



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 38568—2020

## 工业微生物菌株生长表型测定 微液滴浊度法

Determination of growth phenotype for industrial microbial strain—  
Microdroplet turbidity

2020-03-31 发布

2020-03-31 实施

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会

GB/T 38568—2020

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：中国科学院青岛生物能源与过程研究所、中国标准化研究院。

本标准主要起草人：马波、葛安乐、王喜先、籍月彤、徐健、马爱进。





# 工业微生物菌株生长表型测定 微液滴浊度法

## 1 范围

本标准规定了用微液滴浊度法测定工业微生物菌株生长表型的方法。  
本标准适用于工业发酵用细菌、真菌和微藻菌株生长表型测定。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14926.43 实验动物 细菌学检测 染色法、培养基和试剂

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**参考菌株 reference strain**

发酵性能明确,用于发酵生产的经过鉴定的保存菌株。

## 4 原理

通过微流控芯片产生单细胞包裹液滴,并培养,根据液滴中的菌体面积,进行生长速率的计算。

## 5 试剂或材料

除非另有规定,所用试剂均为分析纯。

### 5.1 水

符合 GB/T 6682 规定的二级水。

### 5.2 基础培养基

按 GB/T 14926.43 给出的方法配制。或选用商品化的预制培养基,严格按照商品说明书加水配制。

### 5.3 PBS 缓冲液, pH 7.4

称取磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.27 g、磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 1.42 g、氯化钠( $\text{NaCl}$ ) 8 g、氯化钾( $\text{KCl}$ ) 0.2 g,将上述各成分加去离子水约 800 mL 充分搅拌溶解,然后加入浓盐酸调 pH 至 7.4,最后定



## GB/T 38568—2020

容到 1 L。

### 5.4 超低熔点琼脂糖

凝胶点为 8 °C ~ 17 °C。

### 5.5 氟碳油。

含有表面活性剂。

## 6 仪器设备

6.1 恒温箱: ±1 °C。

6.2 离心机: 500 g ~ 4 000 g。

6.3 倒置显微镜: 带成像模块。

6.4 聚四氟乙烯导管: 内径 0.5 mm。

6.5 PDMS 微流控芯片: 高度为 100 μm, 后面连接有至少 50 个培养腔室结构, 每个腔室尺寸为 1.5 mm × 1 mm。油相两侧线性结构相同, 每一侧长为 29.2 mm, 宽度为 40 μm; 水相的线性结构长为 4.54 mm, 宽度为 60 μm。

6.6 分光光度计。

6.7 热板。

## 7 测定步骤

### 7.1 菌株活化

7.1.1 按 GB/T 14926.43 给出的方法配制工业微生物相应的固体平板和液体培养基, 用无菌接种环分别蘸取参考菌株和待评价菌株保种菌液, 在固体平板上划线, 根据生产工艺参数选择相应的温度和 pH 值, 进行培养, 直至长出单菌落; 分别挑取 3 个参考菌株和 3 个待评价菌株单菌落, 接种至含有 5 mL 液体培养基的试管中, 根据生产工艺参数选择相应的温度和转速, 培养至对数期。

7.1.2 从活化的平板培养皿挑取微生物菌株单克隆于 5 mL 液体培养基的容器中, 根据生产工艺参数选择相应的温度和转速, 培养至稳定期, 去除上清后加入 PBS 溶液, 重复清洗 3 次。

### 7.2 微生物菌液浓度选取

用基础培养基稀释得到细胞悬液浓度约为  $6 \times 10^5$  CFU/mL。

### 7.3 琼脂糖溶液制备

用分析天平称取 0.02 g 超低熔点琼脂糖置于无菌 EP 管中, 并向其中加入 1 mL 已灭菌的基础培养基, 加热溶解, 配制成 2% (质量浓度) 的溶液。趁热用 0.22 μm 的无菌滤头过滤, 现用现配。

### 7.4 单细胞液滴发生

7.4.1 各取 500 μL 微生物菌液和琼脂糖溶液等体积混匀。

7.4.2 取一块芯片, 分别在芯片的油相入口加入 200 μL 氟碳油和水相入口加入 100 μL 低熔点琼脂糖菌液, 将注射器与芯片出口相连。

7.4.3 将芯片放在热板上 (温度稳定性 ±1 °C, 范围在 30 °C ~ 37 °C), 将注射器的活塞固定在 2 mL 刻



度处,通过注射器内的负压使液体进入芯片,开始发生液滴。液滴发生需要 2 min 左右。

7.4.4 取另一块芯片重复上述步骤,一为待鉴定菌株,另一为参考菌株。此步骤重复三次。

## 7.5 单细胞液滴培养

液滴发生结束后,移除芯片上的枪头和聚四氟乙烯管,将两芯片放入 4 ℃ 冰箱凝固 20 min 后再置入盛有水的培养皿中于 37 ℃ 恒温箱进行培养 6 h。

## 7.6 芯片成像

将芯片置于倒置显微镜,在 10× 物镜下进行成像,获取至少 20 张图片,不少于 2 000 个液滴,并保存为 bmp 格式。

## 7.7 数据处理

用软件进行图片处理,统计每张图片内液滴的个数以及每个液滴的直径,并计算图片中菌斑的平面面积。

# 8 结果分析

## 8.1 结果计算

菌斑面积相对差值按式(1)计算:

$$d = \sum_{k=1}^n \left( \frac{x_{1k}^2}{R_{1k}^2} - \frac{x_{2k}^2}{R_{2k}^2} \right) \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$d$  ——菌斑面积相对差值;

$x$  ——图像中单个液滴内细菌的面积;

$R$  ——单个液滴的直径;

$n$  ——凝胶液滴的个数。

## 8.2 结果分析

根据菌斑面积相对差值评价待选菌株与参考菌株相似性度。 $d$  值绝对值越小代表与标准信号代表的凝胶液滴浊度越接近。 $d$  值为负,表明生长速率低于参考菌株, $d$  值为正,表明生长速率高于参考菌株。在重复性条件下获得的三次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。