撰文：岑祥技術部

岑祥小學堂

使用BMG reader 測量微生物生長需要考量的因素

撰文：岑祥技術部

測量OD_{600}常用於量化微生物，可即時監測細菌、酵母菌及其他微生物的生長狀態，所以可應用在發酵製程、抗生素敏感性測試，以及重組蛋白的生產，有助於優化培養條件並提高產量。在培養過程中可依需求頻率測量OD_{600}，而不會殺死或傷害微生物，因為細菌本身其實並不會吸收可見光，且會干擾光線傳播路徑，降低到達偵測器的光量，因此其原理是利用光散射(Light Scattering)而非測量微生物對光的實際吸收。因此光散射導致的透光率下降，溶液中的顆粒越多，光線散射越強，也就代表當細菌或酵母菌數量增加，光散射程度會提高，所以測得OD_{600}值也會隨時間上升。微孔盤讀取儀器在不需耗費過多人工操作的情況下持續監測微生物生長，且具備震盪、溫度控制及氣體控制功能，因此可視為兼具量測功能的培養箱。此儀器特別適合應用在多樣品同時測量、重複實驗、不同培養基條件比較或不同菌株比較。在中高通量應用更可進一步導入自動化流程，不只節省時間與試劑，更能顯著提高實驗結果的可靠性，因為大量實驗可在完全相同的條件下同時進行。

此外BMG LABTECH微孔盤讀取儀器可提供100–700 rpm的震盪頻率範圍，選配的Extended Shaking功能可達1100 rpm。微生物的生長與分裂速率受到多種因素影響，例如：溫度、pH值、營養或氣體供應。培養過程中透過持續震盪來促進營養或氣體供應，也可避免微生物沉降至容器底部，也影響培養液內營養物質或氣體的分布，進而改變生長速率。在進行微生物培養時，震盪條件會與以下因素相關：孔內液體體積、微孔盤幾何結構、微生物的生長需求，然而大多數微孔盤讀取儀器都可以調整震盪頻率或震盪模式。圖1A顯示大腸桿菌在96孔盤中培養12小時，在不同震盪頻率(100 rpm至1100 rpm)下的生長曲線。結果顯示，當震盪頻率由100 rpm提高至900 rpm時，生長曲線上升速度明顯加快。當震盪頻率900 rpm提高至1100 rpm時，對大腸桿菌的生長速率似乎沒有額外的促進效果。

撰文：岑祥技術部

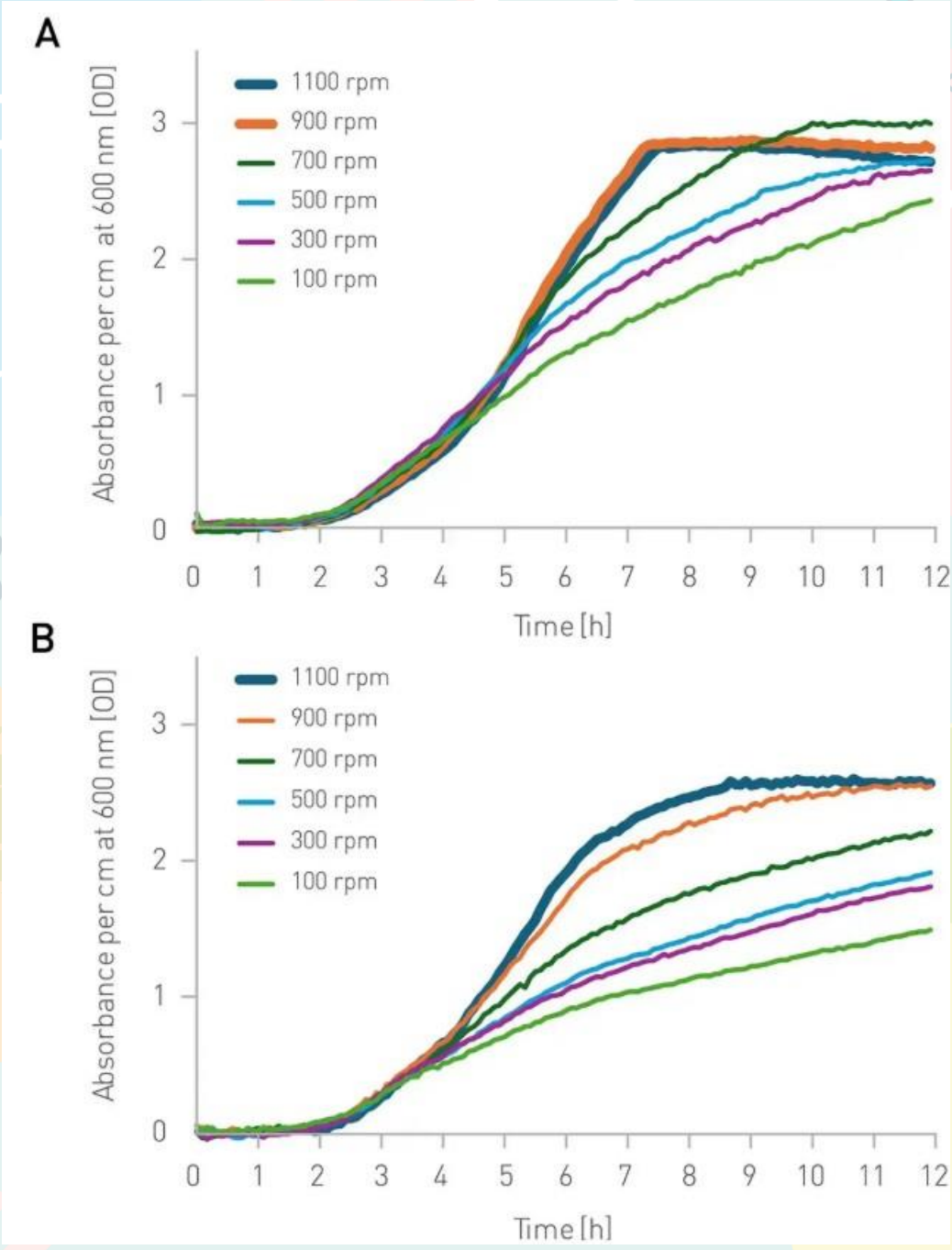

圖1：震盪頻率對大腸桿菌生長曲線的影響。將接種後的大腸桿菌懸浮液置於Luria-Bertani(LB)培養基中，在96孔微孔盤內培養12小時，培養期間每5分鐘測量一次OD_{600}，以只含LB培養基的空白組作為對照。兩次讀值之間，微孔盤依照設定的頻率進行震盪。圖中數據為空白組校正後，3次重複實驗的平均值：(A)每孔培養體積為100 µL時的大腸桿菌生長曲線；(B)每孔培養體積為300 µL時的大腸桿菌生長曲線。

可以透過提高震盪頻率來提升氧氣供應及營養物質混合效率達到縮短量測時間，但過度震盪也可能對某些微生物造成壓力或損傷。此外，最高增殖速率未必是最理想的結果，不同應用所需的最佳震盪速度也可能不同。震盪頻率也與培養體積密切相關，圖1B顯示相同實驗條件，在較大的培養體積(300 µL)，由於光徑長度增加以及微生物分布範圍較大，OD值的上升速度較慢。所以較大的液體體積需要更高的震盪頻率，以維持最佳的氣體交換及營養物質分布，才能改善培養效果。此外使用的震盪模式也可能對微生物的生長速率產生顯著影響，圖2為大腸桿菌培養液在96孔微孔盤中，以300 µL/孔培養12小時，每次讀值間以300 rpm進行震盪，比較orbital shaking與double orbital shaking兩種模式的生長曲線。結果顯示，與orbital shaking相比，double orbital shaking可使OD_{600}值更快速上升，表示微生物懸浮液的混合效果更佳，因此有助於促進大腸桿菌的生長。

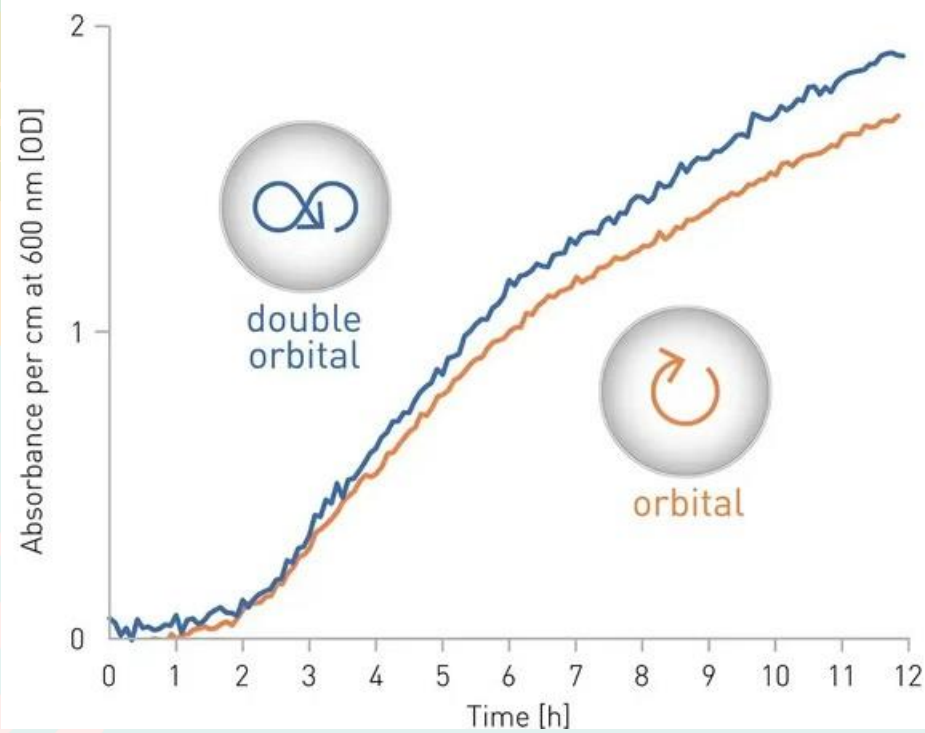

圖2：震盪模式對大腸桿菌生長曲線的影響。將接種後的大腸桿菌懸浮液置於LB培養基中，於96孔微孔盤內以300 µL/孔的體積培養12小時。培養期間每5分鐘測量一次OD_{600}，以只含LB培養基的空白組作為對照。在兩次讀值之間，微孔盤以300 rpm的轉速，按照圖中的不同震盪模式進行，圖中數據為經空白組校正後，3次重複實驗的平均值。

撰文：岑祥技術部

微生物懸浮於培養液中也可能形成聚集物，可以使用Well Scanning功能來降低數據變異性。聚集物通常對培養物的生長影響不大，因為在持續震盪下，它們會隨時間再次分散，使所有細胞都能持續獲得營養。但是，對生長沒有影響並不代表對量測結果沒有影響。在吸光值量測中，儀器通常在孔中央進行數次flashes測量，並將各次測得的吸光值平均後作為該孔的最終結果，如果細胞聚集物剛好位於光路中，可能造成讀值異常升高。當聚集物在下一次量測前移動位置，測到的OD值又可能明顯下降。其結果就是生長曲線出現數據變異性增加，測量結果的再現性降低(圖3A)。Well Scanning功能可有效減少此問題，該功能透過在同一孔內多個位置進行吸光值測量，而非僅測量中心點，將細胞聚集物造成的影響分散到更大的量測區域，因此可以降低局部聚集物對讀值的影響，減少數據變異性並提升整體量測準確度與可靠性(圖3B)。

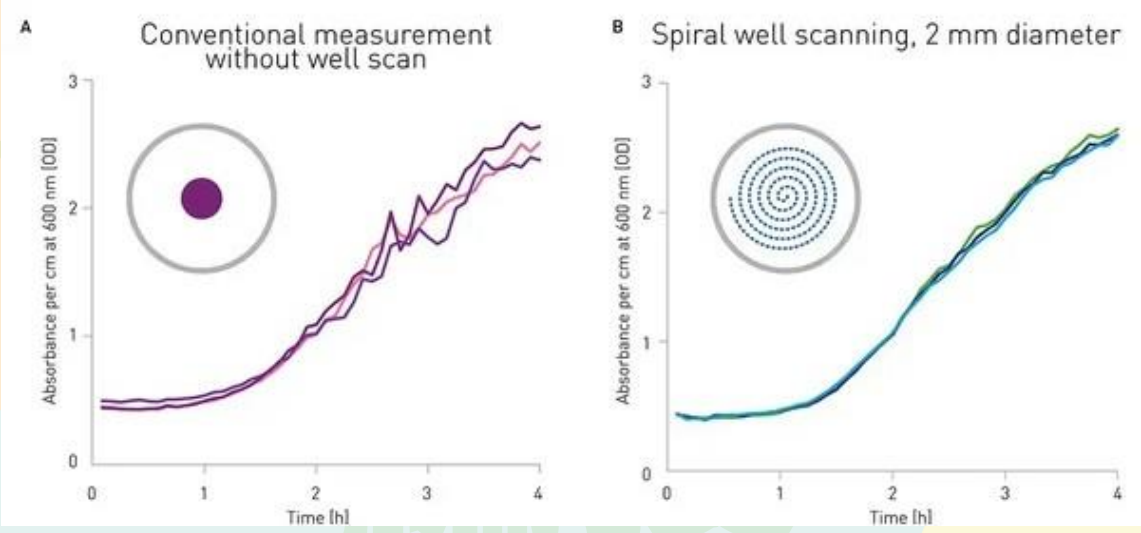

圖3：Well Scanning對大腸桿菌生長曲線數據變異性的影響。將大腸桿菌懸浮液置於LB培養基中，96孔微孔盤內培養4小時培養，期間每5分鐘測量一次OD_{600}，在兩次讀值之間微孔盤以300 rpm進行震盪。圖中是3個獨立孔的原始數據：(A)未使用Well Scanning功能，只在孔中央位置進行量測；(B)使用Well Scanning功能，於直徑2 mm的範圍進行多點量測，並採用螺旋式平均法計算。

實驗過程的蒸發會隨著溫度升高而增加，且會對OD_{600}量測產生負面影響。水分因為蒸發從系統中被移除，導致微生物周圍培養基的滲透壓可能超出最佳範圍，造成生長速率下降甚至導致微生物死亡。許多微生物的最適生長溫度通常遠高於30 °C，因此在實驗中孔內液體的蒸發幾乎無法完全避免，可以透過使用封膜來防止蒸發後的液體離開孔內（圖4）。

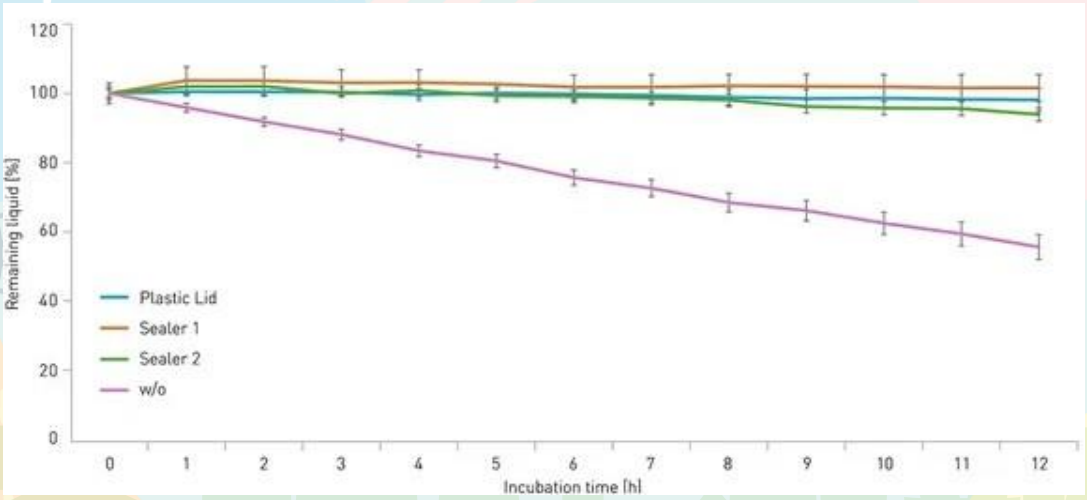

圖4：微孔盤的孔內蒸發現象。將96孔微孔盤每孔加200 µL培養基，並於37°C下培養12小時。每小時測量培養基的光徑長度，以反應每孔內的剩餘液體體積，圖中數據為96個孔的平均值及標準差。結果顯示，在37°C下96孔盤進行培養時，每孔200 µL液體在12小時內的蒸發率超過 40%，而使用不同的封膜可大幅降低蒸發，有效維持孔內液體體積穩定。

當潮濕且溫暖的空氣遇到較冷的表面時，空氣中的水分會在其表面凝結形成液滴，此現象稱為冷凝(condensation)。當含有微生物的培養盤從37°C培養箱轉移至室溫(約20–25°C)的讀盤儀器時，會發生這種情況。微孔盤的封膜上產生的冷凝水可能會散射光線，而增加OD讀值。

撰文：岑祥技術部

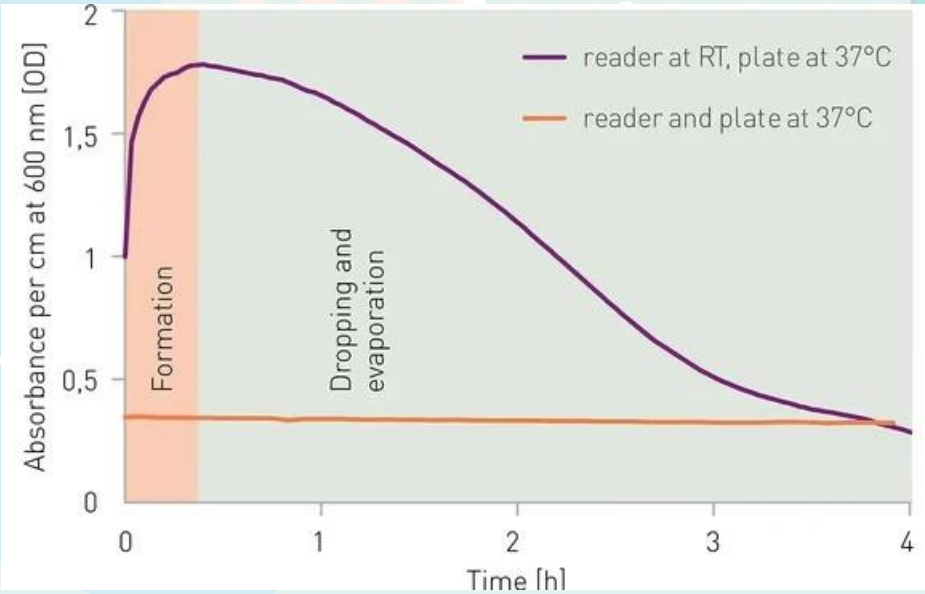

圖5：微孔盤封膜內冷凝的形成與消退。將96孔微孔盤每孔加入200 µL LB培養基，並以防水封膜密封後加熱至37°C。之後將微孔盤放入室溫(25°C)的微孔盤讀取儀器中，並開始進行OD_{600}測量。在測量初期前約20分鐘，由於液體蒸發作用，在所使用的封膜內側形成冷凝水。之後形成的冷凝水逐漸消散，此過程約需4小時才能完全恢復。即使將室溫的微孔盤放入已預熱的讀盤儀器中，也會存在一段過渡時間，直到溫度相關因素對OD值的影響趨於穩定為止。在開始測量前，確保微孔盤與讀盤儀器處於相同溫度，可避免冷凝現象的發生，而獲得更準確的讀值，在快速溫度變化的實驗中，溫度平衡尤其重要。

此外，水在約970 nm具有一個天然的吸收峰（圖6）。由於此波長區域通常不會被大多數分析物吸收，因此可用來估算含有水的樣品光徑長度，但在測量OD_{600}時，使用此種光徑校正方法存在問題，微生物所造成的光散射會在較寬波長範圍內發生，包括600 nm與1000 nm。由於散射會干擾1000 nm的吸光測量，因此使用water peak的光徑校正可能導致OD_{600}數值不準確。建議使用volume-based的校正方法，此方法會考慮微孔盤的尺寸來計算光徑長度，並由軟體進行修正。只要已知孔盤規格與使用體積，即可自動計算光徑並應用校正，且此方法不受光散射影響。

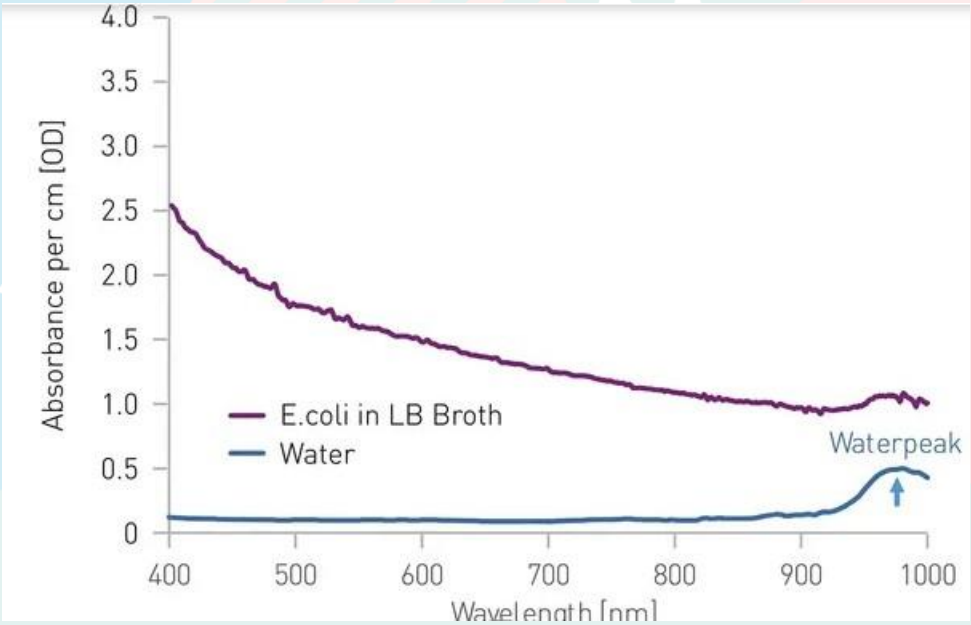

圖 6：純水與大腸桿菌懸浮液在LB培養基中的吸收光譜。

本文的建議皆對 OD_{600} 量測中的設定，例如如何降低數據變異性、避免蒸發以及優化生長條件等問題。透過調整震盪模式與頻率、使用Well Scanning，以及確保溫度一致性，研究人員可以獲得更準確且具再現性的OD_{600}測量結果。

參考文獻:

How to optimise OD600 measurements

原廠轉載說明&附上藍光官網原始連結

https://www.thco.com.tw/files/%E4%BD%BF%E7%94%A8BMG%20reader%E6%B8%AC%E9%87%8F%E5%BE%AE%E7%94%9F%E7%89%A9%E7%94%9F%E9%95%B7%E9%9C%80%E8%A6%81%E8%80%83%E9%87%8F%E7%9A%84%E5%9B%A0%E7%B4%A0.pdf