(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2017 年 6 月 29 日 (29.06.2017)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2017/107333 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/077794

(22) 国际申请日: 2016 年 3 月 30 日 (30.03.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201510971248.7 2015 年 12 月 21 日 (21.12.2015) CN

(71) 申请人: **江苏大学 (JIANGSU UNIVERSITY)** [CN/CN]; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。

(72) 发明人: **邹小波 (ZOU, Xiaobo)**; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 **李志华 (LI, Zhihua)**; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 **石吉勇 (SHI, Jiyong)**; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 **黄晓玮 (HUANG, Xiaowei)**; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 **周煦成 (ZHOU, Xucheng)**; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 **胡雪桃 (HU, Xuetao)**; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。

(74) 代理人: **北京德崇智捷知识产权代理有限公司 (JW IP LAW FIRM)**; 中国北京市朝阳区酒仙桥路 14 号 A5 楼 7 层 701, Beijing 100015 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

[见续页]

(54) **Title**: BACTERIAL COUNTING METHOD

(54) **发明名称**: 一种细菌计数方法

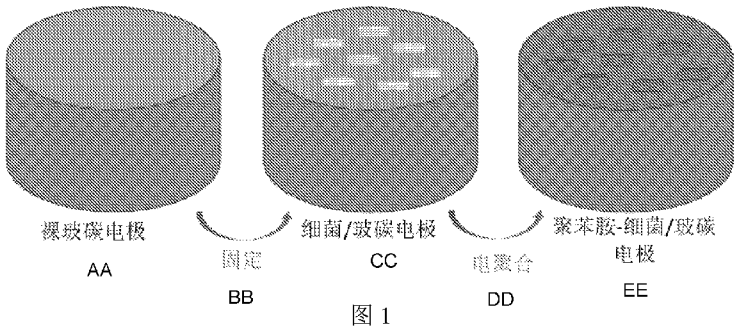


图 1

AA BARE GLASSY CARBON ELECTRODE
BB FIXATION
CC BACTERIA/GLASSY CARBON ELECTRODE
DD ELECTRIC POLYMERIZATION
EE POLYANILINE-BACTERIA/GLASSY CARBON ELECTRODE

(57) **Abstract**: Disclosed is a bacterial counting method, comprising the following steps, S1: preparing a polyaniline/bacterial composite film on the surface of a glassy carbon electrode by electric polymerization; S2: drawing the standard curve of the polyaniline/bacterial composite film modified electrode; and S3: determining the bacterial concentration of the bacteria solution sample to be tested according to the standard curve obtained in step S2. The method does not require the cultivation of the bacteria in the implementation process, such that same takes a short time and is easy to operate; the method uses aniline as the main reagent, and the consumption of the solution to be tested is small, such that the testing cost is low and the equipment is simple; the method has the advantages of a good repeatability and a wide detection linear range; and the method is an easy to operate, short time-consuming, and low cost bacterial counting method. The method is a bacterial counting method based on the polyaniline/bacterial composite film, and can achieve rapid and accurate detection of the bacterial thallus concentration.

(57) **摘要**:

[见续页]

WO 2017/107333 A1

RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

一种细菌计数方法，包括以下步骤，S1：利用电聚合法在玻碳电极表面制备聚苯胺/细菌复合薄膜；S2：绘制所述聚苯胺/细菌复合薄膜修饰电极标准曲线；S3：根据所述步骤 S2 所得标准曲线测定待测菌液样本的细菌浓度。本方法实施过程中无需对细菌进行培养，因此耗时短、操作简便；本方法以苯胺为主要试剂，待测液消耗量少，因此检测费用低、设备简单；本方法具有重复性好、检测线性范围宽的优点；是一种操作简便、耗时短、成本低的细菌计数方法，本方法是基于聚苯胺/细菌复合薄膜的细菌计数方法，能实现细菌菌体浓度的快速准确检测。

一种细菌计数方法

技术领域

本发明属于材料科学、微生物学领域，尤其涉及一种基于聚苯胺/细菌复合薄膜的细菌计数方法。

背景技术

细菌菌体浓度的检测在微生物发酵、环境监测、食品质量检测等领域都具有重要意义。目前，常用的细菌计数方法为培养法，包括平板计数法、MPN 法等。

平板计数法是检测菌落总数的国家标准检验法（参考文献见：GB/T 4789.2-2010 食品卫生微生物学检验菌落总数测定[S]），是判断其他计数方法准确性的标准方法，该方法对于平皿中的单菌落计数较准确，但由于培养皿中菌落疏密不均匀地排列，依靠人工观察粘连菌落并计数具有一定的主观性且计数不准确，整体来说该方法操作繁琐、耗时长、误差大、效率低。

MPN 是稀释培养测数法：适用于检测带有大量竞争菌的食品及其原料和未经处理的含少量金黄色葡萄球菌的食品。MPN 法是一种常见的间接计数法，但其存在一定的局限性。

这些培养法存在耗时较长，无菌操作要求严格，手续繁琐，劳动强度大，受培养条件影响较大等不足。

为克服培养法的不足，多种计数方法被广泛采用。其中相对可靠并被广泛认可的有荧光显微镜计数法和流式细胞仪计数法，其中荧光显微镜(Fluorescence microscope)计数法：荧光显微镜是以紫外线为光源，用以照射被检物体，使之发出荧光，然后在显微镜下观察物体的形状、所在位置及其数量。流式细胞仪计数法是通过激光对通过激光束的颗粒进行计数，当颗粒或者细胞通过激光束的时候，会对光线产生折射和反射。这个折射和反射的信号被探测器记录下来。每通过一个细胞，就会产生一个峰值，最后记录峰值的个数。

虽然这两种方法具有快速、准确的特点，但存在设备昂贵，使用和维护成本高等不足。因此，寻求一种操作简便、快速，成本低的细菌计数方法具有重要价值。

发明内容

本发明的目的是为了解决现有技术中的不足，提出了一种操作简便、耗时短、成本

低的细菌计数方法，能实现细菌菌体浓度的快速准确检测。

本发明的技术方案是：一种细菌计数方法，包括以下步骤：

S1：利用电聚合法在玻碳电极表面制备聚苯胺/细菌复合薄膜；

S2：绘制所述聚苯胺/细菌复合薄膜修饰电极标准曲线；

S3：根据所述步骤 S2 所得标准曲线测定待测菌液样本的细菌浓度。

上述方案中，所述步骤 S1 具体包括以下步骤：

1) 标准菌悬液准备：

配制细菌培养液，高压灭菌后接种适量菌种进行培养，将培养后所获得菌液离心清洗，便得到标准菌悬液；

2) 细菌在玻碳电极表面的固定：

所述玻碳电极进行预处理后，测定其循环伏安曲线，直至氧化-还原峰电位差降至 80 mV 以内，将所述玻碳电极晾干；取所述标准菌悬液滴至玻碳电极表面后，经烘干即可将细菌固定在所述玻碳电极表面；

3) 苯胺在电极表面的聚合：

将上述固定有细菌的玻碳电极置于含有苯胺的硫酸溶液中采用循环伏安法扫描，苯胺在玻碳电极表面聚合得到聚苯胺/细菌复合薄膜。

上述方案中，所述硫酸溶液为 0.5M，苯胺为 0.1M，循环伏安法扫描 1~20 圈，扫描速率为 5~100 mV/s，电压下限为–0.6~0 V，电压上限为 0.75~1.2 V。

优选的， 所述扫描圈数为 10 圈，所述扫描速率为 50 mV/s，所述扫描的电压范围为 -0.2~0.9 V。

上述方案中，所述步骤 S2 具体包括以下步骤：

1）将步骤 S1 所得的标准菌悬液依次按梯度稀释获得不同浓度的菌悬液；

2）利用所获得的不同浓度的菌悬液分别按照步骤 S1 所述在玻碳电极表面制备聚苯胺/细菌复合薄膜，蒸馏水漂洗后于 0.1 M H_2SO_4 溶液中测定其循环伏安曲线，扫描速率为 50 mV/s，扫描的电压范围为–0.2~0.9 V；

3）以细菌浓度对数为横坐标，以 2）中所得循环伏安曲线最高峰所对应的峰电流为纵坐标，绘制所述聚苯胺/细菌复合薄膜修饰电极标准曲线。

上术方案中，所述步骤 S3 具体包括以下步骤：

1）利用待测菌悬液按照步骤 S1 所述在玻碳电极表面制备聚苯胺/细菌复合薄膜，按照步骤 S2 所述测定其循环伏安曲线；

2）确定循环伏安曲线的峰电流，根据步骤 S2 中所得聚苯胺/细菌复合薄膜修饰电极标准曲线计算其细菌浓度。

现有技术相比本发明的有益效果：

1、本发明利用电聚合法在玻碳电极表面制备聚苯胺/细菌复合薄膜，由于固定于玻碳电极表面的细菌对苯胺在电极表面聚合具有阻碍作用，从而使得所制备聚苯胺/细菌复合薄膜表现出不同的电化学特性，能实现细菌菌体浓度的快速准确检测。

2、本发明实施过程中无需像传统平板计数法等对细菌进行培养后再统计，因此耗时短、操作简便。

3、本发明以苯胺为主要试剂，待测液消耗量少，因此检测费用低、设备简单。

4、本发明所述方法对同一细菌菌体浓度测量具有重复性好、检测线性范围宽的优点。

附图说明

图 1 为聚苯胺/细菌复合薄膜的整体制备过程示意图。

图 2（a）为利用循环伏安法制备聚苯胺-细菌复合薄膜过程中电极循环伏安曲线变化情况图。

图 2（b）为所制备聚苯胺/细菌复合薄膜与纯聚苯胺膜的形貌对比图。

图 3(a)为采用不同浓度枯草芽孢杆菌菌悬液所制备聚苯胺/细菌复合膜修饰玻碳电极在 0.1 M H_2SO_4 溶液中的循环伏安曲线图。

图 3(b)为聚苯胺/枯草芽孢杆菌薄膜修饰电极的循环伏安曲线在 0.2 V 处峰电流的标准曲线图。

图 4 为不同浓度枯草芽孢杆菌菌悬液样本采用平板菌落计数法和本发明所述聚苯胺/细菌薄膜计数法检测结果对比图。

图 5 为聚苯胺/大肠杆菌薄膜修饰电极的循环伏安曲线在 0.2 V 处峰电流的标准曲线图。

图 6 为聚苯胺/嗜热链球菌薄膜修饰电极的循环伏安曲线在 0.2 V 处峰电流的标准曲线图。

具体实施方式

下面分别以枯草芽孢杆菌、埃希氏大肠杆菌和嗜热链球菌为具体实施方式并结合附图对本发明作进一步详细说明，但本发明的保护范围并不限于此。

实施例 1

本发明使用的苯胺、硫酸、酵母提取物、胰化蛋白胨均购自国药集团化学试剂有限

公司，苯胺经过减压蒸馏后使用。电化学测定采用 CHI660D 电化学工作站（上海辰华仪器有限公司）。本实施例以枯草芽孢杆菌为例进行说明，菌种购自中国工业微生物菌种保藏中心。

所述细菌计数方法包括以下步骤：

S1、利用电聚合法在玻碳电极表面制备聚苯胺/细菌复合薄膜；

图 1 显示了聚苯胺/细菌复合薄膜的整体制备过程，具体步骤如下：

（1）标准菌悬液准备

取酵母提取物 5 g，胰化蛋白胨 10 g，氯化钠 10 g，加水配制成 1 L 培养液，利用 NaOH 调节 pH 至 7.0，121℃，20 min，高压灭菌后接种适量枯草芽孢杆菌菌种，37 ℃恒温培养箱培养 20 h。将所获得菌液在 3500 g 离心力下 4℃离心 10 min 清洗 3 次，得到标准枯草芽孢杆菌悬浮液，采用平板菌落计数法测定其菌体浓度为 5.33×10^{8} CFU·mL^{-1}；

（2）细菌在玻碳电极表面的固定

玻碳电极依次用金相砂纸、0.3μm 和 0.05 μm 的 Al_2O_3 粉末抛光，再分别用乙醇、水超声清洗后，在 1 mM 的 $K_3[Fe(CN)_6]$溶液中测定玻碳电极的循环伏安（CV）曲线，直至氧化-还原峰电位差降至 80 mV 以内，晾干，确保电极初始状态一致；取 10 μL 标准枯草芽孢杆菌悬液滴至玻碳电极表面，经 50 ℃烘箱 15 min 烘干即可将细菌固定在所述玻碳电极表面，得到细菌/玻碳电极；

（3）苯胺在电极表面的聚合

将上述固定有细菌的玻碳电极置于含有 0.1 M 苯胺的硫酸（0.5 M）溶液中采用循环伏安法以铂丝电极为对电极，银/氯化银电极为参比电极扫描。为了获取较高的检测灵敏度，优选地，扫描 10 圈，扫描速率为 50 mV/s，电压下限为–0.2 V，电压上限为 0.9 V，得到聚苯胺/枯草芽孢杆菌复合薄膜。图 2（a）为利用循环伏安法制备聚苯胺/细菌复合薄膜过程中电极循环伏安曲线变化情况，其中出现了 3 对典型的氧化还原峰：Ia/Ic，IIa/IIc，IIIa/IIIc，说明了苯胺在电极表面的成功聚合；此外，扫描电流随着扫描圈数的增加逐渐增大，这印证了聚苯胺聚合时的自催化作用。图 2（b）是细菌浓度为 5.33×10^{5} CFU·mL^{-1} 时所制备聚苯胺/枯草芽孢杆菌复合薄膜与纯聚苯胺膜的形貌对比，两种薄膜在形貌上明显不同，说明菌体的固定对聚苯胺在电极表面的沉积具有较大影响，从而使其表现出不同的电化学特性，为菌体浓度的定量检测提供基础。

S2. 绘制所述聚苯胺/细菌复合薄膜修饰电极标准曲线；

将步骤 S1 所得浓度为 5.33×10^{8} CFU·mL^{-1} 的标准菌悬液依次稀释为 1.066×10^{8}

$CFU·mL^{-1}$，$5.33×10^7$ $CFU·mL^{-1}$，$5.33×10^6$ $CFU·mL^{-1}$，$1.066×10^6$ $CFU·mL^{-1}$，$5.33×10^5$ $CFU·mL^{-1}$，$5.33×10^4$ $CFU·mL^{-1}$。利用所获得的不同浓度的菌悬液按照步骤 S1 所述在玻碳电极表面制备聚苯胺/枯草芽孢杆菌复合薄膜，蒸馏水漂洗后于 0.1 M H_2SO_4 溶液中测定其循环伏安曲线。扫描范围电压为–0.2~0.9 V，扫描速率为 50 mV/s。

以细菌浓度对数为横坐标 X，以所得循环伏安曲线在 0.2V 处的峰电流为纵坐标 Y，绘制聚苯胺/枯草芽孢杆菌复合薄膜修饰电极标准曲线。图 3（a）为不同浓度菌悬液所对应的循环伏安曲线，图 3（b）其峰电流标准曲线，由图 3 可知电极在 0.2 V 处的峰电流与细菌浓度对数呈现良好的线性关系：$Y=-30.413X+272.560$, $R^2=0.982$。

S3. 测定待测菌液样本的细菌浓度。

利用待测菌悬液按照步骤 S1 所述制备聚苯胺/枯草芽孢杆菌复合膜，按照步骤 S2 所述测定其在 0.1 M H_2SO_4 溶液中的循环伏安曲线，根据其在 0.2 V 处的峰电流由步骤 S2 中所得聚苯胺/枯草芽孢杆菌复合薄膜修饰电极标准曲线计算其菌体浓度。表 1 和图 4 为基于所述聚苯胺/细菌复合薄膜计数法和平板菌落技术法的测定结果对比，结果表明，本发明所述方法 5 次测定的菌悬液浓度均值与平板菌落计数法测定结果基本一致，但其相对标准偏差明显低于平板菌落计数法，说明其具有更好的稳定性，本发明所述聚苯胺/细菌复合薄膜计数法计数结果优于传统的平板菌落计数法。

表 1 基于聚苯胺/细菌复合薄膜计数法和平板菌落技术法的测定枯草芽孢杆菌样本结果对比

项目 / 编号	平板菌落计数法		苯胺/细菌复合薄膜计数法	
	均值（$CFU·mL^{-1}$）	相对标准偏差	均值（$CFU·mL^{-1}$）	相对标准偏差
样本 1	$9.72×10^4$	9.57%	$9.21×10^4$	5.21%
样本 2	$4.37×10^5$	15.29%	$4.59×10^5$	5.49%
样本 3	$7.54×10^7$	8.73%	$8.11×10^7$	3.87%

实施例 2

本实施例与实施例 1 采用的方法相同，不同之处在于本实施例以埃希氏大肠杆菌为例进行说明，菌种购自中国工业微生物菌种保藏中心。

采用与实施例 1 中步骤 S1 所述相同的方法获得菌体浓度为 $9.26×10^8$ $CFU·mL^{-1}$ 的标准大肠杆菌悬液，依次稀释为 $9.26×10^7$ $CFU·mL^{-1}$，$9.26×10^6$ $CFU·mL^{-1}$，$9.26×10^5$ $CFU·mL^{-1}$，

9.26×10^4 CFU·mL^{-1}, 9.26×10^3 CFU·mL^{-1}。

按照实施例 1 中步骤 S2 所述方法以大肠杆菌浓度对数为横坐标 X，以所得循环伏安曲线在 0.2V 处的峰电流为纵坐标 Y，绘制聚苯胺/大肠杆菌复合薄膜修饰电极标准曲线。由图 5 可知电极在 0.2 V 处的峰电流与大肠杆菌浓度对数呈现良好的线性关系：Y=−24.249X+217.33, R^2=0.996。

按照实施例 1 中步骤 S3 所述测定待测大肠杆菌菌液样本，表 2 为基于所述聚苯胺/细菌复合薄膜计数法和平板菌落技术法的测定大肠杆菌样本结果对比，结果表明，本发明所述方法 5 次测定的菌悬液浓度均值与平板菌落计数法测定结果基本一致，但其相对标准偏差明显低于平板菌落计数法，说明其具有更好的稳定性，本发明所述聚苯胺/细菌复合薄膜计数法同样适用于埃希氏大肠杆菌样本。

表 2 基于所述聚苯胺/细菌复合薄膜计数法和平板菌落技术法的测定大肠杆菌样本结果对比

项目 / 编号		平板菌落计数法		苯胺/细菌复合薄膜计数法	
		均值（CFU·mL^{-1}）	相对标准偏差	均值（CFU·mL^{-1}）	相对标准偏差
大肠杆菌	样本 1	8.12×10^4	8.66%	8.72×10^4	4.31%
	样本 2	5.23×10^6	15.29%	4.97×10^6	5.19%

实施例 3

本实施例与实施例 1 和 2 采用的方法相同，不同之处在于本实施例以嗜热链球菌为例进行说明，菌种购自中国工业微生物菌种保藏中心。

称取 MRS 肉汤培养基（购自青岛海博生物技术有限公司）52.4g，加热溶解于 1 L 蒸馏水中，118℃高压灭菌 15min，冷却后接种适量嗜热链球菌菌种，37 ℃恒温培养箱培养 20 h。将所获得菌液在 3500 g 离心力下 4℃离心 10 min 清洗 3 次，得到标准嗜热链球菌悬浮液，采用平板菌落计数法测定其菌体浓度为 6.72×10^9 CFU·mL^{-1}。将该标准悬浮液依次稀释为 6.72×10^8 CFU·mL^{-1}，6.72×10^7 CFU·mL^{-1}，6.72×10^6 CFU·mL^{-1}，6.72×10^5 CFU·mL^{-1}，6.72×10^4 CFU·mL^{-1}。按照实施例 1 中步骤 S2 所述方法以细菌浓度对数为横坐标 X，以所得循环伏安曲线在 0.2V 处的峰电流为纵坐标 Y，绘制聚苯胺/嗜热链球菌复合

薄膜修饰电极标准曲线。由图 6 可知电极在 0.2 V 处的峰电流与细菌浓度对数呈现良好的线性关系：Y=−28.601X+278.430，R^2=0.988。

按照实施例 1 中 S3 所述测定待测嗜热链球菌菌液样本，表 3 为基于所述聚苯胺/细菌复合薄膜计数法和平板菌落技术法的测定嗜热链球菌样本结果对比，结果表明，本发明所述方法 5 次测定的菌悬液浓度均值与平板菌落计数法测定结果基本一致，但其相对标准偏差明显低于平板菌落计数法，说明其具有更好的稳定性，本发明所述聚苯胺/细菌复合薄膜计数法同样适用于嗜热链球菌样本。

表 3 基于所述聚苯胺/细菌复合薄膜计数法和平板菌落技术法的测定嗜热链球菌样本结果对比

项目 / 编号		平板菌落计数法		苯胺/细菌复合薄膜计数法	
		均值（$CFU\cdot mL^{-1}$）	相对标准偏差	均值（$CFU\cdot mL^{-1}$）	相对标准偏差
嗜热链球菌	样本 1	3.22×10^8	10.54%	3.61×10^8	4.81%
	样本 2	2.89×10^5	11.76%	3.13×10^5	5.24%

所述实施例为本发明的优选的实施方式，但本发明并不限于上述实施方式，在不背离本发明的实质内容的情况下，本领域技术人员能够做出的任何显而易见的改进、替换或变型均属于本发明的保护范围。

权 利 要 求 书

1、一种细菌计数方法，其特征在于，包括以下步骤：

S1：利用电聚合法在玻碳电极表面制备聚苯胺/细菌复合薄膜；

S2：绘制所述聚苯胺/细菌复合薄膜修饰电极标准曲线；

S3：根据所述步骤 S2 所得标准曲线测定待测菌液样本的细菌浓度。

2、根据权利要求 1 所述的细菌计数方法，其特征在于，所述步骤 S1 具体包括以下步骤：

1) 标准菌悬液准备：

配制细菌培养液，高压灭菌后接种适量菌种进行培养，将培养后所获得菌液离心清洗，便得到标准菌悬液；

2) 细菌在玻碳电极表面的固定：

所述玻碳电极进行预处理后，测定其循环伏安曲线，直至氧化-还原峰电位差降至 80 mV 以内，将所述玻碳电极晾干；取所述标准菌悬液滴至玻碳电极表面后，经烘干即可将细菌固定在所述玻碳电极表面；

3) 苯胺在电极表面的聚合：

将上述固定有细菌的玻碳电极置于含有苯胺的硫酸溶液中采用循环伏安法扫描，苯胺在玻碳电极表面聚合得到聚苯胺/细菌复合薄膜。

3、根据权利要求 2 所述的细菌计数方法，其特征在于，所述硫酸溶液为 0.5M，苯胺为 0.1M，循环伏安法扫描 1~20 圈，扫描速率为 5~100 mV/s，电压下限为–0.6~0 V，电压上限为 0.75~1.2 V。

4、根据权利要求 3 所述的细菌计数方法，其特征在于， 所述扫描圈数为 10 圈，所述扫描速率为 50 mV/s，所述扫描的电压范围为-0.2~0.9 V。

5、根据权利要求 1 所述的细菌计数方法，其特征在于，所述步骤 S2 具体包括以下步骤：

1）将步骤 S1 所得的标准菌悬液依次按梯度稀释获得不同浓度的菌悬液；

2）利用所获得的不同浓度的菌悬液分别按照步骤 S1 所述在玻碳电极表面制备聚苯胺/细菌复合薄膜，蒸馏水漂洗后于 0.1 M H_2SO_4 溶液中测定其循环伏安曲线，扫描速率为 50 mV/s，扫描的电压范围为–0.2~0.9 V；

3）以细菌浓度对数为横坐标，以 2）中所得循环伏安曲线最高峰所对应的峰电流为纵坐标，绘制所述聚苯胺/细菌复合薄膜修饰电极标准曲线。

6、根据权利要求 1 所述的细菌计数方法，其特征在于，所述步骤 S3 具体包括以下步骤：

1）利用待测菌悬液按照步骤 S1 所述在玻碳电极表面制备聚苯胺/细菌复合薄膜，按照步骤 S2 所述测定其循环伏安曲线；

2）确定循环伏安曲线的峰电流，根据步骤 S2 中所得聚苯胺/细菌复合薄膜修饰电极标准曲线计算其细菌浓度。

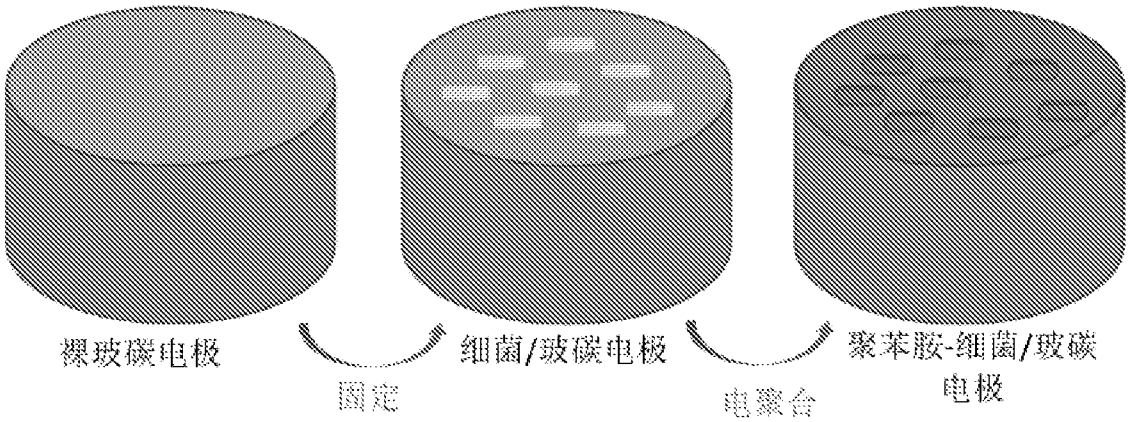
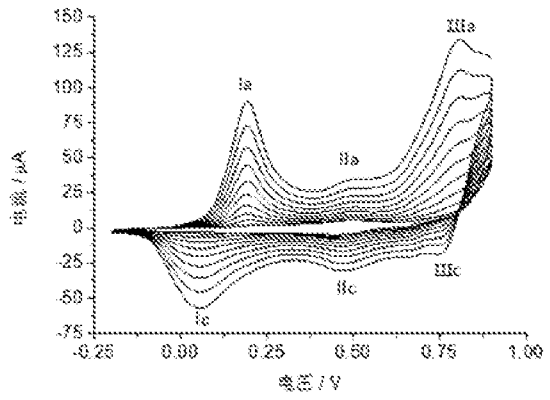
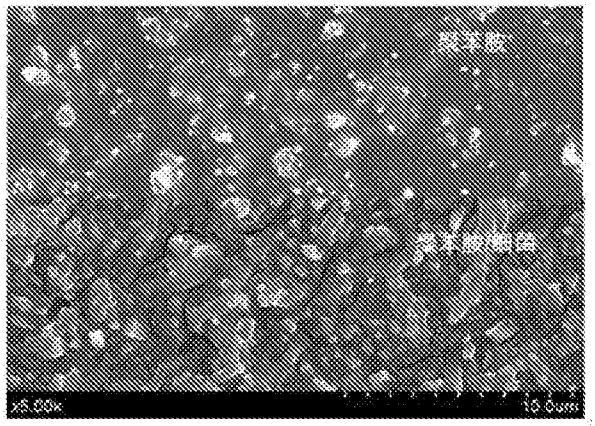

裸玻碳电极
固定
细菌/玻碳电极
电聚合
聚苯胺-细菌/玻碳电极

图 1

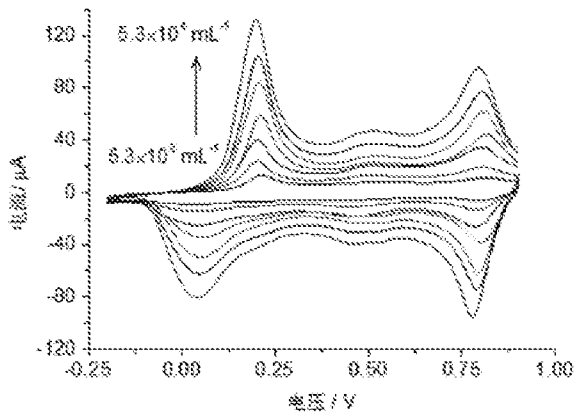

Ia
IIa
IIIa
Ic
IIc
IIIc
电流 / μA
电压 / V

(a)

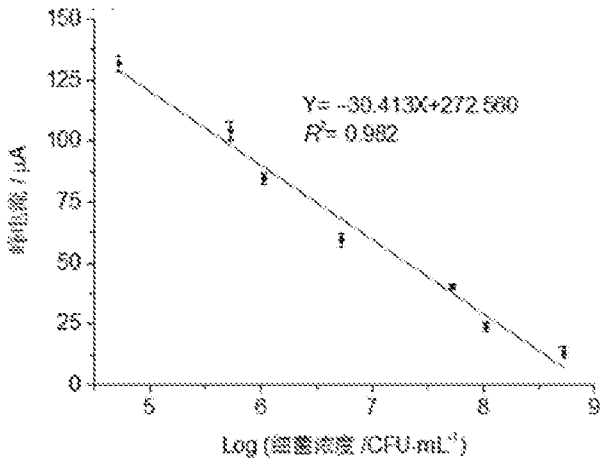


(b)

图 2


5.3×10⁶ mL⁻¹
5.3×10³ mL⁻¹
电流 / μA
电压 / V

(a)


Y= -30.413X+272.560
R²= 0.982
峰电流 / μA
Log (细菌浓度 /CFU·mL⁻¹)

(b)

图 3

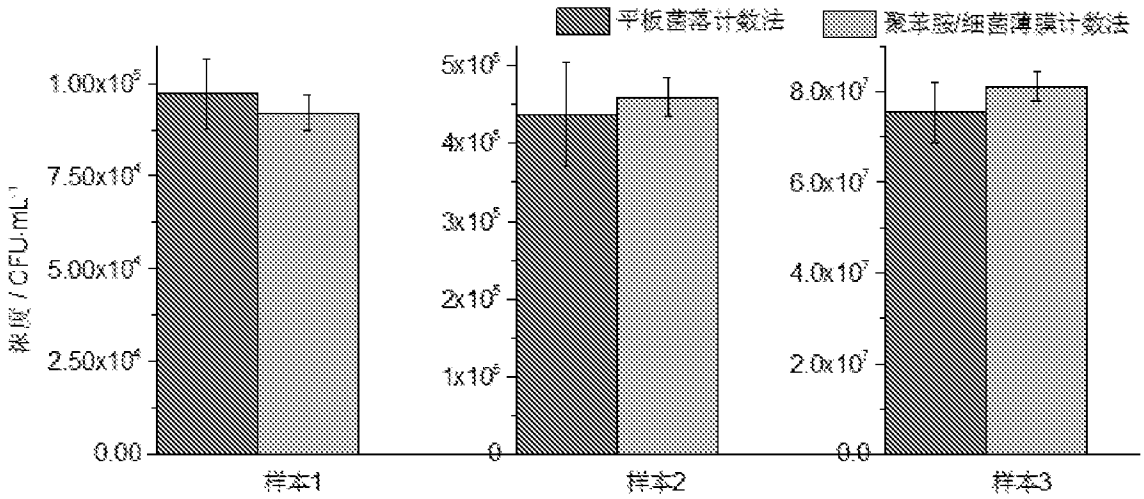

平板菌落计数法
聚苯胺/细菌薄膜计数法
浓度 / CFU·mL⁻¹
1.00x10⁵
7.50x10⁴
5.00x10⁴
2.50x10⁴
0.00
5x10⁵
4x10⁵
3x10⁵
2x10⁵
1x10⁵
0
8.0x10⁷
6.0x10⁷
4.0x10⁷
2.0x10⁷
0.0
样本1
样本2
样本3

图 4

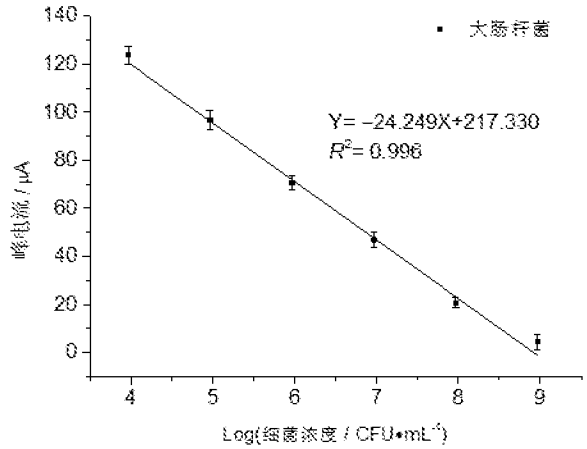

大肠杆菌
Y= -24.249X+217.330
R²= 0.996
峰电流 / μA
Log(细菌浓度 / CFU•mL⁻¹)

图 5

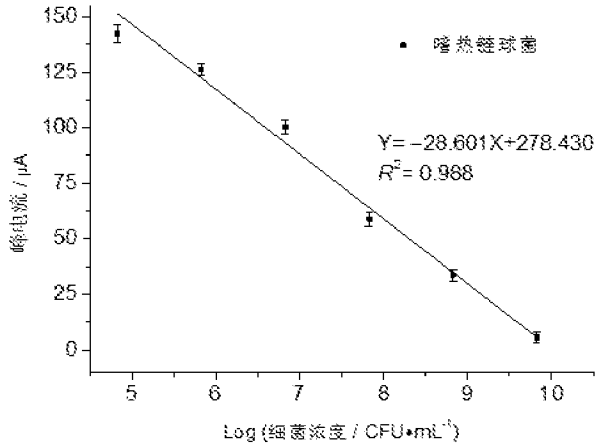

嗜热链球菌
Y= -28.601X+278.430
R²= 0.988
峰电流 / μA
Log (细菌浓度 / CFU•mL⁻¹)

图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/077794

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/06 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/-; G01N 15/-; G01N 27/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNPAT, WPI, EPODOC: bacteria, microbe+, coli, streptococcus, bacillus, polyaniline, PANI, film?, membrane+, pole, electrode, cyclic voltammetry, CV, count+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101216449 A (SHENYANG NORMAL UNIVERSITY) 09 July 2008 (09.07.2008) description, page 1, paragraphs [0001] and [0002], page 2, line 13 to page 4, the last line, and figures 1-4	1, 5, 6
A	CN 101003830 A (EAST CHINA NORMAL UNIVERSITY) 25 July 2007 (25.07.2007) the whole document	1-6
A	CN 104198558 A (TIANJIN POLYTECHNIC UNIVERSITY) 10 December 2014 (10.12.2014) the whole document	1-6
A	CN 104407031 A (NINGBO UNIVERSITY) 11 March 2015 (11.03.2015) the whole document	1-6
A	CN 105067694 A (HEBEI UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 18 November 2015 (18.11.2015) the whole document	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
07 July 2016	26 July 2016
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer CHEN, You Telephone No. (86-10) 010-53318972

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/077794

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4528270 A (KABUSHIKI KAISYA ADVANCE KAIHATSU KENKYUJO) 09 July 1985 (09.07.1985) the whole document	1-6
A	GAO, Hongyan et al., "On bacteria biosensor based on E.coli modified carbon paste electrode by cyclic voltammetry" Journal of Shenyang Normal University(Natural Science Edition), volume 29, number 2, 30 April 2011 (30.04.2011), ISSN:1673-5862, pages 305-308	1-6
A	US 2004175780 A1 (LI, Yanbin et al.) 09 September 2004 (09.09.2004) the whole document	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/077794

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101216449 A	09 July 2008	CN 101216449 B	18 January 2012
CN 101003830 A	25 July 2007	CN 101003830 B	01 December 2010
CN 104198558 A	10 December 2014	None	
CN 104407031 A	11 March 2015	None	
CN 105067694 A	18 November 2015	None	
US 4528270 A	09 July 1985	GB 2131954 A	27 June 1984
		GB 2131954 B	12 March 1986
		JP H045440 B	31 January 1992
		JP H0435160 B	10 June 1992
		DE 3339408 A1	03 May 1984
		JP S5981551 A	11 May 1984
		JP S59179097 A	11 October 1984
		JP S59179098 A	11 October 1984
US 2004175780 A1	09 September 2004	US 7238496 B2	03 July 2007

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/077794

A. 主题的分类

C12Q 1/06(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12Q1/-, G01N15/-, G01N27/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNKI, CNPAT, WPI, EPODOC, 细菌，微生物，大肠杆菌，链球菌，芽孢杆菌，计数，浓度，电化学，电聚合，电极，苯胺，聚苯胺，聚合物，复合膜，复合，循环伏安，bacteria, microbe+, coli, streptococcus, bacillus, polyaniline, PANI , film?, membrane+, pole, electrode, cyclic voltammetry, CV, count+。

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 101216449 A (沈阳师范大学) 2008年 7月 9日 (2008-07-09) 说明书第1页第1-2段，第2页第13行至第4页最后一行，附图1-4	1、5、6
A	CN 101003830 A (华东师范大学) 2007年 7月 25日 (2007-07-25) 全文	1-6
A	CN 104198558 A (天津工业大学) 2014年 12月 10日 (2014-12-10) 全文	1-6
A	CN 104407031 A (宁波大学) 2015年 3月 11日 (2015-03-11) 全文	1-6
A	CN 105067694 A (河北科技大学) 2015年 11月 18日 (2015-11-18) 全文	1-6
A	US 4528270 A (KABUSHIKI KAISYA ADVANCE KAIHATSU KENKYUJO) 1985年 7月 9日 (1985-07-09) 全文	1-6

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2016年 7月 7日	2016年 7月 26日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 陈优 电话号码 (86-10)010-53318972

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	高鸿雁 等. "大肠杆菌微生物传感器研究" 沈阳师范大学学报(自然科学版), 第29卷，第2期，2011年 4月 30日 (2011 - 04 - 30)， ISSN：1673-5862, 第305-308页	1-6
A	US 2004175780 A1 (LI, YAN BIN ET AL.) 2004年 9月 9日 (2004 - 09 - 09) 全文	1-6

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2016/077794

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101216449	A	2008年 7月 9日	CN	101216449	B	2012年 1月 18日
CN	101003830	A	2007年 7月 25日	CN	101003830	B	2010年 12月 1日
CN	104198558	A	2014年 12月 10日		无		
CN	104407031	A	2015年 3月 11日		无		
CN	105067694	A	2015年 11月 18日		无		
US	4528270	A	1985年 7月 9日	GB	2131954	A	1984年 6月 27日
				GB	2131954	B	1986年 3月 12日
				JP	H045440	B	1992年 1月 31日
				JP	H0435160	B	1992年 6月 10日
				DE	3339408	A1	1984年 5月 3日
				JP	S5981551	A	1984年 5月 11日
				JP	S59179097	A	1984年 10月 11日
				JP	S59179098	A	1984年 10月 11日
US	2004175780	A1	2004年 9月 9日	US	7238496	B2	2007年 7月 3日