



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112980917 A

(43)申请公布日 2021.06.18

(21)申请号 201911293653.2

(22)申请日 2019.12.16

(71)申请人 天津大学

地址 300072 天津市南开区卫津路92号

(72)发明人 崔丽敏 赵伟高 赵鹏 孟玉杰

田一梅 褚献献

(74)专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代

理事务所 12201

代理人 吴学颖

(51)Int.Cl.

C12Q 1/10(2006.01)

C12Q 1/06(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

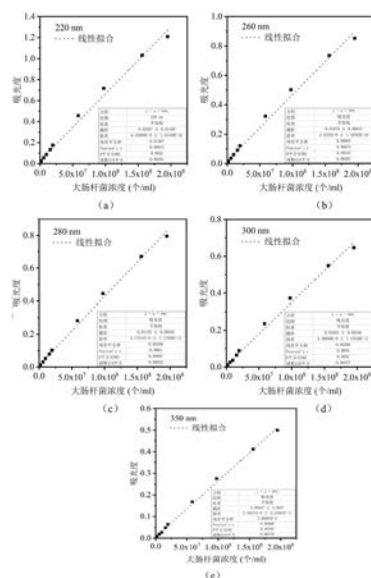
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54)发明名称

一种快速定量水中大肠杆菌的方法

(57)摘要

本发明公开了一种快速定量水中大肠杆菌的方法,通过紫外可见分光光度计分别测定不同浓度大肠杆菌在波长220、260、280、300、350、400、450、500、550nm处的吸光度,同时用显微计数法对大肠杆菌细胞进行精确计数,在吸光度和大肠杆菌浓度之间建立了良好的线性关系,根据所得到的校正曲线或回归方程快速定量待测样品中的大肠杆菌。本发明专利提供了一种快速定量水中大肠杆菌的方法,测量简便,无需试剂,快速准确,可用于较高浓度、大批量样品的测量。



1. 一种快速定量水中大肠杆菌的方法,其特征在于,将含大肠杆菌的待测样品稀释一定倍数后,采用紫外可见分光光度计测定待测样品在特定波长处的吸光度,根据建立的吸光度和大肠杆菌浓度之间的校正曲线或回归方程,计算得到待测样品中大肠杆菌的浓度。

2. 根据权利要求1所述的快速定量水中大肠杆菌的方法,其特征在于,

(1) 建立校正曲线或回归方程

配制一组不同浓度的大肠杆菌菌悬液,通过紫外可见分光光度计分别在波长220、260、280、300、350、400、450、500、550nm处测定其吸光度A,同时,用显微计数法将对应的每个浓度的菌悬液样品进行细胞精确计数,得到单位体积菌悬液中大肠杆菌浓度C;分别测定空白样品在波长220、260、280、300、350、400、450、500、550nm处的吸光度 $A_I$ ,根据吸光度 $A-A_I$ 和大肠杆菌浓度C绘制校正曲线,或线性回归得到对应波长处的回归方程;

(2) 计算大肠杆菌的浓度

稀释含大肠杆菌的待测样品,使稀释后菌悬液中的大肠杆菌浓度在回归方程或校正曲线的线性范围内,在与步骤(1)相同的条件下,采用紫外可见分光光度计测定220、260、280、300、350、400、450、500、550nm中任一波长处稀释后菌悬液的吸光度,根据对应的校正曲线或回归方程计算得到待测样品中的大肠杆菌浓度。

3. 根据权利要求2所述的快速定量水中大肠杆菌的方法,其特征在于,步骤(1)中所述校正曲线或回归方程的具体建立方法如下:

取一定量的大肠杆菌菌悬液,分别稀释1、1.25、2、3、10、12.5、20、33、100、125、200、333、1000倍,空白组加入灭菌的背景溶液,将稀释后不同浓度的菌悬液和空白组加入灭菌离心管中,每组3个平行样;通过紫外可见分光光度计分别测定每个浓度的大肠杆菌菌悬液在220、260、280、300、350、400、450、500、550nm波长处的吸光度,取平均值得到该浓度菌悬液的吸光度A,空白样品的吸光度 $A_I$ ;同时,用显微计数法对各个浓度的菌悬液进行细胞精确计数,每个样品重复3次,取平均值得到大肠杆菌浓度C,在吸光度 $A-A_I$ 和大肠杆菌浓度C之间建立校正曲线或回归方程。

4. 根据权利要求3所述的快速定量水中大肠杆菌的方法,其特征在于,所述大肠杆菌菌悬液的制备按如下方法进行:

(1) 培养基的配置:

按照说明配置营养肉汤培养基,并将培养基灭菌;

(2) 大肠杆菌的培养:

将大肠杆菌工作菌种接种至灭菌营养肉汤培养基中,菌液接种量1%-2%,在37恒温振荡培养箱中培养至对数生长期,时间约为16-24h,转速150-170r/min;

(3) 大肠杆菌菌悬液的制备:

在4℃条件下,以7000r/min离心10min,去除培养基,将大肠杆菌菌体沉淀振荡重悬于生理盐水或磷酸盐缓冲溶液中,之后再次离心,再次重悬,总共洗涤3次,最后重悬于生理盐水或磷酸盐缓冲溶液中即制成大肠杆菌菌悬液。

## 一种快速定量水中大肠杆菌的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物、医学与环保领域,更具体的说,是涉及一种快速定量水中大肠杆菌的方法。

### 背景技术

[0002] 大肠杆菌是水中的常见病原菌,会造成传染性的肠道疾病,危害人们的身体健康。大肠杆菌是水质检测中的重要指标:《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB18918-2002)规定,污水处理厂出水中粪大肠杆菌要求低于10000个/L(一级A标);《生活饮用水卫生标准》(GB5749-2006)规定,标准饮用水中总大肠杆菌群不得检出。另外,作为一种代表性的革兰氏阴性菌,大肠杆菌是科学研究中的典型微生物。因此,对水中大肠杆菌的快速定量检测尤为重要。

[0003] 水体中细菌微生物现有的定量方法主要包括显微计数法、平板菌落计数法、发酵法、流式细胞仪计数法等。传统的显微计数法需要使用血球计数板或细菌计数板,检测随机性大、效率低、准确度不高;平板菌落计数法是最经典且常用的计数方法,但其耗时较长,在菌液浓度较大时需多次稀释(培养基菌落最佳计数范围为30-300个),且只能对具有生长活性的细菌进行计数,误差较大,不便于大量样品的快速测定;发酵法需多次培养,步骤繁琐;流式细胞仪计数法虽快速准确,但需建立合适的方法才能准确测定,且价格昂贵,不便于普遍使用。

[0004] 现有的测试方法较为繁琐,效率低,多适用于低浓度样品。本专利提供一种快速定量水中大肠杆菌的方法,测量简便,无需试剂,可用于较高浓度、大批量样品的快速测量。

### 发明内容

[0005] 针对现有技术中大肠杆菌快速定量监测方法不足的技术现状,本发明提供一种更方便、简单、有效的快速定量水中大肠杆菌的方法。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的。

[0007] 本发明快速定量水中大肠杆菌的方法,将含大肠杆菌的待测样品稀释一定倍数后,采用紫外可见分光光度计测定待测样品在特定波长处的吸光度,根据建立的吸光度和大肠杆菌浓度之间的校正曲线或回归方程,计算得到待测样品中大肠杆菌的浓度。

[0008] (1) 建立校正曲线或回归方程

[0009] 配制一组不同浓度的大肠杆菌菌悬液,通过紫外可见分光光度计分别在波长220、260、280、300、350、400、450、500、550nm处测定其吸光度A,同时,用显微计数法将对应的每个浓度的菌悬液样品进行细胞精确计数,得到单位体积菌悬液中大肠杆菌浓度C;分别测定空白样品在波长220、260、280、300、350、400、450、500、550nm处的吸光度 $A_i$ ,根据吸光度 $A-A_i$ 和大肠杆菌浓度C绘制校正曲线,或线性回归得到对应波长处的回归方程;

[0010] (2) 计算大肠杆菌的浓度

[0011] 稀释含大肠杆菌的待测样品,使稀释后菌悬液中的大肠杆菌浓度在回归方程或校

正曲线的线性范围内,在与步骤(1)相同的条件下,采用紫外可见分光光度计测定220、260、280、300、350、400、450、500、550nm中任一波长处稀释后菌悬液的吸光度,根据对应的校正曲线或回归方程计算得到待测样品中的大肠杆菌浓度。

[0012] 步骤(1)中所述校正曲线或回归方程的具体建立方法如下:

[0013] 取一定量的大肠杆菌菌悬液,分别稀释1、1.25、2、3、10、12.5、20、33、100、125、200、333、1000倍,空白组加入灭菌的背景溶液,将稀释后不同浓度的菌悬液和空白组加入灭菌离心管中,每组3个平行样;通过紫外可见分光光度计分别测定每个浓度的大肠杆菌菌悬液在220、260、280、300、350、400、450、500、550nm波长处的吸光度,取平均值得到该浓度菌悬液的吸光度A,空白样品的吸光度 $A_I$ ;同时,用显微计数法对各个浓度的菌悬液进行细胞精确计数,每个样品重复3次,取平均值得到大肠杆菌浓度C,在吸光度 $A-A_I$ 和大肠杆菌浓度C之间建立校正曲线或回归方程。

[0014] 所述大肠杆菌菌悬液的制备按如下方法进行:

[0015] (1)培养基的配置:

[0016] 按照说明配置营养肉汤培养基,并将培养基灭菌;

[0017] (2)大肠杆菌的培养:

[0018] 将大肠杆菌工作菌种接种至灭菌营养肉汤培养基中,菌液接种量1%-2%,在37恒温振荡培养箱中培养至对数生长期,时间约为16-24h,转速150-170r/min;

[0019] (3)大肠杆菌菌悬液的制备:

[0020] 在4℃条件下,以7000r/min离心10min,去除培养基,将大肠杆菌菌体沉淀振荡重悬于生理盐水或磷酸盐缓冲溶液中,之后再次离心,再次重悬,总共洗涤3次,最后重悬于生理盐水或磷酸盐缓冲溶液中即制成大肠杆菌菌悬液。

[0021] 与现有技术相比,本发明的技术方案所带来的有益效果是:

[0022] 本发明直接测定待测样品的吸光度,根据吸光度和大肠杆菌浓度之间的线性关系实现对大肠杆菌的快速定量。与传统的显微计数法相比,其操作简便、测量效率显著提高,能够实现短时间内大批量样品的测量,同时较少了人工计数的失误因素,提高了结果的准确度;与经典的平板菌落计数方法相比,本发明无需其他试剂,无需多次稀释,无需培养,同时,计数结果包括具有代谢活性但不具有生长活性的菌,提高计数效率,可重复性强。

## 附图说明

[0023] 图1是吸光度和大肠杆菌浓度的校正曲线I。

[0024] 图2是吸光度和大肠杆菌浓度的校正曲线II。

[0025] 图3是平板菌落计数与细胞密度的校正曲线。

[0026] 图4是平板菌落计数和分光光度计数结果对比。

[0027] 图5是大肠杆菌随时间变化的过滤穿透曲线。

## 具体实施方式

[0028] 下面结合附图对本发明做进一步的详细说明,以下实施例只用于对发明内容的描述,并不限制被发明的范围。下列实施例中所使用的实验试剂耗材,如无特殊说明均属于常规生化试剂的范畴;下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常为常规条件;下列实施

例中的实际的菌株均属于现有技术,本领域的技术人员可从公开商业渠道获得。

[0029] 本发明快速定量水中大肠杆菌的方法,将含大肠杆菌的待测样品稀释一定倍数后,采用紫外可见分光光度计测定待测样品在特定波长处的吸光度,根据建立的吸光度和大肠杆菌浓度之间的校正曲线或回归方程,计算得到待测样品中大肠杆菌的浓度。

[0030] 一、建立校正曲线或回归方程

[0031] 配制一组不同浓度的大肠杆菌菌悬液,通过紫外可见分光光度计分别在波长220、260、280、300、350、400、450、500、550nm处测定其吸光度A,同时,用显微计数法将对应的每个浓度的菌悬液样品进行细胞精确计数,得到单位体积菌悬液中大肠杆菌浓度C;分别测定空白样品在波长220、260、280、300、350、400、450、500、550nm处的吸光度 $A_I$ ,根据吸光度A- $A_I$ 和大肠杆菌浓度C绘制校正曲线,或线性回归得到对应波长处的回归方程。

[0032] 具体地,取一定量的大肠杆菌菌悬液,分别稀释1、1.25、2、3、10、12.5、20、33、100、125、200、333、1000倍,空白组加入灭菌的背景溶液,将稀释后不同浓度的菌悬液和空白组加入灭菌离心管中,每组3个平行样,加入10mm石英比色皿中;通过紫外可见分光光度计分别测定每个浓度的大肠杆菌菌悬液在220、260、280、300、350、400、450、500、550nm任一波长处的光度值,取平均值得到该浓度菌悬液的吸光度A,空白样品的吸光度 $A_I$ ;同时,用显微计数法对各个浓度的菌悬液进行细胞精确计数,每个样品重复3次,取平均值得到大肠杆菌浓度C,在吸光度A- $A_I$ 和大肠杆菌浓度C之间建立校正曲线或回归方程。显微计数所用计数板通常可选25格×16格或16格×25格的计数板。

[0033] 其中,大肠杆菌菌悬液的制备按如下方法进行:

[0034] (1) 培养基的配置:

[0035] 按照说明配置营养肉汤培养基,并将培养基灭菌。若培养基不马上接种大肠杆菌,则需放入4℃冰箱保存。

[0036] (2) 大肠杆菌的培养:

[0037] 将大肠杆菌工作菌种接种至灭菌营养肉汤培养基中,菌液接种量1%-2%,在37恒温振荡培养箱中培养至对数生长期,时间约为16-24h,转速150-170r/min。

[0038] (3) 大肠杆菌菌悬液的制备:

[0039] 在4℃条件下,以7000r/min离心10min,去除培养基,将大肠杆菌菌体沉淀轻轻振荡重悬于生理盐水(0.9%NaCl溶液)或磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,之后再次离心,再次重悬,总共洗涤3次,最后重悬于生理盐水或磷酸盐缓冲溶液中即制成大肠杆菌菌悬液。根据不同的实验要求,上述生理盐水或磷酸盐缓冲溶液可被其他背景溶液代替。

[0040] 二、计算大肠杆菌的浓度

[0041] 稀释含大肠杆菌的待测样品,使稀释后菌悬液中的大肠杆菌浓度在回归方程或校正曲线的线性范围内,在与步骤(1)相同的条件下,采用紫外可见分光光度计测定220、260、280、300、350、400、450、500、550nm中任一波长处稀释后菌悬液的吸光度,根据对应的校正曲线或回归方程计算得到待测样品中的大肠杆菌浓度。

[0042] 本发明直接测定待测样品的吸光度,根据吸光度和大肠杆菌浓度之间的线性关系实现对大肠杆菌的快速定量。由朗伯-比尔定律可知,光被吸收的量正比于光程中产生光吸收的分子数目。根据对大肠杆菌菌悬液在800-190nm波段范围内的波长扫描可知,500-190nm波段内,吸光度值较高,主要是大肠杆菌细胞内部核酸和蛋白质等化学组分对光的吸

收;800-500nm波段内,吸光度值较低,主要是由于大肠杆菌细胞内部细胞器以及大肠杆菌整体颗粒对光散射的影响。因此,在适宜的波段范围内,测定不同稀释倍数大肠杆菌菌悬液在不同波长处的吸光度,并与显微计数法得到的大肠杆菌浓度建立回归方程或校正曲线,选出相关性较好的波长,保证本方法应用的广泛性、可靠性。

[0043] 实施例1

[0044] 根据本发明的快速定量水中大肠杆菌的方法,建立大肠杆菌菌悬液吸光度和大肠杆菌浓度之间校正曲线或回归方程,具体步骤如下:

[0045] 1.菌悬液的准备。取一定量悬于灭菌的生理盐水(0.9%NaCl溶液)中的大肠杆菌菌悬液,分别稀释1、1.25、2、3、10、12.5、20、33、100、125、200、333、1000倍。

[0046] 2.显微计数。用显微镜对每个浓度的细胞进行精确计数,每个样品重复3次,取平均值的到大肠杆菌浓度C。

[0047] 3.吸光度的测定。将不同浓度的大肠杆菌菌悬液和空白组加入10mm石英比色皿,通过紫外可见分光光度计分别测定每个浓度的菌悬液在220、260、280、300、350、400、450、500、550nm波长处的吸光度,每组3个平行样,取平均值得到该浓度菌悬液的吸光度A,空白样品的吸光度 $A_I$ 。

[0048] 4.线性关系的建立。根据测得的吸光度A,大肠杆菌浓度C,得到校正曲线,选定的各波长处校正曲线均具有良好的线性关系,如图1、图2所示。

[0049] 同时,对校正曲线进行线性回归分析,在吸光度和大肠杆菌浓度之间建立线性回归方程,结果如表1所示。

[0050] 表1吸光度与大肠杆菌细胞密度间线性关系

波长 (nm)	线性回归方程	$R^2$	线性范围 (个/ml)
220	$y_{220}=6.36 \times 10^{-9}x+0.0293$	0.993	$10^5-10^8$
260	$y_{260}=4.51 \times 10^{-9}x+0.0188$	0.993	$10^5-10^8$
280	$y_{280}=4.17 \times 10^{-9}x+0.0113$	0.997	$10^5-10^8$
300	$y_{300}=3.41 \times 10^{-9}x+0.0105$	0.995	$10^5-10^8$
350	$y_{350}=2.60 \times 10^{-9}x+0.0057$	0.998	$10^5-10^8$
400	$y_{400}=2.18 \times 10^{-9}x+0.0032$	0.999	$10^5-10^8$
450	$y_{450}=1.76 \times 10^{-9}x+0.0022$	0.999	$10^5-10^8$
500	$y_{500}=1.48 \times 10^{-9}x+0.0028$	0.999	$10^5-10^8$
550	$y_{550}=1.22 \times 10^{-9}x-0.0003$	0.999	$10^5-10^8$

[0051] 其中,y为紫外可见分光光度计测定的对应波长处的光度值 $A-A_I$ ,x为大肠杆菌浓度C,单位为个/ml, $R^2$ 为线性相关系数。

[0052] 由表1可知,当大肠杆菌细胞密度在 $10^5-10^8$ 个/ml范围内,波长220、260、280、300、350、400、450、500、550nm处的吸光度和大肠杆菌浓度的线性相关系数均为0.99以上,说明

回归方程有良好的线性关系。根据朗伯-比尔定律,当一束平行单色光垂直通过某一均匀非散射的吸光物质时,其吸光度与吸光物质的浓度及吸光层厚度成正比。因此,本方法得到的回归方程适宜于大肠杆菌浓度的快速定量。

#### [0054] 实施例2

[0055] 实施例1在260nm处建立的校正曲线或回归方程,采用本发明的快速定量水中大肠杆菌的方法测定菌悬液中的大肠杆菌浓度,与大肠杆菌菌悬液进行平板菌落计数结果进行对照。另外,建立大肠杆菌菌悬液平板菌落计数结果和大肠杆菌浓度之间校正曲线或回归方程,并与实施例1在260nm处建立的校正曲线或回归方程进行比对,具体步骤如下:

[0056] 1. 菌悬液的准备。取一定量悬于灭菌的生理盐水(0.9%NaCl溶液)中的大肠杆菌悬液,分别稀释1、1.25、2、3、10倍。

[0057] 2. 平板菌落计数。为使待测样品在平板上的菌落数为30-300CFU,将各样品再次稀释10000倍进行平板菌落计数。(1)按照说明配置营养琼脂培养基,并将培养基灭菌,待其冷却至50℃左右倒入灭菌培养皿中,体积为15-20ml。待营养琼脂培养基凝固后,倒置于37℃生化培养箱中培养24h,取平整且不长杂菌者待用。(2)每组设3个平行样,在制好的培养基上各加入100μl待测菌悬液样品,倒置于37℃生化培养箱中培养24h,进行平板菌落计数。(3)根据平板菌落计数的结果乘以稀释的倍数可得单位体积的大肠杆菌浓度 $C_1$ 。

[0058] 3. 显微计数。用显微镜对每个浓度的细胞进行精确计数,每个样品重复3次,取平均值的到大肠杆菌浓度 $C$ 。

[0059] 4. 测定吸光度并计数。将不同浓度的大肠杆菌菌悬液和空白组加入10mm石英比色皿,通过分光光度计分别测定每个浓度的菌悬液在260nm波长处的吸光度,每组3个平行样,取平均值得到该浓度菌悬液的吸光度 $A$ ,空白样品的吸光度 $A_1$ 。通过吸光度和大肠杆菌浓度之间的线性关系计算大肠杆菌浓度 $C_2$ ,计算公式为 $C_2 = (A - A_1) / 4.5 \times 10^{-9}$ 。结果如图3所示。

[0060] 5. 线性关系的建立。根据平板菌落计数结果,大肠杆菌浓度 $C$ ,得到平板菌落计数结果和大肠杆菌细胞校正曲线,结果如图4所示。

[0061] 由图3可知,平板菌落计数法测定五种浓度的大肠杆菌浓度 $C_1$ 结果为 $2.0 \times 10^8$ 个/ml、 $1.6 \times 10^8$ 个/ml、 $1.4 \times 10^8$ 个/ml、 $6.0 \times 10^7$ 个/ml、 $3.1 \times 10^7$ 个/ml;吸光光度计数法测定五种浓度的大肠杆菌浓度 $C_2$ 分别为 $2.4 \times 10^8$ 个/ml、 $1.9 \times 10^8$ 个/ml、 $1.3 \times 10^8$ 个/ml、 $8.5 \times 10^7$ 个/ml、 $3.8 \times 10^7$ 个/ml。两种方法测定的大肠杆菌浓度结果较为接近,表明本方法可以作为一种可靠的快速定量水中大肠杆菌的方法。另外,分光光度计数法得到的大肠杆菌密度略高于平板菌落计数法(除第三种浓度外),这可能是由于部分具有代谢活性但不具有生长活性的大肠杆菌所致。

[0062] 由图4可知,平板菌落计数结果和大肠杆菌浓度之间的线性回归方程为 $y = 9.38 \times 10^{-7}x + 17.2368$ ,线性相关系数 $R^2 = 0.931$ ,其中, $y$ 为平板菌落计数结果,单位为CFU/100μl, $x$ 为大肠杆菌浓度 $C$ ,单位为个/ml。与图1、图2相比,平板菌落计数回归方程不具有良好的线性关系,表明分光光度计数具有更高的准确度。

#### [0063] 实施例3

[0064] 根据本发明的快速定量水中大肠杆菌的方法,研究同种滤料在不同离子强度的环境中对大肠杆菌的过滤效果,具体步骤如下:

[0065] 1. 菌悬液的准备。取一定量悬于灭菌的KC1中的大肠杆菌悬液。分别配制大肠杆菌

浓度相同,背景溶液离子强度分别为1mM KCl、100mM KCl的大肠杆菌菌悬液进行过滤实验。

[0066] 2.过滤实验采用内径16mm的过滤柱进行湿法填充,滤层厚度为 $15.0 \pm 0.1$ cm,滤柱填充完成后进行过滤实验。过滤流速1.5m/h,pH= $7.0 \pm 0.5$ ,环境为室温,具体详细实验过程可参看[Jin C,Normani S D,Emelko M B.Surface roughness impacts on granular media filtration at favorable deposition conditions:Experiments and modeling [J].Environmental science&technology,2015,49(13):7879-7888.]。考察同种滤料在不同离子强度下对大肠杆菌的过滤效果。

[0067] 3.吸光度的测定。随时间取样,通过紫外可见分光光度计测定过滤后菌悬液样品在波长280nm处的吸光度。通过吸光度和大肠杆菌浓度之间的线性关系计算大肠杆菌浓度。结果如图5所示。

[0068] 由图5可知,采用本发明的方法测定大肠杆菌浓度可以反映同种滤料在不同离子强度下对大肠杆菌的过滤去除效果。在需要进行大量样品测定的工作中,与传统的显微计数、平板菌落计数相比,本方法更准确、更快速、更简单易行。

[0069] 尽管上面结合附图对本发明的功能及工作过程进行了描述,但本发明并不局限于上述的具体功能和工作过程,上述的具体实施方式仅仅是示意性的,而不是限制性的,本领域的普通技术人员在本发明的启示下,在不脱离本发明宗旨和权利要求所保护的范围情况下,还可做出很多形式,这些均属于本发明的保护之内。



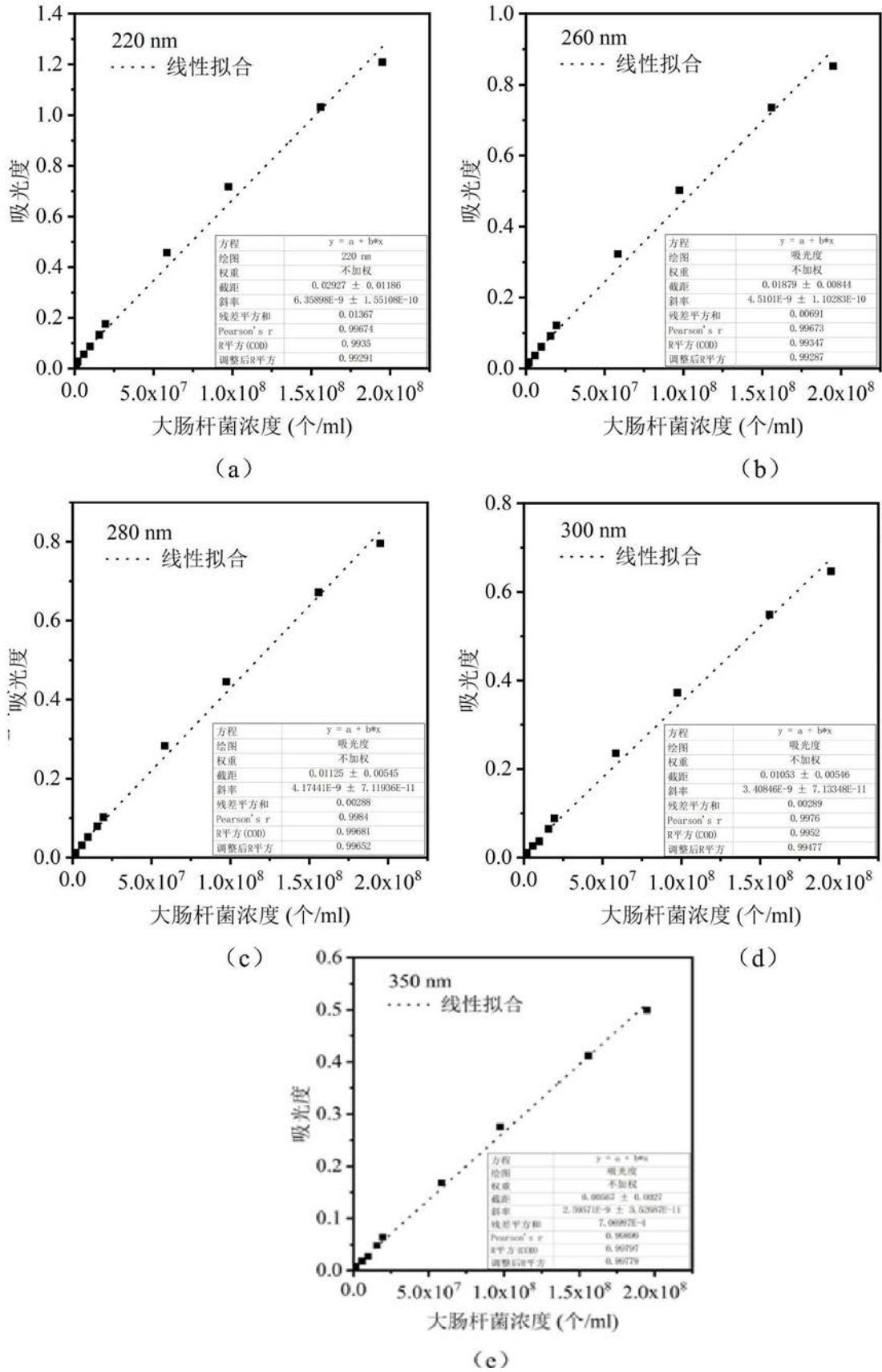
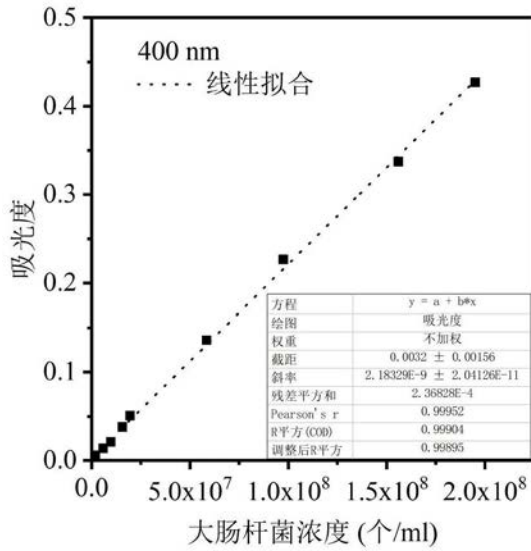
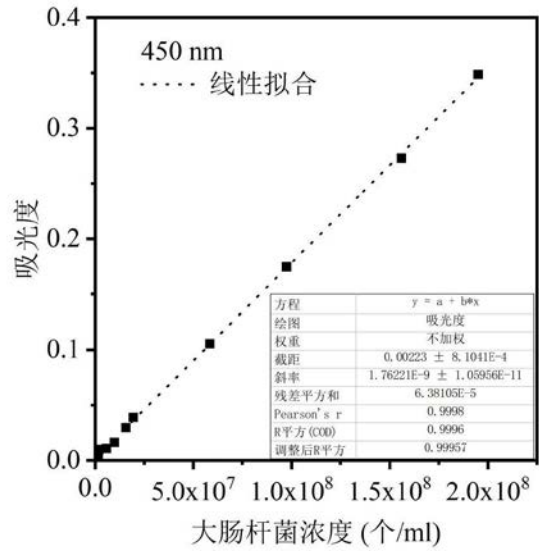


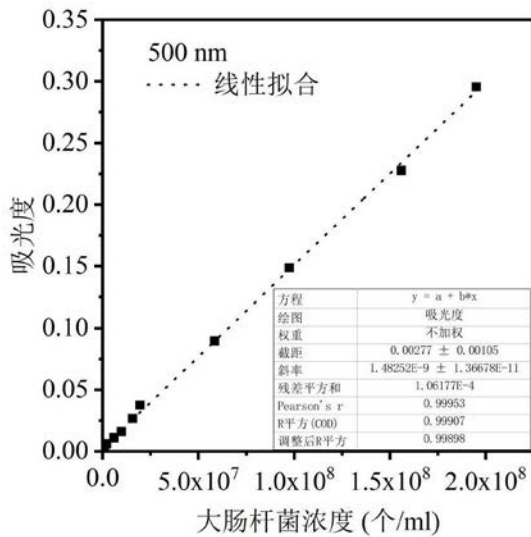
图1



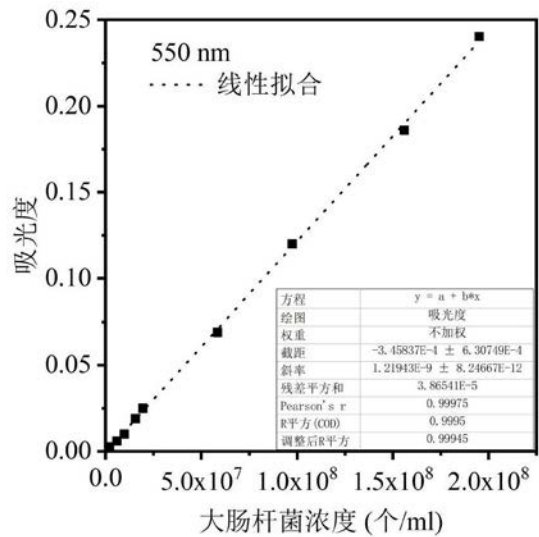
(a)



(b)



(c)



(d)

图2

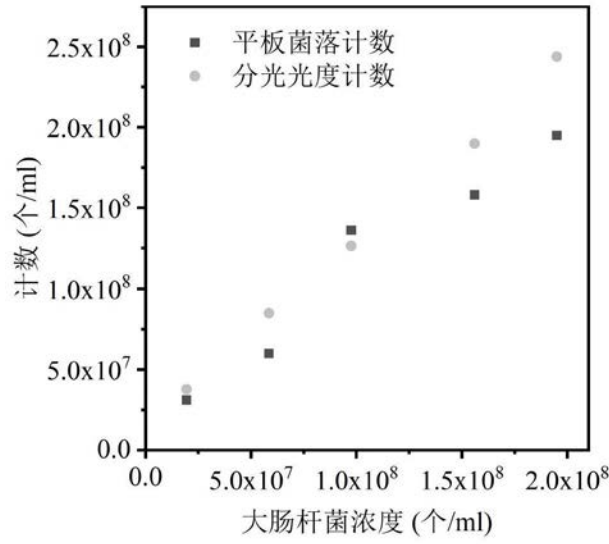


图3

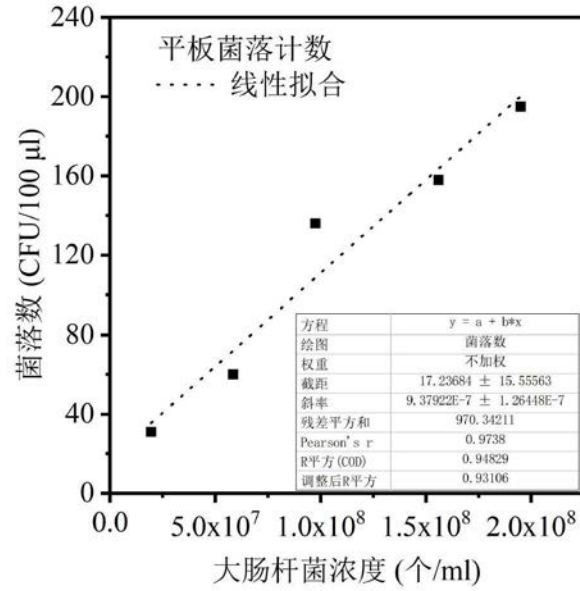


图4

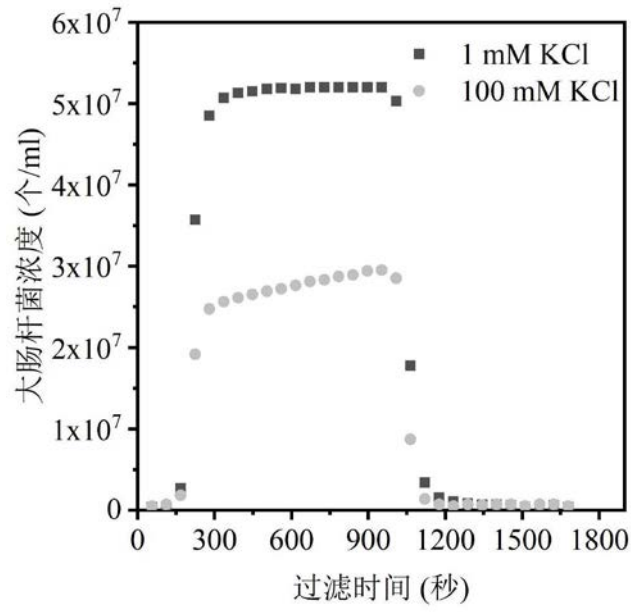


图5