



流式细胞术检测水中细菌总数的方法研究

刘 倩, 刘小杰

(上海城建职业学院, 上海 201415)

[摘要] 环境水检测中最常见的检测为细菌计数。常规的计数方法主要是平板计数法和通用的显微计数法,但是这两种方法误差大、耗时长,且平板法只能计数活菌。流式细胞术用于菌体计数可以快速得到细菌总数,若检测的是一定体积样品中的菌数,即可得知菌浓度,同时可区分活菌和死菌,获得活菌百分比。研究了流式细胞术检测环境水中细菌总数的方法,采用荧光性染料进行染色,不同稀释度水样进入流式细胞仪分析、计数。同时与国家标准检测方法进行比较,验证了其准确性和灵敏度。结果显示,在一定范围浓度下,流式细胞术检测环境水中的细菌总数与平板法成线性相关,检测结果的常用对数值基本一致,有很好的符合性。利用 SYBR Green 和 DAPI 可以检测活菌和死亡的菌体,更能反应出实际细菌总数。流式细胞术是一种比平板法检测细菌总数更加快速、准确的方法,极大地缩短了检测时间。

[关键词] 流式细胞术;细菌总数;环境水

[中图分类号] X832 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-829X(2022)05-0163-06

Detecting total bacteria number in environmental water by flow cytometry

LIU Qian, LIU Xiaojie

(Shanghai Urban Construction Vocational College, Shanghai 201415, China)

Abstract: The most common detection in environmental water detection is bacterial count. The conventional counting methods are mainly plate culture and general microscopy, but these two methods have large error and long time-consuming, and the plate method can only count live bacteria. The total number of bacteria can be quickly obtained by flow cytometry for cell counting. If the number of bacteria in a certain volume of sample is detected, the bacterial concentration can be obtained. At the same time, live bacteria and dead bacteria can be distinguished to obtain the percentage of live bacteria. The method of detecting the total number of bacteria in environmental water by flow cytometry was studied. Fluorescent dyes were used for dyeing, and water samples with different dilutions were analyzed and counted by flow cytometry. At the same time, compared with the national standard detection method, its accuracy and sensitivity are verified. The results showed that there was a linear correlation between the total number of bacteria in the environmental water detected by flow cytometry and the plate method, the common logarithm values of the test results were basically consistent and had good consistency. SYBR green and DAPI can be used to detect living bacteria and dead bacteria, which can better reflect the actual total number of bacteria. Flow cytometry is a faster and more accurate method to detect the total number of bacteria than plate method, which greatly shortens the detection time.

Key words: flow cytometry; total bacteria number; environmental water

水环境中细菌的快速检测,一直是微生物学研究中的一个挑战性课题,特别是对于含有复杂微生物种群的天然水体。由于饮用水中的贫营养环境有

别于传统培养基提供的富营养环境,大多数在显微镜下观察到的饮用水中细菌不能在传统培养基中生长,致使活菌计数结果偏低^[1-3]。水体环境中污染物

[基金项目] 上海市科促会“联盟计划”项目(LM201928)

成分复杂,其中某些有机污染物会对附着其上的微生物产生持久性选择压力。近年来,饮用水中菌落总数快速检测技术发展很快,比较成熟的有化学发光法、ATP生物发光法、固相细胞计数法等^[4-5],但这些方法还存在一些弊端。

流式细胞仪具有较高的检测灵敏度,可以用于检测液态商品中的细菌总数和细菌种类等^[6]。T. S. GUNASEKERA等^[7]实现了用流式细胞术(FCM)快速检测牛奶中的菌落总数,S. N. LANGERHUUS等^[8]利用流式细胞仪,检测区分乳腺炎牛奶样品中的革兰氏阳性菌和阴性菌,C. QUIRÓS等^[9]在酒类发酵过程中,通过流式细胞仪进行了死活细胞的区分和酶活性的检测。国内诸多学者也开展了类似研究工作,大大扩展了流式细胞仪的应用范围^[10-13]。

FCM利用荧光染料染色后与SYBR Green结合,从背景信号中区分微小的微生物细胞。在系统中引入自动细胞计数,阈值设置为SYBR Green-800(B530通道),采用50 μL 上样体积,35 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的上样速度,可以精确地确定细菌数量。

1 材料与方法

1.1 试剂、材料和仪器

SYBR Green染料(美国赛默飞世尔);4',6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI,碧云天公司Beyotime C1005);LB培养基;平板计数琼脂;实验室自备*E. coli*菌株。

0.1 μm 过滤器(美国密理博,SLW033LS);流式细胞仪(美国安捷伦,NovoCyte)。

1.2 样品处理

取12支1.5 mL EP管,分别标记为1、2、4、8、16、32、64、128、256、512、1 024和2 048,其中2~2 048管中加入250 μL 过滤后的超纯水。1号管中加入500 μL 水样原液,从1号管中取250 μL 水样到2号管中混匀。再从2号管中取250 μL 水样到4号管中混匀,依次梯度稀释下去。最终2 048管中共有500 μL 水样,移出250 μL 即可。

1.3 荧光染色

每个EP管中含250 μL 水样,加入5 μL SYBR Green染液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min,上机测试,未能马上测试的样本,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存,2 h内完成测试^[14-15]。

1.4 FCM测定

采用安捷伦 NovoCyte 流式细胞仪,50 μL 上样

体积,35 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的上样速度,阈值设置为SYBR Green-800(B530通道),使用自动上样器自动采集上样。测定细胞死活时,加入DAPI,稀释1 000倍,室温染色5 min上机。

1.5 平板计数法活菌计数

采用平板计数法统计样品中活性菌浓度,采用FCM法分别统计样品中活菌数、死菌数和细菌总数。平板计数法检测:无菌操作吸取1 mL水样,注入一次性无菌平皿中,倒入46 $^{\circ}\text{C}$ 平板计数琼脂,重复三次。同时在另一个平皿直接注入培养基做空白对照。将平板放置(36 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养48 h后计数。

1.6 FCM与平板计数法的验证试验

根据GB 5749—2006生活饮用水卫生标准,微生物主要检测指标为总大肠菌群和菌落总数,因此本实验采用具有代表性的*Escherichia coli*斜面菌种。取*E. coli*斜面菌种1支,无菌操作挑取菌苔,接种于LB液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后,作为菌悬液备用。用无菌移液枪移取1 mL菌悬液于9 mL蒸馏水样中,作为样品原液,用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)对样品原液进行10倍梯度稀释,每个稀释度样品分别进行FCM检测和平皿计数检测[参见(GB 4789.2—2016)食品卫生微生物学检验 菌落总数测定]^[16]。

1.7 数据分析

利用Excel软件对数据进行统计学分析和处理。

2 结果与分析

2.1 流式体积法绝对计数的准确性和线性范围

调节荧光信号选择合适的细胞群,图1显示了各稀释度下流式细胞仪测定图谱,其中最后两张图是密度图,样本浓度高时,密度图更容易看出分群情况。

实验的浓度倍数、折算后浓度倍数以及折算后浓度倍数对应的菌体绝对数见表1。

由表1可知,1、2、4、8、16、32、64、128、256、512、1 024、2 048这12个管子测得的菌体绝对计数随着稀释倍数的增大而减少,通过数据分析对比,可以建立水样FCM快速检测技术。

梯度稀释流式体积法所得绝对计数与稀释倍数的线性关系见图2。

由图2(a)可知,数据整体线性良好,图2(b)为去掉原液和原液稀释2倍的数值,可以发现线性关系更好,推测其原因为浓度高时,样本会有抱团。为

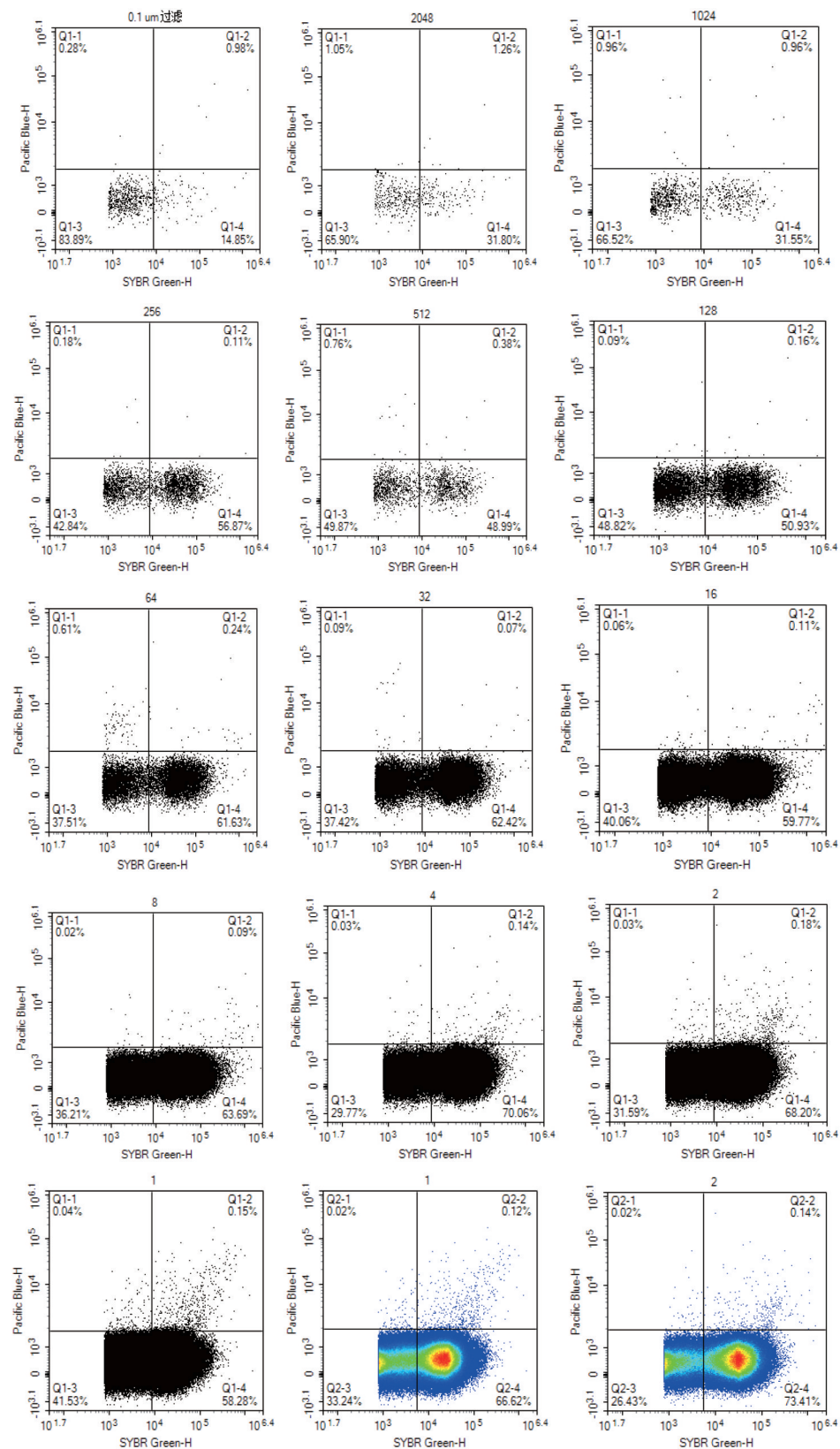


图1 各稀释度下流式细胞仪测定图谱

Fig. 1 Flow cytometer measurement chart at various dilutions

表1 浓度倍数、折算后浓度与对应菌体的绝对计数

Table 1 Concentration multiples, converted concentrations and absolute counts of corresponding bacteria

浓度倍数	2 007.84	1 003.92	501.96	250.98	125.49	62.75	31.37	15.69	7.84	3.92	1.96	0.98
折算后浓度倍数	2 048	1 024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
菌体绝对计数	3.96	6.78	17.00	34.70	84.00	156.00	326.00	653.00	1 307.00	2 319.00	3 965.00	6 704.00

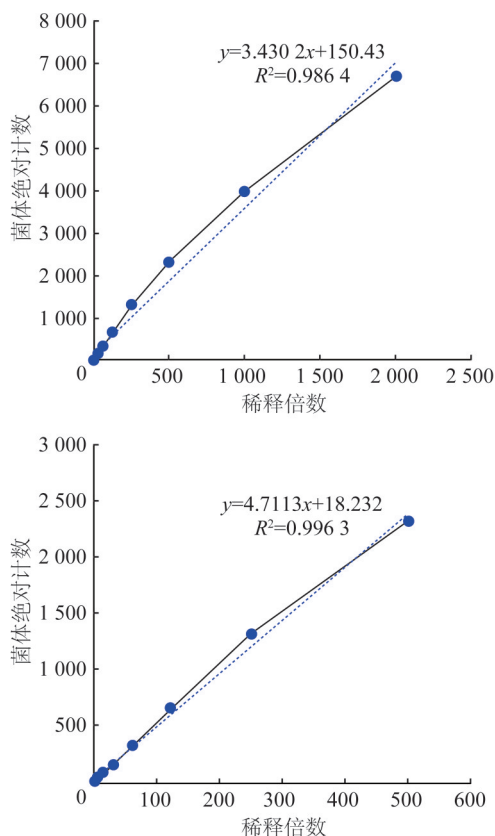


图2 菌体绝对计数与稀释倍数的线性关系

Fig. 2 The linear relationship between the absolute count of bacteria and the dilution dilution times

证明此推测,对32号和2号管样本进行表征,结果见图3。

由图3可知,浓度低时几乎无抱团现象,浓度高时会出现抱团;低浓度时阴性和阳性区分良好,但高浓度样本阳性群会左移,这是因为染料浓度一定,细菌数增多,而浓度不够导致信号偏弱。

2.2 FCM法测定活细菌浓度及总菌浓度

对水中进行细菌总量计数,可以反映水环境指标,根据GB 5749—2006生活饮用水卫生标准,菌落总数不得超过100 mL⁻¹,目前采用的方法多为HPC法,但存在操作时间长,且检测值比实际值低,有一定误差,这可能是由于这些细菌是非营养型细菌、处于亚致死性损伤状态或是活的,但处于不可以培养

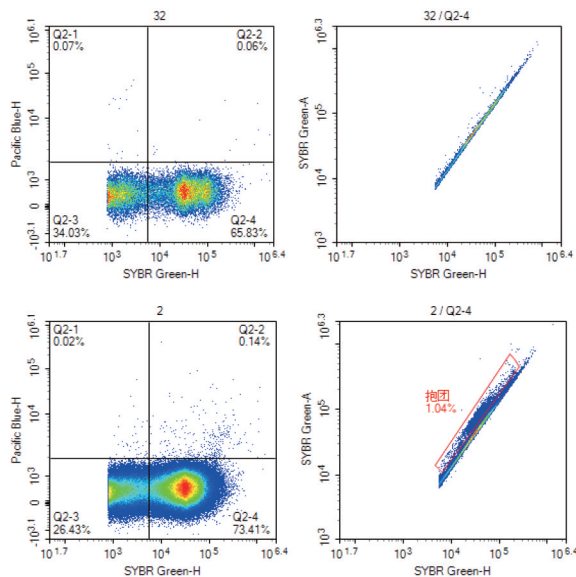


图3 高低浓度样本抱团图谱

Fig. 3 Cluster map of high and low concentration samples

的状态。流式细胞仪可以检测饮用水中总菌数,更能反映真实细菌含量,在饮用水细菌计数方面,严心涛等^[17-19]进行了深入研究和探讨,进一步分析了饮用水安全。本研究在高浓度样本中加入DAPI,结果见图4,可以清楚地看出死亡的菌落数。

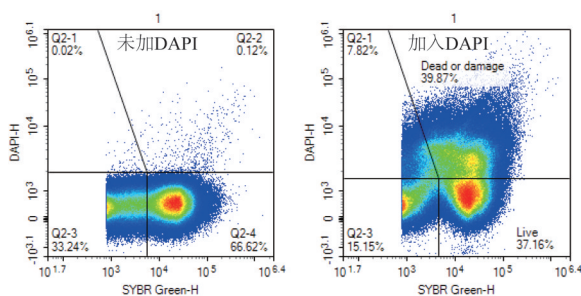


图4 使用DAPI检测活性细菌和非活性细菌

Fig. 4 Use DAPI to detect active and inactive bacteria

2.3 FCM法与平板计数法的准确性

选取合适稀释度样品,分别进行平板计数,重复3次,用3次结果的常用对数值计算平均数及标准差,对比流式细胞仪,所得结果见图5,其相关性见图6。

由图5、图6可知,FCM检测与平板法检测结果趋

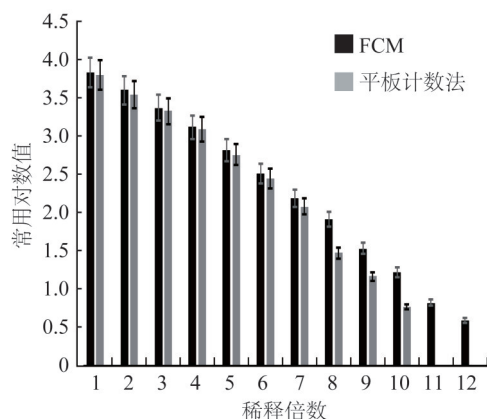


图5 流式细胞仪与平板计数准确性比较

Fig. 5 Comparison of accuracy between flow cytometer and plate count

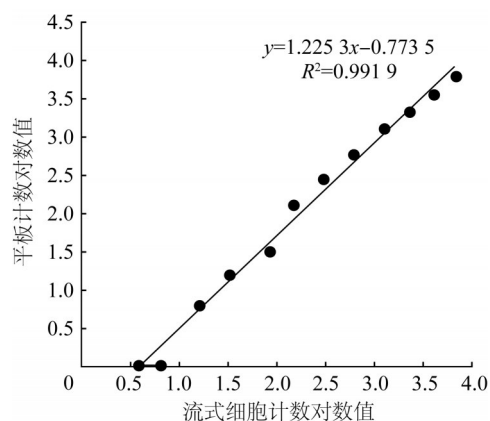


图6 流式细胞计数与平板计数相关性

Fig. 6 Correlation between flow cytometry and plate count

势上基本一致,从数值上来看,流式细胞的检测值都高于平板计数,对数值随稀释倍数基本成梯度变化。从数据分析可以看出,利用FCM检测水中的细菌总数与平板法检测结果呈线性相关, [$R^2=0.9919$, 相关程度为显著相关 ($P < 0.01$)], 检测结果的常用对数值基本一致,有很好的符合性。而1 024管和2 048管平板计数已无法计算对数值,这可能是因为某些细菌,虽然明显存在,但没有得到有效的培养,导致活菌计数结果偏低。

2.4 FCM法与平板计数法的验证试验

将人工菌液分别以 $10^2 \sim 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 的接种量添加到2048号水样中,分别用FCM和平皿菌落计数法进行细菌总数的分析和计数,结果见图7,其相关性见图8。

由图7、图8可知,随菌液浓度梯度的增加,FCM与平板计数的检测结果基本一致。FCM与平板计

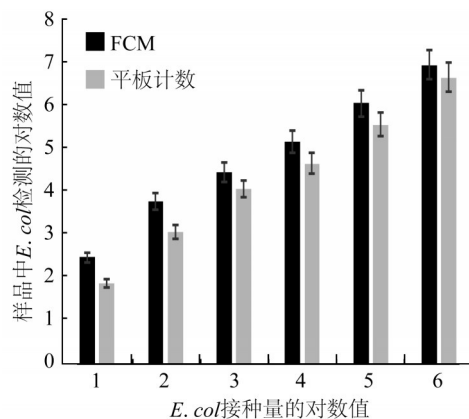


图7 FCM与平板计数法的验证试验

Fig. 7 Validation test of flow cytometer and plate colony counting method

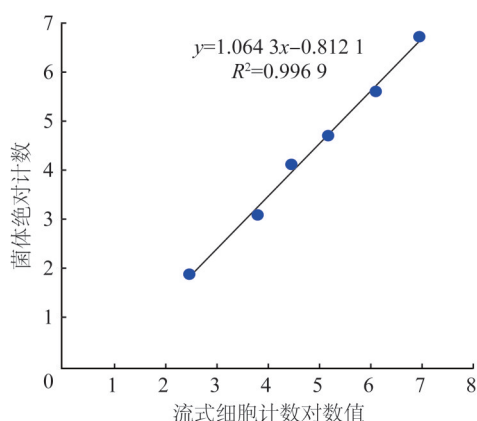


图8 流式细胞计数与平板计数相关性

Fig. 8 Correlation between flow cytometry and plate count

数法检测水样中细菌总数的结果呈正的直线相关 ($P < 0.01$), 相关程度为显著相关 ($R^2=0.9969$)。FCM检测到的对数值高于平板计数法, 因此比平板计数法更加精确, 这可能是因为流式细胞仪是对每一个被荧光染色的目标细菌进行计数^[6]。

3 结论

流式细胞仪可快速高通量对细菌进行绝对计数, 无需计数微球, 节省成本, 且流式细胞仪检测线性范围宽, 灵敏度高。本研究利用流式细胞仪, 对环境水中细菌总数测定方法进行了研究, 建立了FCM检测环境水中细菌总数的方法, 利用SYBR Green和DAPI可以检测活菌和死亡的菌体, 更能反应出实际细菌总数, 同时与国家标准检测方法进行了比较, 验证了其准确性和灵敏度, 检测的结果更准确, 更可靠。

参考文献

- [1] 张席. 影响检测生活饮用水中菌落总数的相关因素探讨[J]. 工业微生物, 2020, 50(6): 33-40.
ZHANG Xi. Discussion on related factors affecting detection of total bacterial count in drinking water[J]. Industrial Microbiology, 2020, 50(6): 33-40.
- [2] 马玉, 肖昕. 菖蒲湿地处理含油废水中微生物与净化效果[J]. 工业水处理, 2019, 39(8): 81-85.
MA Yu, XIAO Xin. Microorganisms and purification efficiency in oily wastewater treatment by calamus wetland[J]. Industrial Water Treatment, 2019, 39(8): 81-85.
- [3] 王宇, 王天平, 叶春松. 循环冷却水微生物调节水质机理研究进展[J]. 工业水处理, 2022, 42(2): 60-66.
WANG Yu, WANG Tianping, YE Chunsong. Advance on mechanism of water quality conditioning for recirculating cooling water by microorganisms[J]. Industrial Water Treatment, 2022, 42(2): 60-66.
- [4] VAN POUCKE S O, NELIS H J A. 210-Min solid phase cytometry test for the enumeration of *Escherichia coli* in drinking water[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 89(3): 390-396.
- [5] STENDER H, BROOMER A J, OLIVEIRA K, et al. Rapid detection, identification, and enumeration of *Escherichia coli* cells in municipal water by chemiluminescent in situ hybridization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(1): 142-147.
- [6] 王宁, 刘宁. 流式细胞术快速检测生乳中细菌总数[J]. 食品工业科技, 2007, 28(9): 197-200.
WANG Ning, LIU Ning. Rapid detection of total bacteria in raw milk by flow cytometry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2007, 28(9): 197-200.
- [7] GUNASEKERA T S, ATTFIELD P V, VEAL D A. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(3): 1228-1232.
- [8] LANGERHUUS S N, INGVAERTSEN K L, BENNEDSGAARD T W, et al. Gram-typing of mastitis bacteria in milk samples using flow cytometry[J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(1): 267-277.
- [9] QUIRÓS C, HERRERO M, GARCÍA L A, et al. Taking advantage of the flow cytometry technique for improving malolactic starters production[J]. European Food Research and Technology, 2009, 228(4): 543-552.
- [10] 孔晓雪, 韩衍青, 付勇, 等. 流式细胞术在超高压诱导大肠杆菌 O157:H7 亚致死研究中的应用[J]. 食品科学, 2018, 39(3): 135-141.
KONG Xiaoxue, HAN Yanqing, FU Yong, et al. Flow cytometric assessment of sublethal injury of *Escherichia coli* O157:H7 cells caused by high hydrostatic pressure[J]. Food Science, 2018, 39(3): 135-141.
- [11] 王杰, 郑亦舟, 姜凯, 等. 乳酸菌计数结果的比较研究[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2018, 47(6): 713-718.
WANG Jie, ZHENG Yizhou, JIANG Kai, et al. Comparative study on counting results in *Lactobacillus* counting method[J]. Journal of Shanghai Normal University(Natural Sciences), 2018, 47(6): 713-718.
- [12] 王伟亮, 谢贝, 孟繁荣, 等. 应用流式细胞术鉴定死活结核分枝杆菌的实验研究[J]. 中山大学学报(医学版), 2019, 40(3): 372-378.
WANG Weiliang, XIE Bei, MENG Fanrong, et al. Experimental study on detection of dead and live mycobacterium tuberculosis by flow cytometry[J]. Journal of Sun Yat-Sen University(Medical Sciences), 2019, 40(3): 372-378.
- [13] 胡赢心, 陈傲蕾, 罗倩, 等. 粪悬液中肠道细菌的活性检测[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(12): 5580-5585.
HU Yingxin, CHEN Aolei, LUO Qian, et al. Investigation of bacterial viability in gut microbiota of fecal slurry[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(12): 5580-5585.
- [14] BERNEY M, HAMMES F, BOSSHARD F, et al. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(10): 3283-3290.
- [15] 毛冠男, 宋宇昊, 王莹莹. 余氯对河流水体微生物灭活效应的评价[J]. 微生物学通报, 2017, 44(10): 2330-2336.
MAO Guannan, SONG Yuhao, WANG Yingying. Disinfection effect of residue chlorine on riverine bacterial communities[J]. Microbiology China, 2017, 44(10): 2330-2336.
- [16] 杨莉婷, 何丽, 何海宁, 等. 流式细胞术对生乳中微生物检测的应用研究[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2017, 35(2): 112-116.
YANG Liting, HE Li, HE Haining, et al. The application of flow cytometry in testing bacteria of raw milk[J]. Journal of Guangxi Normal University(Natural Science Edition), 2017, 35(2): 112-116.
- [17] 余辉, 马丽丽, 毛冠男, 等. 饮用水微生物的安全快速检测[J]. 微生物学通报, 2012, 39(8): 1171-1178.
YU Hui, MA Lili, MAO Guannan, et al. Fast and safety detection of drinking water in respect of microbial quality[J]. Microbiology China, 2012, 39(8): 1171-1178.
- [18] 严心涛, 吴云良, 查巧珍, 等. 流式细胞术在饮用水微生物检测中的应用及挑战[J]. 中国给水排水, 2020, 36(22): 89-95.
YAN Xintao, WU Yunliang, ZHA Qiaozhen, et al. Applications and challenges of microbial detection in drinking water by flow cytometry[J]. China Water & Wastewater, 2020, 36(22): 89-95.
- [19] 沈朕, 刘宗涵, 王晓芳. 三种自来水中微生物检测方法比较[J]. 供水技术, 2021, 15(2): 23-26.
SHEN Zhen, LIU Zonghan, WANG Xiaofang. Comparison of three detection methods of microorganism in tap water[J]. Water Technology, 2021, 15(2): 23-26.
- [作者简介] 刘倩(1987—), 硕士, 讲师. E-mail: 136415798@qq.com.
通讯作者: 刘小杰, 博士, 高级工程师. E-mail: liuxiaojie2000@163.com.
- [收稿日期] 2021-02-23(修改稿)