

文章编号 1004-924X(2019)06-1245-10

## 快速定量检测细菌的 FCM 系统研制及性能评估

严心涛<sup>1,2</sup>, 王 策<sup>1</sup>, 裴智果<sup>1</sup>, 刘 珏<sup>3</sup>, 武晓东<sup>1\*</sup>

- (1. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所 中科院生物医学检验技术重点实验室, 江苏 苏州 215163;
2. 复旦大学工程与应用技术研究院, 上海 200433;
3. 苏州高新区自来水有限公司, 江苏 苏州 215011)

**摘要:** 为了实现对饮用水中细菌快速定量检测, 建立了基于流式细胞术的高通量定量检测系统。对该系统的信号采集系统、绝对计数方法以及在细菌检测方面的综合性能进行了研究和评估。根据饮用水中典型细菌的荧光染料及其荧光激发光谱特点, 介绍了流式细胞术快速检测细菌的工作原理及硬件平台。通过简化细菌的荧光信号强度计算模型, 评估了信号采集系统的信噪比。建立了基于流量传感器的绝对计数方法, 将检测系统与以参比微球法进行绝对计数的 BD LSR Fortessa 进行了一系列对比实验和统计学分析, 测试和评估了检测系统在饮用水中细菌检测的综合性能水平。实验结果表明: 对于 4 MHz 宽带的荧光信号, 信号采集系统的信噪比可达 86 dB; 对于一定浓度内的微球, 系统对它测试  $cv$  值低于 2%, 与 BD 仪器测试结果的相关系数高达 0.999 6, 对等比例稀释的微球测试线性度高达 0.999 8, 最低可检测细菌浓度可达  $10^2$  particles/mL; 系统对 E. coli 和 S. aureus 含量测试结果的  $cv$  值均低于 7%, 与 BD 仪器测试结果的相关系数均高于 0.995 9, 两仪器测试结果的相对误差均在 4% 以内。该仪器能实现对细菌的高精度快速定量检测, 为饮用水中典型细菌快速检测仪器的开发提供了参考。

**关键词:** 流式细胞术; 细菌; 饮用水; 微生物; 自来水; 绝对计数

**中图分类号:** TH79; Q93-33 **文献标识码:** A **doi:** 10.3788/OPE.20192706.1245

## Development and performance evaluation of flow cytometry for rapid quantitative detection of bacteria

YAN Xin-tao<sup>1,2</sup>, WANG Ce<sup>1</sup>, PEI Zhi-guo<sup>1</sup>, LIU Jue<sup>3</sup>, WU Xiao-dong<sup>1\*</sup>

- (1. CAS Key Lab of Bio-Medical Diagnostics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China;
  2. Academy for Engineering & Technology, Fudan University, Shanghai 200433, China;
  3. Suzhou New District Water Supply Development Co. Ltd., Suzhou 215011, China)
- \* Corresponding author, E-mail: yanxt@sibet.ac.cn

**Abstract:** To realize rapid quantitative detection of bacteria found in drinking water, a high-throughput quantitative detection system based on flow cytometry was established. The system's signal acquisition system, absolute counting method, and comprehensive performance for bacterial

**收稿日期:** 2019-02-25; **修订日期:** 2019-03-18.

**基金项目:** 国家 863 高技术研究发展计划资助项目 (No. 2011AA02A106); 苏州市科技局民生科技计划资助项目 (No. SS201726)

detection were investigated and evaluated. Firstly, according to the fluorescent dyes of typical bacteria found in drinking water and their fluorescence excitation spectra, the working principle and hardware platform of the flow cytometer for rapid bacterial detection were established. Secondly, the signal-to-noise ratio of the signal acquisition system was evaluated by simplifying the calculation model for signal strength of bacterial fluorescence. Next, a calculation method based on the flow sensor method was established for absolute counting. Finally, a series of statistically analyzed control experiments were performed with the self-developed instrument alongside BD LSR Fortessa with absolute reference according to the reference microsphere method. The performance of the self-developed instrument for the detection of bacteria in drinking water was comprehensively tested and evaluated. The experimental results indicated the followings: for a 4 MHz wideband fluorescent signal, the signal-to-noise ratio of the signal acquisition system can reach 86 dB; for microspheres in a certain concentration range, the *cv* value of the system test results is less than 2%, the correlation coefficient with the test results of the BD instrument is as high as 0.999 6, the linearity of the equivalent dilution microsphere test is up to 0.999 8, and the lowest detectable bacterial concentration is  $10^2$  particles/mL; for *E. coli* and *S. aureus* bacteria, the *cv* value of the test results of the system is less than 7%, the correlation coefficient with the test results of the BD instrument exceeds 0.995 9, and the relative deviation is within 4%. The instrument is capable of rapid quantitative detection of bacteria with a high-precision, providing a reference for the development of rapid detection instruments for typical bacteria found in drinking water.

**Key words:** flow cytometry; bacteria; drinking water; microorganisms; tap water; absolute counting

## 1 引 言

饮用水源水和饮用水网管分配系统中含有大量微生物<sup>[1]</sup>,尤其在发生洪水、暴雨、泥石流等自然灾害时,常包含大量致病性细菌和病毒,它们会严重威胁人们的健康<sup>[2]</sup>,因此,快速准确地定量检测饮用水中致病性微生物以保障饮用水安全的问题越来越重要。

目前,对水生细菌的常规检测方法是平板计数法(Heterotrophic Plate Count, HPC)<sup>[3]</sup>,它主要包含多管发酵法、滤膜法以及酶底物法等<sup>[4]</sup>。但 HPC 在微生物检测中,一般需要 2~7 天才能检测出细菌的含量,且只能对适应于特定培养基和培养环境的菌种进行检测<sup>[5]</sup>,有研究表明,HPC 只能检测饮用水中不到 1% 的微生物种属<sup>[6]</sup>。近些年,基于微生物生化性质、分子生物学及免疫学的相关技术已广泛应用于饮用水中细菌的检测。ATP 生物发光法<sup>[7]</sup>可快速检测细菌含量,但它只能实现相对定量分析,检测灵敏度不高,且无法检测死亡细菌含量;激光扫描成像法<sup>[8]</sup>、变形梯度凝

胶电泳法(DGGE)<sup>[9]</sup>、PCR-DGGE 法<sup>[10]</sup>、微滴式数字 PCR 技术<sup>[11-12]</sup>等虽可对细菌进行痕量检测,但它们只能检测与特定分子探针结合的细菌或 DNA/RNA 片段含量,且无法进行现场快速检测。流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)具有独特的高通量、高灵敏度以及高分辨率等优点,能实现死亡细菌或活性细菌的绝对定量检测和痕量检测,同时还可进行现场实时在线监测。Kennedy 等人<sup>[13]</sup>利用 FCM 对来源于食品、水、环境和临床样品中的病原体进行了定量检测; Hammes 等人<sup>[14-15]</sup>开发出一款 FCM 系统,用于实时监测自来水生产过程中的细菌含量。目前,检测水生细菌的 FCM 系统一般采用成本较高的参比微球法进行绝对计数,且其检测系统过于复杂<sup>[14-16]</sup>。

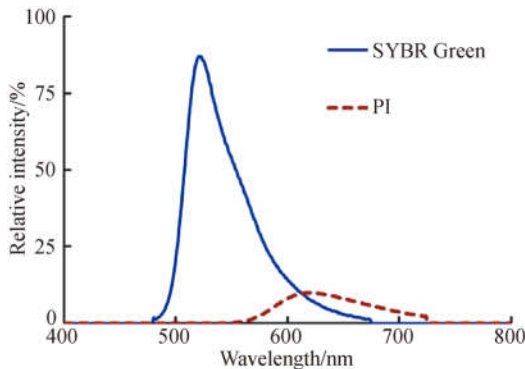
本研究以饮用水中典型细菌——大肠埃希菌(*E. coli*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)为研究对象,搭建一套具有绝对计数功能的小型化 FCM 系统,以 BD 公司的 LSR Fortessa 仪器(简称 BD 仪器)的检测结果为参照,评估本系统检测水生细菌的综合性能,为饮用水中典型细菌的快速检测仪器开发提供参考。

## 2 细菌定量检测原理及系统模块设计

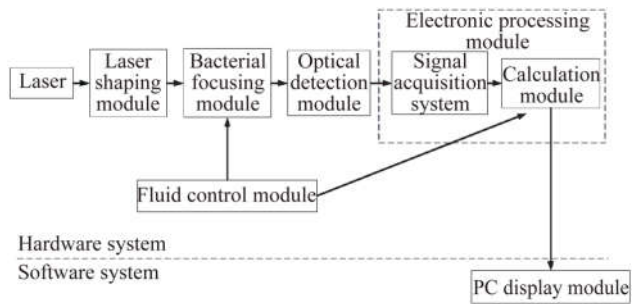
### 2.1 对细菌定量检测原理

饮用水中 *E. coli* 和 *S. aureus* 是危害人体健康的常见细菌,通常采用 SYBR Green I 和 Presidium Iodide(PI) 荧光染料对它们进行染色分析<sup>[14-17]</sup>。其中,SYBR Green I 荧光染料能直接

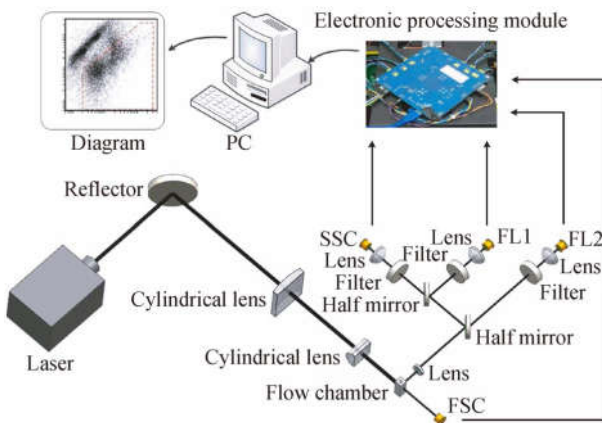
渗透到细菌膜内与核酸结合;PI 荧光染料不能直接渗透到膜功能完整的细菌膜内,只能与膜功能已破坏的死细菌的核酸结合。系统中采用 488 nm 激光器作为激发光源,两种荧光染料的激发光谱如图 1(a) 所示,通过探测 525/50 波段和 646/68 波段的荧光信号,可辨别出与 SYBR Green I 或 PI 荧光染料结合的细菌,从而实现活细菌或死细菌的状态识别和计数分析。



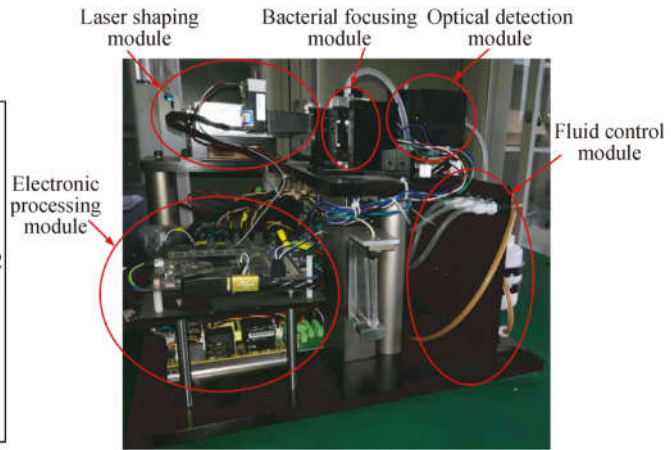
(a) SYBR Green I 和 PI 两种荧光染料在 488 nm 激光激发下的受激光谱图  
(a) Spectra of SYBR Green I and PI fluorescent dyes at 488 nm laser excitation



(b) 对细菌高通量检测的控制框图  
(b) Control block diagram for high throughput detection of bacteria



(c) FCM 系统对细菌定量检测原理图  
(c) FCM system for quantitative detection of bacteria



(d) FCM 检测平台实物图  
(d) Photo of FCM system

图 1 细菌定量检测原理及装置

Fig. 1 Principle and setup for quatitative detection of bacteria

用于细菌高通量检测的 FCM 系统主要由激光器激光整形模块、细菌悬浮液聚焦模块、光学探测模块、液流稳流控制模块、信号采集系统以及 PC 机显示模块等组成,控制框图如图 1(b) 所示,检测原理如图 1(c) 所示。利用流体动力学聚焦理论,在流动室中形成稳定的高速流动的单细胞流,细菌在单细胞流中依次单个通过该流动室的

检测区域;激光通过柱面镜组和透镜聚焦整形后可形成与单细胞流直径相当的高功率密度的椭圆光斑,并调节该整形光斑位置至流动室的检测区域;经 SYBR Green I 或 PI 荧光染料染色的细菌在该聚焦/整形激光的激发下产生具有一定强度的散射光和荧光,其中散射光包含前向散射光信号(Forward Scatter, FSC)和侧向散射光信号

(Side Scatter, SSC), 利用分光镜和滤波片可实现不同荧光 (FL1, FL2) 的分离和接收。通常, FSC 信号强度与细菌的体积呈正相关关系; SSC 信号强度与细菌胞内细胞器含量呈正相关关系; 荧光信号强度与细菌上染色的荧光染料含量和激发光谱特性相关。根据米氏散射原理, 利用 FSC 和 SSC 即可区分出常见微生物 (如大肠杆菌、曲霉、微球菌、棒状杆菌等)。散射光和荧光经光电探测器可转化为电信号, 系统中前向探测器采用 HAMAMATSU 公司的硅 PIN 光电二极管 (S3994-01), 荧光探测器与侧向探测器均采用 HAMAMATSU 公司的雪崩二极管 (S12023-10A); 电信号经 A/D 转换器由模拟信号转换为数字信号, 再经信号处理器进行前处理后上传至 PC 机; 在 PC 机软件中以各信号通道的散点图或柱状图等图像展现, 便于用户进行数据分析。本文搭建的 FCM 硬件系统实物图如图 1(d) 所示, 硬件系统与 PC 机通过 USB 线进行通讯。

检测系统设计的检测通量为  $10^4$  cells/s, 对于浓度为  $10^5$  cells/mL 的样品, 在上样为中速模式下, 完成一次实验所需时间在 5 min 内。

## 2.2 系统模块设计

激光整形模块采用张建华等人<sup>[18]</sup>提出的柱透镜组进行激光器的光束变换, 实现激光整形光斑在沿单细胞流流动方向的有效宽度约为  $7 \mu\text{m}$ , 在垂直于单细胞流流动方向的有效宽度约为  $60 \mu\text{m}$ 。现已对液流聚焦模块的性能进行了仿真分析, 并优化了该模块中样品流速与鞘液流速<sup>[19]</sup>; 设计和测试了液流稳流控制模块, 结果显示系统的样品聚焦脉动低于  $0.5 \mu\text{m}$ <sup>[20]</sup>。

检测系统含两个散射光信号 (FSC, SSC) 探测器和两个荧光信号 (FL1, FL2) 探测器, 如图 1(c) 所示, 且还需控制样品泵和鞘液泵的速度, 在电子学系统设计中, 至少需要 4 路 A/D 和 6 路 D/A。电子学处理模块已完成以 FPGA 为核心的电子控制系统设计, 实现 8 路 A/D 数据同步采集, 16 路 D/A 输出<sup>[21]</sup>; 系统已实现以 USB 为接口的高速数据采集系统设计, 传输速度可达  $25 \text{ MB/s}$ <sup>[22]</sup>。

## 2.3 用于细菌检测的信号采集系统设计

在对细菌检测过程中, 细菌本征的差异、液流稳流控制模块与电子学处理模块的稳定性等因素均会影响检测系统的测量精确度。为保证系统整体的测量精确度在 5% 以内, 则电子学采样过程中对系统产生的误差不应超过  $0.5\%$ <sup>[23]</sup>。为推导

采样频率与采样噪声间的关系, 需对荧光信号强度进行分析。受激发区中激光整形光斑特性的制约, 光斑截面的光强呈二维高斯分布<sup>[24]</sup>。

为简化模型, 忽略单细胞流在受激发区内液流脉动的影响, 单细胞流在受激发区激光光斑的截面近似为狭长的长方形, 如图 2(a) 所示。其中  $l$  为单细胞流的聚焦直径,  $D$  为激光光斑截面的纵向宽度, 将细菌近似为直径为  $d$  的球体。因  $d$  远小于  $D$ , 荧光强度包络曲线的峰值处细菌全部位于激光光斑内, 细菌在受激发过程中光截面为常量, 荧光信号强度模型近似为在呈高斯分布的钟形曲线的激光光斑内进行加权累加形式。以标准正态分布曲线峰值的  $1/e^2$  强度以上区域作为归一化的荧光脉冲曲线, 则高斯曲线的  $\sigma$  值为光斑直径  $D$  的  $1/4$ , 即  $D=4\sigma$ 。则细菌通过受激发区时所激发荧光强度  $f(x)$  可表示为:

$$f(x) = \int_{x-\frac{D}{2}}^{x+\frac{D}{2}} \frac{4}{\sqrt{2\pi}D} e^{-\frac{8x^2}{D^2}} dx, (-\infty < x < +\infty). \quad (1)$$

将  $f(x)$  归一化处理后的荧光强度  $f^*(x)$  为:

$$f^*(x) = \frac{f(x)}{f(0)} = \frac{1}{d} \int_{x-\frac{d}{2}}^{x+\frac{d}{2}} e^{-\frac{8x^2}{D^2}} dx, (-\infty < x < +\infty), \quad (2)$$

其中  $x$  为细菌沿单细胞流流动方向上的位置。细菌粒径一般在  $0.6 \sim 2 \mu\text{m}$ , 细菌尺寸与激光光斑尺寸的差距越大, 则细菌对荧光强度的积分效应越弱, 荧光强度的包络线越陡峭, 对于系统的要求就越高。本文以粒径为  $0.6 \mu\text{m}$  来估算最不利情况对系统的设计要求。由式(2)不难计算出, 在采样峰值与真实峰值偏差低于  $0.5\%$  下的钟形曲线跨度为  $5\%$ , 如图 2(b) 所示。检测系统设定的检测通量为  $10^4$  cells/s, 细菌通过受激发区的典型时间为  $5 \mu\text{s}$ , 同步采样时钟周期应低于  $0.25 \mu\text{s}$ , 即采样频率应高于  $4 \text{ MHz}$ 。以量化噪声为代表的白噪声总功率在 ADC 精度不变的条件下是维持恒定的, 而提高采样频率带宽会使白噪声的频带被展宽, 原采样频带内的噪声则相对降低。通过低通滤波将采样频带还原即可削弱噪声的影响并以此提高信噪比, 因此, 过采样能够提高系统的数据采集精度。采样精度的提高依赖过采样频率和奈奎斯特频率间的倍率, 它对 SNR 的改善表达式如下:

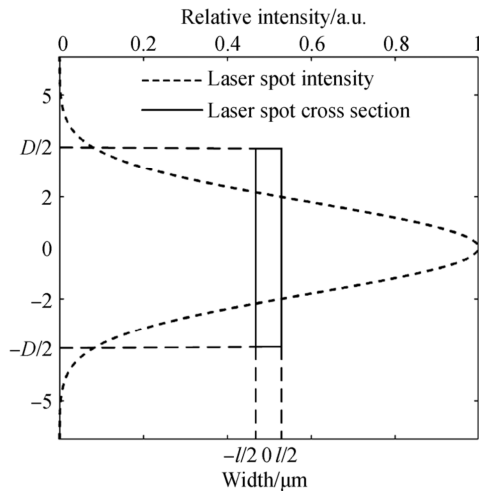
$$G_{\text{SNR}} = 10 \log_{10} (f_s / f_{\text{Nyquist}}), \quad (3)$$

其中:  $f_s$  为过采样的采样频率;  $f_{\text{Nyquist}}$  是信号的奈

奎斯特采样频率,即 4 MHz;  $f_s/f_{nyquist}$  可以定义为过采样率(OVR),是衡量信噪比改善程度的直接参数。过采样用于改善数据采集系统的信噪比,  $SNR_O$  的表达式为:

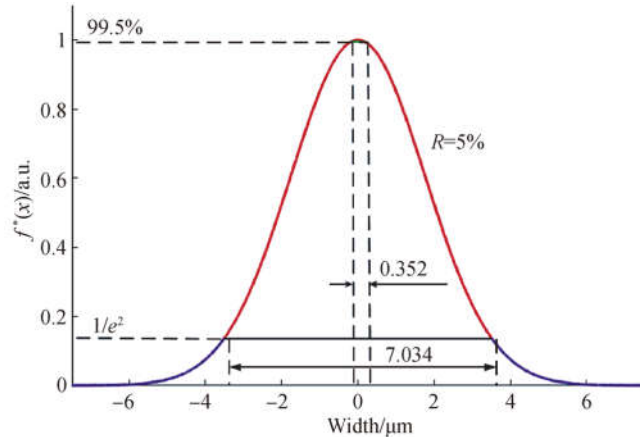
$$SNR_O = SNR_{ADC} + G_{SNR}, \quad (4)$$

其中:  $SNR_{ADC}$  为通道信噪比,本系统采用的是 16 位 40 MSPS 的 ADC 芯片,该芯片的  $SNR_{ADC} > 76$  dB。因此,对于 4 MHz 宽带的信号可实现 86 dB 的信噪比,满足系统所需的检测灵敏度。



(a)单细胞流在受激发区呈二维高斯分布的激光光斑下的简化模型

(a)Simplified model of single-cell flow under laser spot with two-dimensional Gaussian distribution in excited region



(b)细菌荧光强度变化曲线

(b)Curve of bacterial fluorescence intensity

图 2 细菌检测的信号采集结果

Fig. 2 Signal sampling in bacteria detection

### 3 绝对计数及性能评估

#### 3.1 绝对计数方法

在饮用水常规指标检测标准中<sup>[25]</sup>,饮用水微生物学指标主要由单位体积中菌落总数来评估。为了让 FCM 和 HPC 两种方法的检测数据具有可比性,搭建的 FCM 系统应具有绝对计数功能。绝对计数常用方法的特点如表 1 所示。

表 1 绝对计数方法及特点

Tab.1 Characteristics of absolute counting methods

| 方法    | 特点   |    |    |      |        |        |
|-------|------|----|----|------|--------|--------|
|       | 实时测量 | 精度 | 成本 | 交叉污染 | 最大体积限制 | 公司     |
| 注射泵法  | Y    | M  | M  | Y    | Y      | BC     |
| 双平台法  | N    | L  | L  | N    | N      | —      |
| 参比微球法 | N    | M  | H  | N    | N      | BD     |
| 双电极法  | N    | L  | L  | Y    | Y      | Partec |
| 流量传感器 | Y    | H  | M  | N    | N      | 迈瑞     |

注: Y=yes, N=no, H-high, M-middle, L-low, BC-BECKMAN COULTER, BD-Becton Dickinson.

本系统基于 Sensirion 公司的流量传感器 (SLI-0430)来实现细菌的绝对计数,主要基于微芯片技术,利用微孔道流场中温差变化量来换算流量变化量<sup>[26]</sup>,测试精度高达 0.2%。在测量中,利用该传感器的数字信号输出来进行绝对计数,其计算公式为:

$$C_{i1} = \begin{cases} 1, & p_i > H_c \\ 0, & p_i < H_c \\ -1, & p_i < -|H_c| \end{cases}, \quad (5)$$

$$TN_{11} = \sum_{i=1}^n C_{i1}, \quad (6)$$

$$V_{11} = V_{10} \cdot TN_{11} \cdot 10^{-6}, \quad (7)$$

$$\rho_1^j = \frac{TN_{11}^j}{V_{11}}, \quad (8)$$

其中:  $p_i$  为第  $i$  次信号采集强度;  $H_c$  为脉冲输出阈值;  $n$  为单次测试实验总的采样数;  $C_{i1}$  为第  $i$  次采样时脉冲计数值;  $V_{11}$  为单次测试微球或细菌悬浮液抽取总体积;  $V_{10}$  为单个数字信号输出脉冲所设置的体积;  $TN_{11}$  为单次样品测试中输出脉冲总数;  $TN_{11}^j$  为 PC 机中对第  $j$  类目标微球或细菌的计数;  $\rho_1^j$  为第  $j$  类目标微球或细菌的测试浓度。

由式(7)和式(8),不难得出:

$$\rho_i^j = \frac{TN_{11}^j}{V_{10} \cdot TN_{11}} \cdot 10^6. \quad (9)$$

### 3.2 绝对计数性能评估

#### 3.2.1 重复性

测试对象选用粒径为 3  $\mu\text{m}$  的 Duke 微球 (Thermo Fisher Scientific 公司,批号:44006),并随机配制 4 组不同浓度的微球悬浮液作为待测样品,每组悬浮液测试 3 次,根据测试结果(如表 3 所示)计算每组样品的相对标准偏差,即变异系数  $cv$  值,以该参数来衡量系统的重复性。 $cv$  值的计算公式为:

$$cv = \frac{s}{\bar{k}} \times 100\%, \quad (10)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (k_i - \bar{k})^2}{m-1}}, \quad (11)$$

其中: $k_i$  为第  $i$  次测定结果; $\bar{k}$  为 3 次测定结果的算数平均值; $m$  为测定次数。

由式(10)和式(11)不难得出检测系统在  $10^5 \sim 10^6$  particles/mL 浓度量级下的重复性均在 2% 以内,如表 3 所示。其中, $\rho_1^1, \rho_2^1$  分别为检测系统和 BD 仪器对 3  $\mu\text{m}$  的 Duke 微球浓度测量值。

#### 3.2.2 相关性

为判断检测系统与 BD 仪器测试结果的可比性,对两仪器测试结果进行相关性分析。其中, BD 仪器采用参比微球法进行绝对计数,参比微球选用粒径为 10  $\mu\text{m}$  的 FlowCheck (BECKMAN COUNTER 公司,批号:9434182)。首先,利用光学显微镜对参比微球进行绝对计数,测试计算结果如表 2 所示,不难得出该标准微球的平均浓度为  $1.064 \times 10^6$  particles/mL。

表 2 光学显微镜对参比微球浓度测试计算结果

Tab. 2 Test results of reference microsphere's concentration using optical microscope

| 实验组   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $\bar{\rho}_{21} /$<br>( $\times 10^6$ particles $\cdot$ mL $^{-1}$ ) | 1.149 | 1.191 | 1.000 | 0.970 | 1.123 | 0.950 |

参比微球法进行绝对计数的计算公式如下:

$$TN_{21} = \frac{\bar{\rho}_{21} V_{21}}{V_2} \cdot V_{2s}, \quad (12)$$

$$TN_{21}^j = \frac{\bar{\rho}_2^j V_2^j}{V_2} \cdot V_{2s}. \quad (13)$$

由式(12)和式(13),不难得出如下:

$$\rho_2^j = \bar{\rho}_{21} \frac{V_{21}}{V_2^j} \cdot \frac{TN_{21}^j}{TN_{21}}, \quad (14)$$

其中: $TN_{21}$  为 BD 仪器对参比微球计数总数; $\bar{\rho}_{21}$  为参比微球的平均浓度; $V_{21}$  为上样试管中添加的参比微球的体积; $V_2$  为上样试管中总体积; $V_{2s}$  为试验中 BD 仪器所上样的体积; $TN_{21}^j$  为 BD 仪器对第  $j$  类目标微球或细菌的计数总数; $\rho_2^j$  为 BD 仪器对第  $j$  类目标微球或细菌的测试浓度; $V_2^j$  为上样试管中第  $j$  类目标微球或细菌的体积。

对表 3 中两仪器的测试数据进行相关性分析,不难得出相关系数  $r$  为 0.999 6,满足  $r \geq 0.975$  的要求,表明检测系统在绝对计数性能上与 BD 仪器的测试结果具有可比性。

#### 3.2.3 准确性

利用测量值与真实值的绝对误差  $\Delta$  和相对误差  $\delta$  来评判检测系统的准确度,其中,真实值  $\rho_{av}^1$  为 BD 仪器在每组实验中测试结果的平均值。测试结果如表 3 所示, $\delta$  最大值为 8.51%,说明检测系统测试 Duke 微球的准确度还有待提升。

表 3 检测系统绝对计数性能评估

Tab. 3 Performance evaluation of detection system in absolute counting

| 实验组 | $\rho_1^1$<br>/(particles $\cdot$ mL $^{-1}$ ) | $\rho_2^1$<br>/(particles $\cdot$ mL $^{-1}$ ) | $cv/\%$ | $\Delta$<br>/(particles $\cdot$ mL $^{-1}$ ) | $\delta/\%$ |
|-----|--|--|---------|--|-------------|
| 1   | 109 052  | 105 951  |         | 4 484  | 4.29        |
|     | 109 806  | 100 011  | 1.74    | 5 238  | 5.01        |
|     | 113 470  | 107 741  |         | 8 902  | 8.51        |
| 2   | 154 116  | 163 087  |         | -3 078                                       | -1.96       |
|     | 155 022  | 154 195  | 1.98    | -2 173                                       | -1.38       |
|     | 161 099  | 154 302  |         | 3 905  | 2.48        |
| 3   | 333 901  | 319 626  |         | 18 487                                       | 5.86        |
|     | 336 207  | 307 465  | 0.63    | 20 793                                       | 6.59        |
|     | 331 078  | 319 152  |         | 15 663                                       | 4.97        |
| 4   | 2 512 629                                      | 2 416 929                                      |         | -1 486                                       | -0.06       |
|     | 2 543 685                                      | 2 536 253                                      | 0.66    | 29 570                                       | 1.18        |
|     | 2 551 121                                      | 2 589 164                                      |         | 37 006                                       | 1.47        |

## 4 最低可检测浓度与线性度的评估

### 4.1 最低可检测浓度评估方法

为评估检测系统对细菌的最小检测浓度,目标微球更换为与细菌粒径大小相当的 1  $\mu\text{m}$  单荧光微球(Spherotech 公司,型号:URFP-10-5,批号:AH01)。该批号的微球浓度约为  $10^6$  particles/mL,将其按 1:1, 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>5</sup> 等比例稀释成 6 组不同浓度的微球悬浮液,与 BD 仪器进行对比实验。为提高 BD 仪器的检测精度,参比微球更换为粒径为 3.5  $\mu\text{m}$  的单荧光微球(Spherotech 公司,型号:RFP-30-5,批号:AB01)。

为保证目标微球在低浓度下的测试准确性,参比微球要稀释在合适浓度。在本实验中采用荧光显微镜对该参比微球进行绝对计数,根据经验,将它稀释在  $10^5$  particles/mL 的浓度量级。

### 4.2 最低可检测浓度

实验发现,检测系统对 10 particles/mL 浓度量级的目标微球的测试结果均为 0,说明无法对该浓度量级的悬浮液进行准确检测。检测系统对  $10^3 \sim 10^6$  particles/mL 浓度量级的目标微球的测试结果如表 4 所示,  $c_v$  值均在 4% 以内;对  $10^6$  particles/mL 浓度量级的目标微球测试的相对误差高达 -15.79%,表明检测系统的系统误差还较大,需要校准;对  $10^2$  particles/mL 浓度量级的目标微球测试  $c_v$  值高达 6.45%,相对误差  $\delta$  最高为 -7.94%。表 4 中,  $\rho_1^2, \rho_2^2$  分别为检测系统和 BD 仪器对等比例稀释的 1  $\mu\text{m}$  单荧光微球浓度测量值。

进一步对两仪器的测试结果做线性相关性分析。经计算,相关系数  $r$  高达 0.999 8,表明两仪器的测试结果相关性很强,具有可比性。

### 4.3 线性度

将测量值与理论值进行线性回归分析,来评估检测系统对等比例稀释的目标微球的检测线性度。其中,理论值  $\rho_{th}^2$  仍采用 BD 仪器在每组测试结果的平均值。计算结果如图 3 所示,测量值与理论值的相关系数  $r$  高达 0.999 8,同时也反映了检测系统对细菌的最低可检测浓度量级可低于  $10^2$  particles/mL。

表 4 检测系统对等比例稀释的 1  $\mu\text{m}$  单荧光微球的浓度测试分析

Tab.4 Concentration test analysis of single-fluorescence microspheres with a particle size of 1  $\mu\text{m}$  diluted in detection system

| 比<br>例            | $\rho_1^2$<br>/(particles $\cdot$ mL <sup>-1</sup> ) | $\rho_2^2$<br>/(particles $\cdot$ mL <sup>-1</sup> ) | $c_v/\%$<br>/(particles $\cdot$ mL <sup>-1</sup> ) | $\rho_{th}^2$<br>/(particles $\cdot$ mL <sup>-1</sup> ) | $\delta/\%$ |
|-------------------|--|--|--|---|-------------|
| 1:1               | 1 009 535  | 1 187 813  |  |   | -15.79      |
|                   | 1 077 324  | 1 175 231  | 3.59   | 1 198 769   | -10.13      |
|                   | 1 098 958  | 1 233 263  |  |   | -8.33       |
| 1:10              | 120 060  | 118 844  |  |   | -0.28       |
|                   | 125 022  | 121 675  | 1.71   | 120 392   | 3.85        |
|                   | 121 419  | 120 657  |  |   | 0.85        |
| 1:10 <sup>2</sup> | 11 547   | 11 573   |  |   | -3.43       |
|                   | 11 526   | 12 602   | 1.96   | 11 957  | -3.61       |
|                   | 12 022   | 11 697   |  |   | 0.54        |
| 1:10 <sup>3</sup> | 1 083  | 1 154  |  |   | -1.47       |
|                   | 1 148  | 1 044  | 3.18   | 1 099   | 4.42        |
|                   | 1 167  | 1 099  |  |   | 6.19        |
| 1:10 <sup>4</sup> | 101  | 95   |  |   | 3.11        |
|                   | 90   | 90   | 6.45   | 98  | -7.94       |
|                   | 105  | 108  |  |   | 7.53        |
| 1:10 <sup>5</sup> | 0  | —  |  |   | —           |
|                   | 0  | —  | —  | —   | —           |
|                   | 0  | —  |  |   | —           |

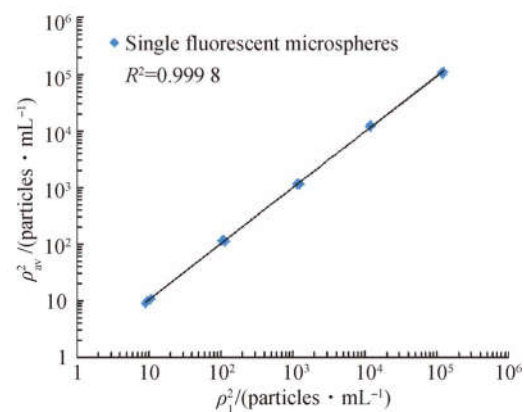
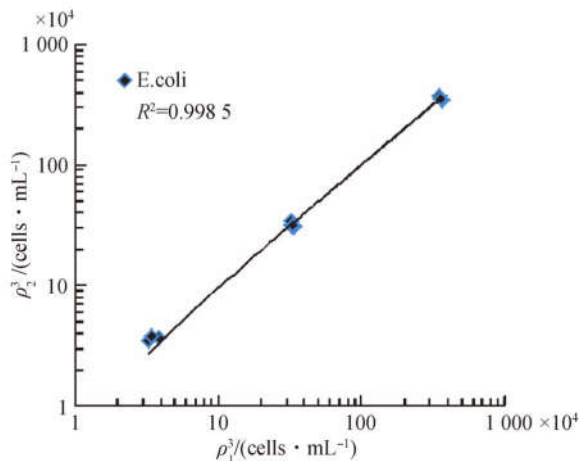


图 3 检测系统对等比例稀释的 1  $\mu\text{m}$  单荧光微球浓度测试的线性度分析

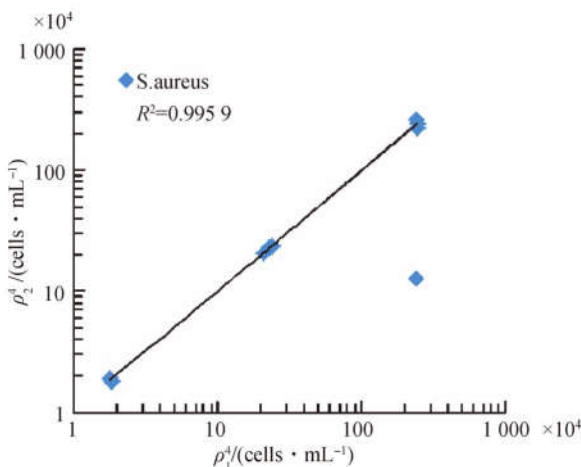
Fig. 3 Linearity analysis of concentration of single fluorescent microsphere with a particle size of 1  $\mu\text{m}$  diluted in detection system

## 5 细菌悬液的定量检测

为分析检测系统对细菌悬液的检测性能,检测对象采用杭州微球科技有限公司的 *E. coli* 质控品(批号:HDC7180517B)和 *S. aureus* 质控品(批号:HDC2180517B),同样与 BD 仪器进行对比实验。BD 仪器的参比微球仍采用同批次的单荧光微球。两台仪器对 *E. coli* 细胞悬液和 *S. aureus* 细胞悬液的测试结果如图 4(a)和图 4(b)所示,其中,检测系统对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的测量值分别为  $\rho_1^3, \rho_1^4$ , BD 仪器对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的测试值分别为  $\rho_2^3, \rho_2^4$ 。不难看出,两仪器对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的测试结果的相关系数分别为 0.998 5 和 0.995 9,测试结果具有可比性。



(a)检测系统与 BD 仪器对 *E. coli* 的浓度测试的相关性分析  
(a)Correlation analysis between detection system and BD instrument for concentration test of *E. coli* bacteria



(b)检测系统与 BD 仪器对 *S. aureus* 的浓度测试的相关性分析  
(b)Correlation analysis between detection system and BD instrument for concentration test of *S. aureus* bacteria

图 4 细菌悬液的定量检测结果

Fig. 4 Quantitative detection result of bacteria suspension

这两台仪器分别对以 1 : 1, 1 : 10, 1 : 10<sup>2</sup> 等比例稀释的 3 组不同浓度的 *E. coli* 和 *S. aureus* 细胞悬液进行浓度测试,结果如表 5 所示。从表 5 可得出,两仪器对各实验组的 *E. coli* 和 *S. aureus* 细胞悬液的浓度测试结果均在同一数量级;测试结果均以 1 : 10 的梯度趋势变化,与两种细菌悬液稀释的等比例值一致。进一步分析表 5 中数据,两仪器对细菌浓度的测试 *cv* 均低于 7%,表明 FCM 法对细菌定量检测的稳定性比较好;检测系统与 BD 仪器测试结果的相对误差  $\delta$  均在 4% 以内,说明检测系统对细菌的系统误差达到 BD 仪器的水平。

表 5 检测系统与 BD 仪器对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的浓度测试的统计学分析

Tab. 5 Statistical analysis of concentration test of *E. coli* bacteria and *S. aureus* bacteria by detection system and BD instrument

| 实验组              | 检测系统   |              | BD 仪器  |              | $\delta/\%$ |       |
|------------------|--|--------------|--|--------------|-------------|-------|
|                  | $\rho_1^i / (\text{cells} \cdot \text{mL}^{-1})$ | <i>cv</i> /% | $\rho_2^i / (\text{cells} \cdot \text{mL}^{-1})$ | <i>cv</i> /% |             |       |
| <i>E. coli</i>   | 1  | 3 568 240    | 1.4  | 3 581 018    | 3.4         | -0.36 |
|                  | 2  | 329 968      | 2.1  | 318 622      | 4.9         | 3.56  |
|                  | 3  | 35 372       | 6.8  | 36 522       | 3.4         | -3.15 |
| <i>S. aureus</i> | 1  | 2 434 920    | 0.5  | 2 408 581    | 6.8         | 1.09  |
|                  | 2  | 225 022      | 5.9  | 223 564      | 5.7         | 0.65  |
|                  | 3  | 18 114       | 1.8  | 18 360       | 2.1         | -1.34 |

## 6 结 论

本文提出了一种快速定量检测饮用水中细菌含量的 FCM 系统,通过简单细胞流在受激发区内荧光信号强度的计算模型,分析和评估了系统的信号采集系统性能,对于 4 MHz 宽带的荧光信号,信号采集系统的信噪比高达 86 dB,可满足对细菌的高精度检测;基于流量传感器的绝对计数法无需添加参比微球试剂,对于一定浓度量级下的微球,系统测试 *cv* 值在 2% 以内,与 BD 仪器测试结果的相关系数高达 0.999 6,相对误差最大为 8.51%,系统准确度还有待提升,等比例稀释微球测试线性度高达 0.999 8,最低可检测细菌浓度可达 10<sup>2</sup> particles/mL; *E. coli* 和 *S. aureus* 含量测试结果的 *cv* 值均低于 7%,与 BD 仪器测试结果的相关系

数均高于0.995 9,两台仪器测试结果的相对误差均在4%以内。本文研制的FCM系统可实现对细菌的快速定量检测,为饮用水中典型细菌的快速检

测仪器的开发提供了参考。此外,基于流量传感器的绝对计数法在未来全天候实时监测水源地水或自来水厂的水质状况具有很好的应用前景。

### 参考文献:

- [1] MOHAMMED H, HAMEED I A, SEIDU R. Comparative predictive modelling of the occurrence of faecal indicator bacteria in a drinking water source in Norway [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 628-629:1178-1190.
- [2] 郭建国,赵龙浩,徐丹,等.洪水对大凌河河流浮游细菌群落的影响[J].*生态学报*,2015,35(14):4777-4783.  
GUO J G, ZHAO L H, XU D, *et al.*. Effect of the flood on the bacterial community of bacterioplankton in Daling River [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(14):4777-4783. (in Chinese)
- [3] ALIGHADRI M, SADEGHI T, BAGHERIARDEBILIAN P, *et al.*. Heterotrophic bacteria in drinking water distribution system in Ardabil, Iran [J]. *Arumshealth*, 2015, 6(2):226-235.
- [4] 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所.生活饮用水标准检验方法微生物指标[S].中华人民共和国卫生部;中国国家标准化管理委员会,2006.  
National Institute of Environmental Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention. *Standard test method for drinking water microbial indicator* [S]. Ministry of Health of the People's Republic of China; China National Standardization Administration, 2006. (in Chinese)
- [5] HORN S, PIETERS R, BEZUIDENHOUT C. Pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria from drinking-water boreholes [J]. *Journal of Water and Health*, 2016, 14(6):890-900.
- [6] LAUTENSCHLAGER K, HWANG C, LIU W T, *et al.*. A microbiology-based multi-parametric approach towards assessing biological stability in drinking water distribution networks [J]. *Water Research*, 2013, 47(9):3015-3025.
- [7] 田青,罗金平,刘晓红,等.生物发光法细菌快速检测仪的研制及应用[J].*光学精密工程*,2010,18(4):771-778.  
TIAN Q, LUO J P, LIU X H, *et al.*. Development and application of rapid detecting instrument for bacteria based on bioluminescence [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2010, 18(4):771-778. (in Chinese)
- [8] 吴太虎,毛佳文,陈锋,等.痕量微生物快速检测系统[J].*光学精密工程*,2015,23(11):3061-3068.  
WU T H, MAO J W, CHEN F, *et al.*. Rapid trace microbia detection system [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2015, 23(11):3061-3068. (in Chinese)
- [9] GRATTEPANACHE J D, SANTOFERRARA L F, ANDRADE J, *et al.*. Distribution and diversity of oligotrich and choreotrich ciliates assessed by morphology and DGGE in temperate coastal waters [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2014, 71(3):211-234.
- [10] LIU J, YU Y Y, CAI Z, *et al.*. Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR-DGGE [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 31(9):1387-1395.
- [11] 周巍,李月华,孙勇,等.微滴式数字PCR技术定量检测发酵乳中金黄色葡萄球菌[J].*食品科学*,2017,38(16):287-291.  
ZHOU W, LI Y H, SUN Y, *et al.*. Quantitative detection of staphylococcus aureus in yogurt by droplet digital PCR assay [J]. *Food Science*, 2017, 38(16):287-291. (in Chinese)
- [12] 刘聪,董文飞,张涛,等.微滴式数字PCR中低浓度荧光微滴分类[J].*光学精密工程*,2018,26(3):647-653.  
LIU C, DONG W F, ZHANG T, *et al.*. Identification of florescent droplets at low concentrations for droplet digital PCR [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2018, 26(3):647-653. (in Chinese)
- [13] KENNEDY D, WILKINSON M G. Application of flow cytometry to the detection of pathogenic bacteria [J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2017, 23:21-38.
- [14] HAMMES F, BROGER T, WEILENMANN H U, *et al.*. Development and laboratory-scale testing of a fully automated online flow cytometer for drinking water analysis [J]. *Cytometry Part A*, 2012, 81A(6):508-516.
- [15] BESMER M D, HAMMES F. Short-term microbial dynamics in a drinking water plant treating groundwater with occasional high microbial loads [J]. *Water Research*, 2016, 107:11-18.
- [16] EL-CHAKHTOURA J, PREST E, SAIKALY P,

- et al.*. Dynamics of bacterial communities before and after distribution in a full-scale drinking water network [J]. *Water Research*, 2015, 74:180-190.
- [17] OZAWA S, OKABE S, ISHII S. Specific single-cell isolation of escherichia coli O157 from environmental water samples by using flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2016, 13(8):456-461.
- [18] 张建华, 刘超, 周哲海, 等. 基于柱透镜的单细胞照明系统的设计与实现[J]. *激光与红外*, 2016, 46(6):722-726.
- ZHANG J H, LIU CH, ZHOU ZH H, *et al.*. Design and implementation of single-cell illumination system based on cylindrical lens [J]. *Laser & Infrared*, 2016, 46(6):722-726. (in Chinese)
- [19] 马玉婷, 严心涛, 陈忠祥, 等. 流式细胞仪液流聚焦系统仿真分析与设计[J]. *分析仪器*, 2014(1):17-22.
- MA Y T, YAN X T, CHEN ZH X, *et al.*. Simulated analysis and design of flow cytometer focusing system [J]. *Analytical Instrumentation*, 2014(1):17-22. (in Chinese)
- [20] 严心涛, 钟金凤, 吴云良, 等. 流式细胞仪气动稳流聚焦系统设计及测试[J]. *实验室研究与探索*, 2016, 35(1):39-42,75.
- YAN X T, ZHONG J F, WU Y L, *et al.*. Design and test of flow cytometer focusing system based on pneumatic steady flow method [J]. *Research and Exploration in Laboratory*, 2016, 35(1):39-42,75. (in Chinese)
- [21] 吴云良, 裴智果, 陈忠祥, 等. 以 FPGA 为核心的流式细胞仪控制系统设计[J]. *电子测量技术*, 2015, 38(7):58-61.
- WU Y L, PEI ZH G, CHEN ZH X, *et al.*. Design of flow cytometry control system based on FPGA [J]. *Electronic Measurement Technology*, 2015, 38(7):58-61. (in Chinese)
- [22] 马玉婷, 吴云良, 裴智果, 等. 流式细胞仪数据采集系统的 USB 接口设计[J]. *电子设计工程*, 2012, 20(18):82-86.
- MA Y T, WU Y L, PEI ZH G, *et al.*. USB interface design of data acquisition system in flow cytometer [J]. *Electronic Design Engineering*, 2012, 20(18):82-86. (in Chinese)
- [23] KALINA T, FLORES-MONTERO J, VAN DER VELDEN V H J, *et al.*. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols [J]. *Leukemia*, 2012, 26(9):1986-2010.
- [24] WANG J J, HAN L, HAN Y P, *et al.*. Shaped beam scattering from a single lymphocyte cell by generalized Lorenz-Mie theory [J]. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 2014, 133:72-80.
- [25] 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所. 生活饮用水卫生标准[S]. 中华人民共和国卫生部; 中国国家标准化管理委员会, 2006.
- National Institute of Environmental Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention. *Hygienic standard for drinking water* [S]. Ministry of Health of the People's Republic of China; China National Standardization Administration, 2006. (in Chinese)
- [26] ASHAUER M, GLOSCH H, HEDRICH F, *et al.*. Thermal flow sensor for liquids and gases based on combinations of two principles [J]. *Sensors and Actuators A: Physical*, 1999, 73(1/2):7-13.

#### 作者简介:



严心涛(1987—),男,湖北仙桃人,硕士,副研究员,2009年于西南交通大学获得学士学位,2011年于哈尔滨工业大学获得硕士学位,主要从事生物医学测量方法研究及仪器设计的开发工作。  
E-mail: yanxt@sibet.ac.cn

#### 导师简介:



武晓东(1968—),男,吉林舒兰人,博士生导师,研究员,1995年于中国科学院长春光学精密机械与物理所获得硕士学位,2004年于日本筑波大学获得博士学位,主要从事医用激光技术、光学工程、医用光学等方面的研究。E-mail: wuxiaodong2000@hotmail.com