inkább az egységnyi térfogatban levő sejtanyagmennyiségtől, tehát a «sejtsűrűség»-től függ. Mindenestre, ha nagyságrendileg azonos sejtek szuszpenziójáról van szó, akkor a csiraszámra is lehet következtetni az optikai adatokból.

Az eljárások a fényelnyelés és fényelnyelés jelenségein alapszanak. Mestre (2) szerint a mikrobajelzők szuszpenziójára eső fény (P_0) egy kis része a készülék üvegrészein reflektálódik, elnyelődik a szuszpenzióra jutás előtt. A maradék fény (P_m) egy részét (P_a) elnyelik, egy másik részét átengedik magukon vagy reflektálják a sejtek, ez a szóródott fény (P_s). A maradék (P_u) eltérítés nélkül megy tovább a megvilágítás irányában. Végül is a mérőkészülék leolvasó részébe, illetőleg a fotocellára P fény jut. A szuszpenzió optikai sűrűségét (extinkcióját) a

$$D = \log \frac{P_m}{P}$$

képlet adja meg. A P értéke a P_u -ból és a szóródásnak a fény irányában jelentkező részéből ($d \cdot P_s$) tevődik össze. Vagyis $D = \log P_m - \log (P_u + d \cdot P_s)$,

Nagyobb töménységű szuszpenziókban a d faktor nagyobb és így az extinkció értéke kisebb lesz, mint azt a sejtsűrűség alapján várni lehetne. Ezért van az, hogy a sejtsűrűség és a fényelnyelés, illetőleg fényelnyelés között az összefüggés nem lineáris. Görbült vonalat kapunk, ha ismert sejtsűrűségű szuszpenziók optikai adatait koordinátarendszerben felrajzoljuk. Minden esetben ilyen kalibrációs görbét kell tehát szerkeszteni, melyből grafikus interpolálással lehet a főkísérletben kapott optikai adatokból a sejtsűrűsége következtetni.

A grafikus interpolálás ismert nehézségei, illetőleg pontatlansága miatt hasznos volna, ha a mért turbidimetriás, illetőleg nefelometriás adatból képlet vagy táblázat segítségével lehetne a sűrűséget kiszámítani.

Ilyen irányban régebben Mestre (2) és Longsworth (1), újabban pedig Toennies és Gallant (4) végeztek kísérleteket. Az első két szerző saját szerkesztésű fényelektromos koloziméterrel üvegváltóban, fehér fényben mérte a szuszpenziók fényelnyelését.

Mestre azt tapasztalta, hogy speciális készülékében *Escherichia coli* körülbelül 10^7 – 10^9 sejt/ml-es szuszpenzióival dolgozva, 0,007 és 0,484 közötti extinkciónál lineáris összefüggés mutatkozik, nagyobb koncentrációnál azonban már görbe vonal jellemzi a (sejtsűrűség: fényelnyelés)-összefüggést.

Longsworth továbbmenőleg képletet is állapított meg erre az összefüggésre:

$$D = a \cdot C - \beta^2 \cdot C^2 \quad \bullet$$

ahol D az extinkció értéke, C a sejtsűrűség, a és β állandók. Ez láthatólag egy parabola egyenlete. *L. acidophilus*-nál $a = 0,505$, $\beta^2 = 0,0725$, élesztőnél (*S. cerevisiae* Hansen) $a = 0,358$, $\beta^2 = 0,0064$ volt 0,003 és 0,433 közötti D -értékek esetén.

Toennies és Gallant a fenti képlet továbbfejlesztésével megkísérelték a kalibrációs görbe legörbülő, nem lineáris szakaszát kiegyenesíteni, hogy a ténylegesen mért, korrigált (a kontrol-oldat, a szuszpenziós közeg értékével csökkentett) extinkció-adatokat (NOD = netto optikai sűrűség = extinkció \times 1000) a sejtsűrűség egyenes függvényeivé lehessen átalakítani (AOD: abszolút optikai sűrűség = extinkció \times 1000). Azt találták, hogy az

$$\text{AOD} = 5000 - 100 \cdot \sqrt{2500 - \text{NOD}}, \text{ illetőleg az}$$

$$\text{AOD} = 1800 - 100 \cdot \sqrt{321,33 - 0,33 \text{ NOD}}$$

képletekkel a 0 és 196 közötti, illetőleg a 197 és 1000 közötti NOD-értékeket a relatív baktériumkoncentrációval lineáris összefüggést adó AOD-értékeké lehet átalakítani, legalább is *L. arabinosus* 8014, *L. brevis* 8257, *L. casei* 7469, *L. fermenti* 9338, *Leucon. mesenteroides* P-60, 8042, *Streptococcus faecalis* 9790 és *Str. faecalis* 8043 esetén. NOD = kb. 1000 fölött egy újabb, bonyolultabb képletre van szükség. Ezek a szerzők kémcsőben, 675 $m\mu$ -os sulypontú szűrővel, Coleman-spektrofotométerekben mérték a szuszpenziókat és jó egyezést találtak a relatív sejtsűrűség és az AOD között. A vizsgált tejsavbaktériumokra a fenti képletek alapján kalibrációs táblázatot szerkesztettek az AOD-nek NOD-ból való közvetlen kiszámítására.

Saját kísérletek

Nefelometriás módszer esetén rendszerint kémcsövet használnak, a turbidimetriásnál, mint láttuk, két lehetőség van. Az egyik megoldásnál a szuszpenziót plánpárhuzal üveglapokkal határolt, ismert rétegvastagságot adó küvettában mérik, a másikonál magában a kémcsőben. Az utóbbit csak az ilyen célokra szerkesztett újabb típusú készülékekben (például Lumetron, Coleman stb.) lehet közvetlenül elvégezni. A régebbi típusú fotométerek kémcső befogadására átalakítás nélkül nem alkalmasak.

Mint hogy egyéb vizsgálatainkhoz nélkülözhetetlen volt a sejtsűrűségnek ugyanabban a kistömegű szuszpenzióban az idők folyamán való sokszori mérése,

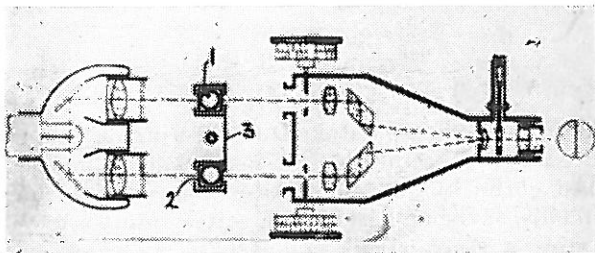
a küvettás megoldást nem lehetett alkalmazni. A nefelometriás eljárás — nagy érzékenysége miatt — nagyobb sejtsűrűségek esetén nem használható, s így a fényelnyelés kémcsőben való mérésére kellett módot találni. Megfelelő kémcső-adaptert szerkesztettünk tehát, mely a Pulfrich-féle Stufenphotometer-ben is használható. A 18 mm külső átmérőjű kémcsövet méréskor egy 20 mm-es, vízzel töltött fotométer-küvettába helyeztük és ezen a most már plánparallel falakkal határolt rendszeren bocsátottuk át a fényt megfelelő, 8 mm átmérőjű, köralakú kivágással ellátott fényszűkítő (blende) közbeiktatásával (1., 2. ábra).

Így a kémcső henger-felülete miatt a látómezőben »száraz« kémcső használata esetén fellépő, zavaró tükröződés teljesen megszüntethető. — Kontrollként az adapter másik oldalára egy tápoldattal, illetőleg a hígító folyadékkal ellátott kémcsövet helyeztünk egy másik, vízzel telt 20 mm-es küvettába.

A méréshez általában a 665 m μ -os súlypontú (S 66) szűrőt alkalmaztuk, miután a használt steril tápoldatok itt mutattak abszorpciós minimumot.

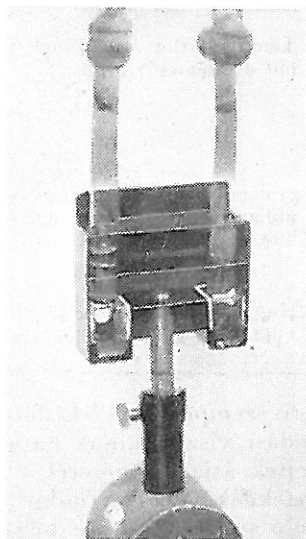
Az eljárás használhatóságát, illetőleg hibaforrásait néhány élesztővel és baktériummal tanulmányoztuk.

Megállapítottuk először, hogy a rendelkezésünkre álló kémcsőkészlet átmérő szempontjából mennyire egységes. 40 db, találmra kivett 18 × 180 mm-es kémcső külső átmérőjét tolmércével megmértük (2 cm-re a fenék fölött) és a kémcső körülfordatásával kapott legnagyobb



1. ábra

A kísérleti berendezés vázlatja. 1: kémcső; 2: vízzel telt küvettá; 3: kémcsőtartó a Pulfrich-készülékhez.



2. ábra

A kémcső-adapter képe.

átmérőértéket feljegyeztük (1. táblázat). A kémcsőkészlet nem egészen egységes mivolta, mint látható, nem jelenthet komoly pontatlanságot.

Megvizsgáltuk aztán, hogy maga az extinkció-leolvasás milyen hibával jár. Ugyanazt az élesztőszuszpenziót (*Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus*) ugyanabban a kémcsőben negyvenszer egymásután extinkcióra megmértük (minden mérés 3 leolvasás középértéke). Abból a célból, hogy különböző extinkció-sávokban is megismerjük a leolvasás hibáját, hígabb és töményebb élesztőszuszpenziókban is végeztünk méréseket, minden esetben negyven leolvasási középértéket 3—3 leolvasásból határoztunk meg. Az eredményeket az 1. táblázat szemlélteti.

Látható, hogy a vizsgált extinkció-közben a standard eltérés abszolút értéke nem nagyon ingadozik, relatív értékben természetesen a kisebb csiraszámoknál nagyobb.

Megvizsgáltuk továbbá, hogy a különböző kémcsövek használata mint befolyásolja a kapott fényelnyelést. Ugyanazt az élesztőszuszpenziót 40 kémcsőben (melyek átmérőjét az előbb említett módon meghatároztuk) extinkcióra megmértük. Mindegyik esetben a szokott 3—3 leolvasás középértékét feljegyezve, az adatok középértékét és a standard eltérést az 1. táblázat mutatja.

Megállapítható mindezek alapján, hogy a módszer hibái nem túl nagyok. Az eljárás a biológiai vizsgálatok követelményeit kielégíti.

Miután a turbidimetriás sejtsűrűség-, illetőleg csiraszámmérések végső célja legtöbbször valamely mikrobatenyészet szaporodásának nyomonkövetése, még

1. táblázat

A mérési módszer hibái

		(1) Középérték	(2) Standard eltérés	(3) Var. koeff. (%)
A kémcsőkészlet átmérőinek ingadozása (40 db kémcső) (4)		17,56 mm	0,25 mm	1,4
		E x t i n k c i ó (8)		
Ugyanaz a szuszpenzió ugyan- abban a kémcsőben mérve 40-szer (5)	Csiraszám ml-enként(7)			
	4.30.10 ⁶	0,289	0,009	3,2
	8.60.10 ³	0,554	0,012	2,2
	1.73.10 ⁷	0,949	0,009	1,0
	3.45.10 ⁷	1,430	0,016	1,1
Ugyanaz a szuszpenzió 40 db különböző kémcsőben mérve (6)		0,968	0,018	1,9

egy szempontra ki kellett terjeszkedni az elővizsgálatoknál. Baktériumok szaporodási viszonyainak tárgyalásánál szokta megemlíteni a szakirodalom, hogy a sejtek átlagos méretei a szaporodási görbe különböző szakaszaiban más és más értékűek. A logaritmus (exponenciális) fázisban kisebbek a sejtek, mint a gyorsuló szaporodási, és nagyobbak, mint a stacionárius szakaszban. Az egységnyi térfogatban levő baktériumok számának és azok tömegének változása tehát nem halad teljesen párhuzamosan. Miután pedig az extinkcióadat elsősorban a mikrobatömegre vonatkoztatott töménységgel (sejtsűrűség) van összefüggésben, várható, hogy a sejtszámra az extinkcióból nem lehet pontosan következtetni.

Megvizsgáltuk, hogy élesztőnél milyen különbség van meghatározott csiraszámú élesztőszuszpenziók fényelnyelése között, ha az egyik esetben a logaritmus, a másikban pedig a stacionárius fázisban van ugyanaz az élesztő.

Három napos, stacionárius fázisban levő Tokaj 22-tenyészetből (0,5 % peptonos, 0,5 % kristálycukros élesztőfőzetben, pH = 4,90, 30 C°-on inkubálva) hígítási sort készítettünk (deszt. vízzel) és ennek mindenegyes tagját tíz különböző kémcsőben (17,3—17,9 mm külső átmérő) extinkcióra megmértük (3—3 leolvasás). Ugyanakkor megállapítottuk az eredeti szuszpenzió csiraszámát Bürker-kamrás számolással.

Készítettünk ugyanebből az élesztőből az előbbi tápoldatban egy exponenciális fázisban levő tenyészetet is (11 órás inkubálás 30 C°-on), melyből — formalinos szaporodásmegállítást után (2 tf. % 40 %-os CH₂O oldattal) — szintén hígí-

tási sort állítottunk elő és az előbbi kémcsövekben a már vázolt módon fényelnyelésre megvizsgáltuk. A csíraszámot a kezdő szuszpenzióban ugyancsak Bürker-kamrás számolással állapítottuk meg. A kapott adatokat a 3. ábra szemlélteti. A függőleges vonalkák a standard eltérés nagyságát jelzik.

Mint látható, a stacionárius és az exponenciális szaporodási szakaszban levő élesztők méretei között szignifikáns a különbség. Az extinkció-adatok mégis *gyakorlatilag* mindkét fázisban körülbelül egyformán engednek következtetni az élesztő-zuszpenzió csíraszámára.

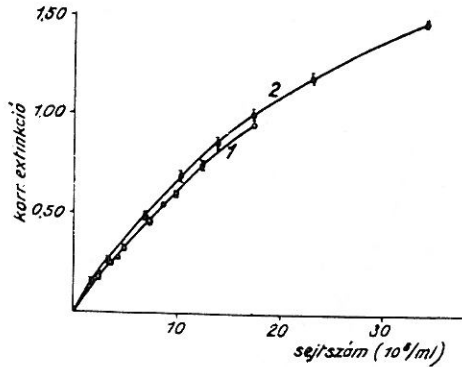
Baktériumoknál ezeket a méréseket nem végeztük el ilyen részletesen, úgy-hogy az ott kapott extinkció-adatok szigorúan véve nem a csíraszámra, hanem a baktériumtömeg-koncentrációra (sejtsűrűsége) vonatkoznak.

Élesztő- és baktériumsuszpenziók [*Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* Tokaj 22, Balatonfüred 2, *Torulopsis utilis* var. *maior* (Thaysen et Morris), *Corynebact. michiganense* és *Bacillus* sp.] hígítási sorának a fenti készülékben való mérése.

2. táblázat

A sejtsűrűség és a fényelnyelés összefüggése *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, Tokaj 22-nél

(1) Relatív sejtsűrűség (x)	(2) Korrigált extinkció (y)
0,08	0,34
0,12	0,47
0,16	0,58
0,20	0,68
0,24	0,78
0,28	0,86
0,32	0,92
0,35	0,97
0,40	1,05
0,50	1,23
0,60	1,32
0,70	1,42
0,80	1,50
0,90	1,58
1,00	1,65



3. ábra

A csíraszám és az extinkció összefüggése *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, Tokaj 22-nél a szaporodás exponenciális (logaritmikus) és stacionárius fázisaiban. 1 = logaritmikus fázis; 2: stacionárius fázis.

továbbá egy irodalmi adat [*Str. faecalis*, Toennies és Gallant (4)] újraértékelése arra a felismerésre vezetett, hogy 1. linearitás a sejtsűrűség és a fényelnyelés között legfeljebb csak kis extinkció-értékekig tapasztalható. 2. az 1,4—1,6 extinkcióig terjedő abszorpciót mutató szuszpenziók hígítási soránál jelentkező (sejtsűrűség : fényelnyelés)-összefüggés nem parabolavonalat ad. Erre itt csak egy példát hozunk fel.

Sacch. cerevisiae var. *ellipsoideus* Tokaj 22 egy szuszpenziójából a tápoldattal (pepton-krist. cukor-foszfát-citromsavas élesztőfőzet) hígítási sort készítve, a 2. táblázatban látható adatokat kaptuk.

Ha Longsworth egyenlete érvényes akkor a

$$\frac{D}{C} = a - \beta^2 \cdot C, \text{ illetőleg — eddigi jelzéseinkkel: — } \frac{y}{x} = a - \beta^2 \cdot x$$

összefüggés értelmében $\frac{y}{x}$ értékét az x függvényében ábrázolva, egyenes vonalat kell kapni. Amint a 4. ábra 1. görbéje mutatja, ez nem áll fenn.

Ezeket az adatokat és egyéb mérőssorozatok eredményeit tanulmányozva, több sikertelen próbálkozás után azt találtuk, hogy a kapott pontok leginkább egy

$$y = \frac{x}{ax + b}$$

típusú hiperbolának felelnek meg: ugyanis $\frac{1}{y}$ értékeit $\frac{1}{x}$ függvényében felrajzolva, általában — a nagyon kis extinkció-adatok kivételével, melyek csak pontatlanul határozhatók meg — egyenes vonalat kaptunk (4. ábra, 2. görbe).

A hiperbola egyenletét a legkisebb négyzetek elvének felhasználásával számítottuk ki a kísérleti adatok reciprokjából. Ha ugyanis $\frac{1}{y} = Y$ és $\frac{1}{x} = X$,

akkor a hiperbola egyenlete így írható fel:

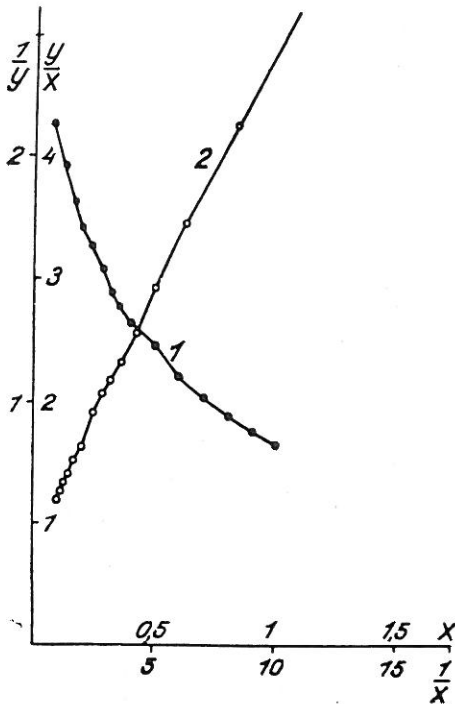
$$Y = a + bX$$

A legkisebb négyzetek elve alapján a és b kiszámítható az

$$N \cdot a + b \sum X - \sum Y = 0$$

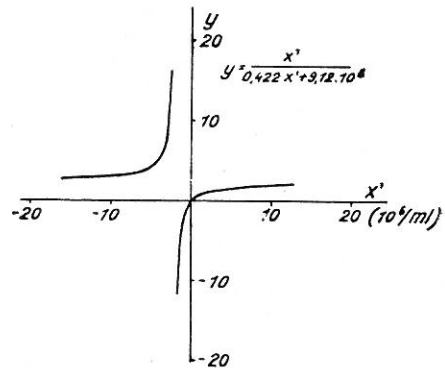
$$a \cdot \sum X + b \sum X^2 - \sum XY = 0$$

egyenletrendszer megoldásával.



4. ábra

A sejtsűrűség (x) és a korrigált extinkció (y) összefüggése a Tokaj 22 élesztőnél. 1: y/x és x összefüggése; 2: $1/y$ és $1/x$ összefüggése.



5. ábra

A sejtsűrűség (csíraszámban megadva: x') és a korrigált extinkció (y) összefüggését kifejező hiperbola alakja.

A fenti példára kiszámítva:

$$15a + 56,770 b - 17,966 = 0$$

$$56,77 a + 356,692 b - 97,060 = 0$$

$$a = 0,422$$

$$b = 0,205$$

tehát a sejtsűrűség (x) és az extinkció (y) az

$$y = \frac{x}{0,422 \cdot x + 0,205}$$

képlet szerint függ össze egymással. Ha az x értékeit nem a relatív koncentrációval, hanem a Bürker-kamrában megszámlolt csíraszámokban (x') fejezzük ki, akkor, miután $x = 1,00$ megfelel $4,45 \cdot 10^7$ /ml csíraszámoknak :

$$x = \frac{x'}{4,45 \cdot 10^7}$$

és így a fenti képlet a következőképp módosul (5. ábra) :

$$y = \frac{x'}{0,422 \cdot x' + 9,123 \cdot 10^6}$$

A képletekkel, adott csíraszámokra kiszámítva a fényelnyelést és ezt a tényleg tapasztalt értékekkel összehasonlítva, a 3. táblázatban látható adatokat kapjuk.

A mért és a számított y -értékek közötti átlagos eltérés 1,8 % körül van. A korrelációs index (a görbe mentén) : $\rho = 0,99975$.

3. táblázat

A ténylegesen mért és a hiperbola-képlettel számított extinkció-értékek összehasonlítása *S. cerevisiae* var. ellipsoideus, Tokaj 22-nél

(1) Sejtsűrűség (csíraszámokban kifejezve) (x')	(2) Extinkció	
	(3) mért (y_m)	(4) számított (y_{sz})
$3,6 \cdot 10^6$	0,340	0,335
$5,3 \cdot 10^6$	0,470	0,469
$7,1 \cdot 10^6$	0,580	0,587
$8,9 \cdot 10^6$	0,680	0,691
$1,07 \cdot 10^7$	0,780	0,784
$1,25 \cdot 10^7$	0,860	0,866
$1,42 \cdot 10^7$	0,920	0,941
$1,56 \cdot 10^7$	0,970	0,992
$1,78 \cdot 10^7$	1,050	1,070
$2,23 \cdot 10^7$	1,230	1,201
$2,67 \cdot 10^7$	1,320	1,308
$3,11 \cdot 10^7$	1,420	1,399
$3,56 \cdot 10^7$	1,500	1,474
$4,00 \cdot 10^7$	1,580	1,539
$4,45 \cdot 10^7$	1,650	1,592

Hasonló eljárást alkalmazva, néhány kísérlet, illetőleg irodalmi adat számításának eredményét a 4. táblázat adja.

Mint látható, a hiperbola-képlet nagyon különböző mikroorganizmus-típusokra, különböző készülékekben és mérési körülmények között alkalmazható.

4. táblázat
A sejtsűrűség és a fényelnyelés összefüggése néhány mikroorganizmusnál

(1) Mikroorganizmus	(2) A kísérlet körülményei						(3) A hiperbola-egyenlet konstansai			(4) átlagos eltérés (%)
	(5) táplódat	(6) hígítószer	(7) edényzet	(8) készülék	(9) szűrő súrló pont m/μ	(10) a sejtsűrűség (x) adata	(11) a leg-nagyobb mért extinkció	a	b	
<i>S. cerevisiae</i> var. ellips. Tokaj 22	peptonos élesztő-főzet szaharózzal, pH=4,9 (16)	táplódat (5)	kémesó (17)	Pulfrich-fotometer (18)	665	csíra-szám (19)	1,65	0,422	0,912.10 ⁷	1,8
<i>Torulopsis utilis</i> var. maior	«	«	«	«	«	«	1,47	0,4317	0,7073.10 ⁷	1,0
<i>Bacillus</i> sp. vegetatív sejtek (14)	pH = 7,0	«	«	«	«	«	1,28	0,204	7,55.10 ⁷	2,7
<i>Bacillus</i> sp. spórák (15)	«	«	«	Fényelektromos fotométer (saját szerk.) (20)	615	«	0,52	0,722	7,35.10 ⁷	2,9
<i>S. cerevisiae</i> v. ellips. Balatonfüred 2.	«	deszt. víz (21)	«	Pulfrich-fotométer (18)	726	relatív érték (22)	0,39	0,115	2,449	3,4
<i>Corynebact. michiganense</i>	«	«	«	«	«	«	0,75	0,3235	1,0419	1,2
<i>Str. faecalis</i> 9790**	szintetikus (23)	táplódat (5)	«	Coleman-11-spektrofotométer	675	«	0,698	0,238	1,433	1,7

* Vízrel telt küvetába helyezett kémesó által átengedett mikrolumen- adatokból számítva. (24)
** Toennies & Gallant (4).

S a j a t m e r e s e k (12)

Iródat (13)

A mért extinkciónak sejtsűrűsége, illetőleg csiraszámra (állandó átlagméretű = standard sejtek feltételezése esetén) való átszámítása így a kalibrációs pontokból görbe rajzolása és grafikus interpolálás nélkül is megtörténhet. Még jobban könnyíti az átszámolást, ha a képlet alapján minden várható korrigált extinkció értékre kiszámítjuk a sejtsűrűséget az

$$x = \frac{by}{1 - ay}$$

képlet alapján, s az értékeket kalibrációs táblázatba foglaljuk.

Összefoglalás

Kémcsőadaptert szerkesztettünk mikroba-szuszenziók turbiditásának Pulfrich-fotométerben való mérésére.

Vizsgáltuk néhány tényezőnek a mérés pontosságára gyakorolt hatását. Azt találtuk, hogy a sejtsűrűség és az extinkció viszonya legjobban egy

$$y = \frac{x}{ax + b}$$

alakú hiperbola képletével írható le. Ennek az összefüggésnek a felhasználásával a kalibrációs adatokból grafikus szerkesztés nélkül közvetlenül kiszámíthatók, illetőleg az előre elkészített táblázatból kikereshetők a kísérleti extinkció-adatoknak megfelelő sejtsűrűség-értékek.

Érkezett: 1954. február 16.

Irodalom

1. Longsworth, L. G.: J. Bact., **32**. 307. 1936.
2. Mestre, H.: J. Bact., **30**. 335. 1935.
3. Monod, J.: Ann. Rev. Microb., **3**. 371, 1949.
4. Toennies, G. & Gallant, D. L.: Growth, **13**. 7. 1949.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГУСТОТЫ КЛЕТОК* ПРИ ПОМОЩИ МУТНОСТИ

К. В а ш

Исследовательский Институт Консервной, Мясной и Холодильной Промышленности

Резюме

Мутность суспензии микробных клеток в зависимости от числа зародышей т. е. от густоты клеток исследовалась фотометром Пульфриха при помощи пробирок-адаптера (1 и 2 рис.)

Исследуемая суспензия наливалась в пробирку диаметра 18 мм. а пробирка помещалась в кювету 20 мм. Для отстранения мешающих рефлексий, кювета наливалась водой и применялась кольцообразная бленда диаметра 8 мм.

Установлена ошибка измерений. Колебание диаметров пробирок, неопределенность при установлении экстинкции (при разных густотах клеток) и ошибка полученная с применением разных пробирок, как видно из таблицы 1, не велики. При исследовании зависимости числа зародышей от мутности выяснилось, что сигнификантная разница существует между дрожжами в экспоненциальной и в стационарной фазе *Sacch cerevisiae* var *ellipsoideus*, Tokaj, 22 (3 рис.) но практически данные экстинкции позволяют в каждой фазе одинаково определить число зародышей в дрожжевых суспензиях.

Установленно, что зависимость мутности от густоты клеток изображается гиперболой по уравнению

$$y = \frac{x}{ax + b}$$

где: y — исправленная экстинкция (с вычетом экстинкции суспендирующей среде.)
 x — густота клеток.

Дрожжами Tokaj 22 приводится пример на рис. 4, где наглядно видно, что формула параболы ($D = a \cdot C - \beta^2 \cdot C^2$; Longworth, 1936) при данных условиях не в силе ($\frac{D}{c} = \frac{y}{x}$ и $C = x$ зависимость не линейная), а данные, полученные из формулы гиперболы совпадают достаточно с данными исследования (зависимость $\frac{1}{y}$ и $\frac{1}{x}$ приблизительно линейная).

После вычисления констант a и b высказанной формулы из данных полученных при исследовании нескольких разводов бактерий и дрожжей, и преобразованием литературных данных установлено отклонение вычисленных данных от фактических (3 и 4. табл.), оказавшееся незначительным и среднее колебание относительно малым.

Применением высказанной зависимости, из данных калибрования или из построенной таблицы непосредственно, без графического построения можно вычислить густоту клеток соответствующую данным экстинкции.

Табл. 1.: Ошибки метода при суспензии дрожжей: (1) среднее значение (2) стандартное отклонение (3) вариационный коэффициент (%) (4) колебание диаметров пробирок (40 шт.) (5) ошибка 40-разного измерения суспензии в тождественной пробирке (6) ошибка измерения тождественной суспензии в 40 разных пробирках (7) число зародышей (МЛ) (8) экстинкция.

Табл. 2.: Зависимость густоты клеток от поглощения света при *S. cerevisiae* var *ellipsoideus*, Tokaj 22 (1) Относительная густота клеток (2) исправленная экстинкция.

Табл. 3.: Сопоставление фактических данных экстинкции с вычисленными из формулы гиперболы при *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, Tokaj 22: (1) густота клеток (как число зародышей) (2) экстинкция (3) измеренная (4) вычисленная из формулы

$$y = \frac{x'}{0.422 x' + 9.123 \cdot 10^6}$$

Табл. 4.: Зависимость густоты клеток от поглощения света при разных микроорганизмах. (1) микроорганизмы (2) условия опыта (3) константы формулы гиперболы (4) среднее отклонение (5) питательная среда (6) растворитель (7) сосуд (8) прибор (9) центр тяжести светофильтра (10) густота клеток (11) самая большая измеренная экстинкция (12)

*Концентрация клеточной Массы.

собственные измерения (13) литературное данно (14) вегетативные клетки (15) споры (16) дрожжевой экстракт с пептоном и сахарозой рн 4,9 (17) питательная среда (18) пробирка (19) фотометр Пульфриха (20) число зародышей (21) свето-электрический фотометр (собственная конструкция) (22) дистиллированная вода (23) относительное значение (24) искусственная среда (25) вычислено из данных микролюменов перепушенных пробиркой помещенной в кювету наполненной водой.

Р и с. 1.: Схема установки. (1) пробирка (2) кювета наполненная водой (3) штатив для пробирок при фотометре Пульфриха.

Р и с. 2.: Вид пробирок-адаптера.

Р и с. 3.: Зависимость числа зародышей от экстинкции при *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, Токај 22 $\frac{1}{4}$ экспоненциальной (логарифмической) и стационарной фазе размножения. Абсц.: число зародышей ($10^3/\text{мл}$) орд.: исправленная экстинкция.

Вертикальные линии показывают значение стандартного отклонения.

Р и с. 4.: Зависимость густоты клеток (x) от исправленной экстинкции (y) при Токај 22 γ — (1) зависимость y/x от x (2) зависимость $1/y$ от $1/x$.

5. Р и с.: Вид гиперболы показывающей зависимость густоты клеток (x как число зародышей) от исправленной экстинкции (y).

Determination of Microbial Density by Measuring Turbidity

K. VAS.

Institute for Research in Canning, Meat Packing and Refrigeration, Budapest

Summary

Turbidity of suspensions of yeasts and bacteria was studied as a function of »cell concentration« (number of cells per unit volume of suspension) and »microbial density« (cell mass per unit volume), resp. [M o n o d, (3)]. For this purpose a special test tube adapter was used in the Pulfrich photometer (Figs. 1., 2.). The optical density of the suspensions was determined in culture tubes of 18 mm (external) diameter. The latter were placed in a 20 mm Pulfrich cuvette. In order to eliminate disturbing reflections, the cuvette was filled with distilled water, and circular diaphragms (8 mm in diameter) were applied.

First the precision of the method was established. As may be seen from Table 1., the variation in diameter of the tubes in our supply, the error of extinction* readings (at various levels of microbial density), and the error arising from the use of test tubes varying somewhat in diameter, were not too great. — A study on the relationship of cell concentration and turbidity showed that a statistically significant difference in size exists between yeast cells of different ages, e. g. between cells in the exponential and stationary phases of growth, resp. (Fig. 3.) Nevertheless, from the *practical* point of view, extinction data may equally be used to evaluate approximate cell concentration in either phase.

It was found that the relation between turbidity and microbial density may best be represented by a hyperbolic curve: $y = x/(ax + b)$ where y = corrected extinction (= net optical density = total optical density — optical density of the suspension medium) and x = microbial density (Fig. 5.). Fig. 4. shows their relation to each other in the case of a yeast strain. It may be seen that, under the given conditions, the relation between extinction value and microbial density cannot be described by a parabolic curve [e. g.: $D = a \cdot C - \beta^2 C^2$, L o n g s w o r t h, 1936; where D = extinction (= y) C = cell concentration (= x), a and β are constants], since by plotting y/x against x one cannot get a straight line. On the contrary, the experimental data can easily be fitted to a hyperbolic curve, since the relationship between $1/y$ and $1/x$ proved to be approximately linear.

Employing partly the results of a few experiments carried out with various yeasts and bacteria, partly some of the data of T o e n n i e s & G a l l a n t (4), the constants (a and b) of the above expression were calculated and the average deviation of measured and calculated extinction values determined (Tables 3, and 4). The correlation proved to be significant, and the average deviation comparatively small.

*extinction = $\log_{10} \frac{P_m}{P}$, here P_m = flux falling on the suspension, P = flux transmitted by the suspension

By the use of the above relationship, microbial densities corresponding to experimental extinction values can be computed directly, without graphical interpolation, provided the constants of the equation are known from the data of a calibration experiment.

Table 1. Errors in the Measurement of Turbidity of a Yeast Suspension (*Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus*). (1) mean, (2) standard deviation, (3) coefficient of variation (%), (4) variation in the diameter of the test tube supply (40 tubes measured), (5) the same suspension measured 40 times in the same tube, (6) the same suspension measured in 40 different tubes, (7) number of cells per ml, (8) extinction.

Table 2. Relationship between Microbial Density and Absorption of Light in Yeast Suspensions (*S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, Tokaj 22). (1) microbial density (as expressed by relative values), (2) corrected extinction (net optical density).

Table 3. Comparison of Measured Absorption Values with Those Calculated from the Equation of the Hyperbola (*S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, Tokaj 22) (1) microbial density (as expressed by number of cells per ml), (2) extinction, (3) measured, (4) calculated employing equation

$$y = \frac{x'}{0,422 x' + 9,123 \cdot 10^6}$$

Table 4. Relation between Microbial Density and Absorption of Light in Suspensions of Various Microorganisms. (1) microorganism, (2) details of the experiment, (3) constants of the equation of the hyperbola, (4) average deviation, (5) culture medium, (6) suspension medium, (7) type of vessel, (8) instrument employed, (9) maximum transmittancy of the filter, (10) microbial density expressed as, (11) highest extinction value measured, (12) present experiments, (13) data from the literature, (14) vegetative cells, (15) spores, (16) yeast decoction containing peptone (0,5%) and sucrose (0,5%), pH = 4.9, (17) test tube, (18) Pulfrich Stufenphotometer, (19) number of cells per ml, (20) a photoelectric photometer of the author's own design, (21) dist. water, (22) relative value, (23) synthetic, (24) calculated from the intensity of light transmitted by the suspension in the test tube placed in a cuvette filled with water.

Fig. 1. Outline of the Apparatus Employed. (1) test tube, (2) cuvette filled with water, (3) tube adapter to the Pulfrich Stufenphotometer.

Fig. 2. The Tube Adapter.

Fig. 3. Relationship between Cell Concentration and Extinction Values in Suspensions of a Yeast (*S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* Tokaj 22) in the Exponential (Logarithmic) (1) and Stationary (2) Phases of Growth, resp. Abscissa: cell count (10^6 ml). Ordinate: corrected extinction. The vertical lines represent the magnitude of the standard deviation.

Fig. 4. Relationship between Microbial Density (x) and Corrected Extinction (y) in Suspensions of the Yeast *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, Tokaj 22. Line 1: y/x plotted against x ; line 2: $1/y$ as a function of $1/x$.

Fig. 5. Shape of the Hyperbola Expressing the Correlation between Microbial Density (x^* given as number of cells per ml) and Corrected Extinction (y) in Suspensions of *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, Tokaj 22.