

文章编号 1004-924X(2015)11-3061-08

## 痕量微生物快速检测系统

吴太虎,毛佳文,陈 锋,顾 彪,李 抄\*  
(军事医学科学院 卫生装备研究所,天津 300161)

**摘要:**针对微生物检测中存在的耗时多、结构复杂、探测精度低等问题,提出了一种快速、简单、检测下限低的微生物检测方法。通过结合荧光标记物标记、微孔滤膜过滤、激光扫描及荧光成像技术,设计了痕量微生物快速扫描检测系统,使用大视场、大景深、长焦距扫描物镜,结合二维扫描振镜,完成了对痕量微生物样本的快速检测。描述了检测系统的基本原理及光路系统的设计与优化,对采集信号进行了分析,并对检测系统的检测性能进行了论证及测试。实验结果表明,该检测系统可以在10 min内完成对 $10\sim 2.5\times 10^3$  cfu/mL的微生物的准确检测,检测下限为10 cfu/mL,可以满足医用高纯水、饮料用水、微电子加工高纯水等领域的水体快速检测需求。

**关键词:**激光扫描;微生物检测;痕量检测;光学系统设计;荧光成像

**中图分类号:**Q93-332 **文献标识码:**A **doi:**10.3788/OPE.20152311.3061

## Rapid trace microbia detection system

WU Tai-hu, MAO Jia-wen, CHEN Feng, GU Biao, LI Chao\*

(*Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300161, China*)

\* *Corresponding author, E-mail: nk\_lich@hotmail.com*

**Abstract:** For the higher time consumption, complex constructs and lower detecting accuracy of microbia detection, this research presents a fast, simple microbial detection system with a low detection limit. Combining fluorescence marker, filter membrane, laser scanning and fluorescence imaging technologies, a rapid scanning system for the trace microbia detection was designed. On the basis of the scanning lens with a large field of view, a large depth of field, and a longer focal length, the fast detection for a microbial sample was implemented by combined with a 2D scanning galvanometer. Basic principles of the detection system were described and the optical system was designed and optimized. The collected signals were analyzed, and the performance of the detection system was demonstrated and tested. Experimental results show the detection system accurately detects microbial samples ranged from 10 cfu/mL to  $2.5\times 10^3$  cfu/mL in 10 min, and the detection limit is 10 cfu/mL. The system meets the demands of real-time detection of medical high-purity water and other sensitive detection situations.

**Key words:** laser scanning; microbia detection; trace detection; optical system design; fluorescence imaging

收稿日期:2015-07-02;修订日期:2015-09-08.

基金项目:国家十二五规划重大专项资助项目(No. AWS11Z005-4);国家科技重大专项资助项目(No. 2012ZX10004801)

## 1 引言

随着社会的快速发展,工业生产、制药制水、食品药品监测等领域都亟需实现对细菌的快速实时检测,从而保证工业生产电子元器件的质量,药品、水质及食品的安全。

当前的微生物检测方式以传统的平板计数法、荧光显微计数法、流式细胞术为主。其中平板计数法计数准确、可靠度高、成本低,但因需进行细菌培养,检测速度慢,时间长达 48~72 h,不能满足特定场合的快速、实时性要求。此外,有些细菌的培养条件苛刻,当温度、营养物组成等生长环境发生改变时,一些细菌会进入一种“活的不可培养”的状态,导致计数结果不准确。显微荧光计数法是先对目标物品进行染色处理后,置于荧光显微镜中进行观测,选取数个视场计数估算均值。该方法的检测时间较长,观测景深小,存在较明显的离焦情况,一次所能观测的区域也较小;此外,人工操作费时费力,且估算均值存在很多不确定性,计数结果的准确度不高<sup>[1-3]</sup>。当前,生物技术结合现代仪器的微生物检测技术得到了快速发展,流式细胞术应运而生,它能够克服以上两种方法耗时长的的问题。流式细胞术通过测定散色光和荧光信号来实现对微生物样本快速多参数的检测,现已成为微生物测量的热门方法,但流式细胞术的检测细菌数量在  $10^2 \sim 10^6$  cfu/mL (cfu/mL 为每 mL 水中所含有的细菌数),不能精确定量检测浓度低于  $10^2$  cfu/mL 的痕量(指检测水溶液中每 mL 细菌的数量低于 100 个)微生物<sup>[4-11]</sup>。

本文提出了痕量微生物快速检测系统。该系统通过微孔滤膜过滤进行微生物富集,荧光染料标记,实现目标物的标记和荧光增强,再利用大景深、大视场光学扫描系统对滤膜进行逐点检测,从而实现了单个细菌的独立成像和探测,并达到了痕量检测的效果。

## 2 原理

由于在细菌的细胞质中大量散布着核糖体,而核糖体的成分大部分是 RNA,同时细菌为原核细胞,DNA 处于细胞浆中,相对集中于一个区域。选取 SYTO9 荧光染料与细菌 DNA 和 RNA 结合,当荧光核酸染料与细菌内 DNA 和 RNA 结合后,其荧光发光效率在激光激发状态下相对未结

合的荧光染料将大大提高。利用 SYTO9 荧光染料对细菌的核酸进行染色,此过程不受细菌种类、细菌活性状态的影响<sup>[12-13]</sup>。

水中常见的细菌长度为  $1 \sim 6 \mu\text{m}$ ,宽度为  $0.3 \sim 0.9 \mu\text{m}$ ,本文根据低背景荧光材质滤膜对细菌荧光信号干扰小等特点,选取 millipore 孔径为  $0.4 \mu\text{m}$ ,直径为 13 mm 的聚碳酸酯黑色微孔滤膜参与实验。选取的滤膜孔径小于细菌直径,可把细菌充分截留于滤膜上,实现细菌与溶液的分离<sup>[3]</sup>。但微孔滤膜表面具有一定的粗糙度,在光学系统设计中,扫描系统通过对滤膜进行单点逐次扫描成像,景深小时不利于成像检测,因此这里使用长焦距的扫描透镜以实现大景深检测。在激光激发下,染料的细菌发出荧光信号,荧光信号经光学系统后被光电倍增管采集并转化为数字信号,最后运用二维图像还原以及图像处理技术实现对细菌的成像检测计数。

## 3 光学系统设计

如图 1 所示,痕量微生物快速检测系统主要由激光器、准直镜、扩束镜、分色镜、扫描振镜、扫描透镜、滤光镜、透镜、共焦孔、光电倍增管组成。其中,扫描振镜和扫描透镜构成扫描系统,实现扫描光束的二维移动和大视场扫描;共焦孔主要用于消除扫描透镜前后表面反射产生的杂散光。激光器发出的入射光经扩束后进入孔径光阑,孔径光阑用于消除主光束的边缘光晕,提高光束的聚焦质量。激光束经准直、扩束及滤光镜后,由与光轴成  $45^\circ$  放置的分色镜反射后入射到扫描振镜中,分色镜对中心波长为 476 nm,带宽为 20 nm 的光反射,对中心波长为 530 nm,带宽为 20 nm 的光透射,XY 轴振镜控制板控制振镜高速摆动。光束经二维振镜反射,再由扫描透镜聚焦到被测样本滤膜的上表面。滤膜表面的被染色细菌在受激时发出荧光,荧光通过扫描透镜后成为平行光束,由二维振镜反射后与入射光重合,经由分色镜后透射。分色镜后设置中心波长为 532 nm、带宽为 40 nm 的带通滤光片,以滤除散射光;再经透镜后在共焦孔处聚焦,利用共焦孔进一步消除扫描镜头表面反射的杂光。在共焦孔后放置荧光探测光电倍增管,由于光电倍增管的感光区域直径为 8 mm,所以将光电倍增管置于共焦孔后 15 mm 处,发散光束的直径约为 5 mm。光电倍增管信号经放大后,通过数据采集卡的输入端接收,把模

拟电信号转换为数字电信号,然后输入计算机进行信号处理。

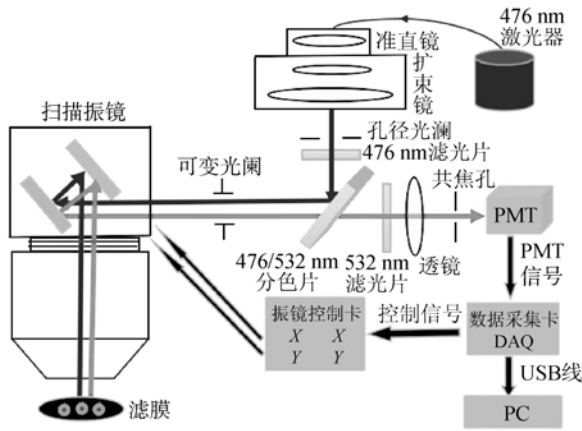


图 1 痕量微生物快速检测系统原理图

Fig.1 Schematic of rapid trace microbia detection system

### 3.1 景深分析

当前的扫描检测系统大多数采用显微物镜进行成像,虽然显微物镜的数值孔径大,但视场和景深很小。常见的显微物镜的视场为  $600\ \mu\text{m} \times 600\ \mu\text{m}$  左右,但景深只有几微米。为实现微生物样本的自动化扫描成像,这里选用大视场、大景深、小数值孔径的扫描透镜对滤膜进行大视场自

动扫描检测。所设计的扫描透镜参数如下:400~700 nm 可见光波段的透过率在 95% 以上,入瞳直径为 5 mm,有效焦距为 39 mm,视场为  $10.3\ \text{mm} \times 10.3\ \text{mm}$ 。

本文以其聚焦后光强降至  $1/e$  作为系统的景深界限,当光强降至  $1/e$  后,细菌即不能正常激发获得荧光信号。由于激光器的入射激光对应的艾里斑较大,为  $30\ \mu\text{m}$  左右,而所需光斑大小为  $10\ \mu\text{m}$  左右;因此根据光斑扩束公式  $r=1.22\lambda f/D$ ,入射激光的中心波长为 476 nm,  $f$  焦距为 39 mm,为使得艾里斑的半径  $r$  为  $5\ \mu\text{m}$  左右,需使入射光束孔径  $D$  在 5 mm 左右。但实际激光器的光束孔径为 1.67 mm 左右,需要进行入射光束的扩束,将光束直径扩大 3 倍,从而调整光斑大小为  $10\ \mu\text{m}$  左右。在 Zemax 中对扫描透镜的景深进行模拟分析,其点扩散函数(Point Spread Function, PSF)中心截面的能量分布曲线如图 2 所示。其中,图(a)为 38.88 mm、距焦点 0.12 mm 的 PSF 图,图(b)为 38.9 mm、距焦点 0.1 mm 的 PSF 图,图(c)为 39.1 mm、距焦点 0.1 mm 的 PSF 图,图(d)为 39.11 mm、距焦点 0.11 mm 的 PSF 图。通过仿真分析,系统景深为 0.23 mm 左右。

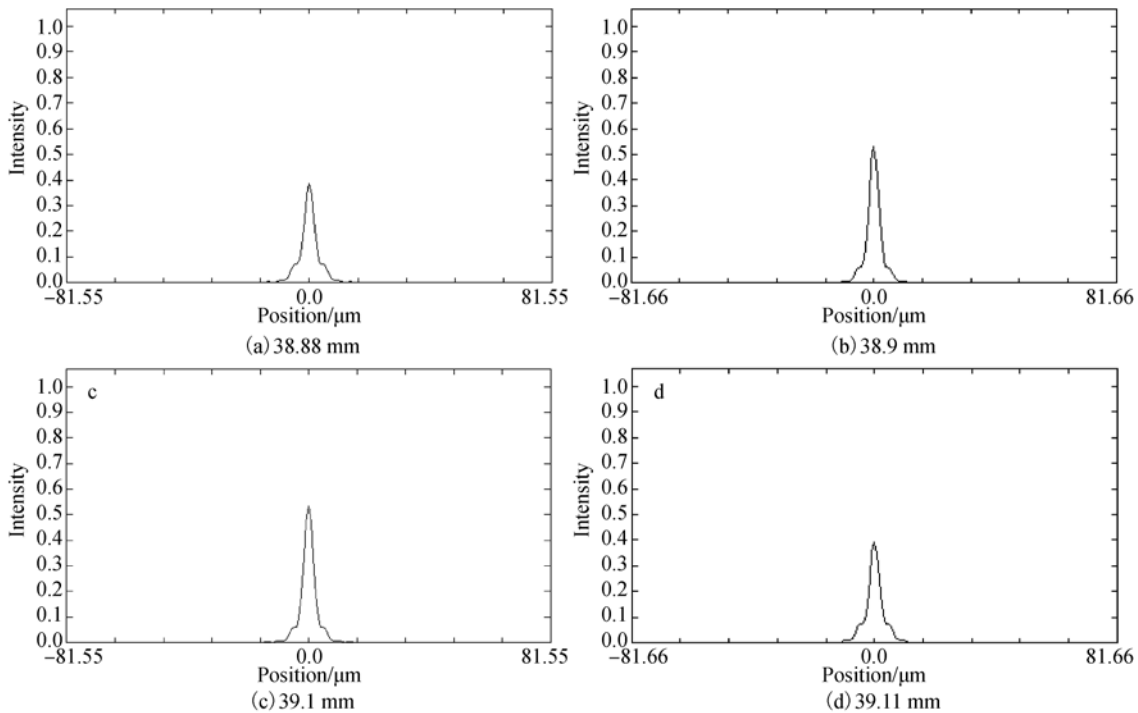


图 2 相对对准平面离焦不同距离的 PSF 图

Fig.2 PSFs at different positions

通过 Zemax 仿真得到扫描透镜的景深为 0.23 mm,在光路系统设计完成后进行系统的实际景深测量。用 3M 数字相机 DLC300 采集光斑图像,进行景深测定。测量中以 0.03 mm 为步长采集光斑图像,实测景深为 0.21 mm 左右,采集的实际光斑图像如图 3 所示。其中,第 2 行第 4 幅图像为对准平面位置的成像,此时成像最清晰;第 2 行第 2 幅图所成的弥散斑距离对准平面 0.12 mm,为远景平面,每幅图像相距 0.03 mm;第 4 行第 1 幅图所成的弥散斑距离相对零点 0.09 mm,为近景平面。远景平面和近景平面与对准平面的距离分别称为远景深度和近景深度,远景深度和近景深度之和为景深。光斑呈现由对准平面位置向远景平面和近景平面逐渐变模糊的过程,当弥散斑弥散较大时,成像模糊。

### 3.2 共焦孔设计

无共焦孔设计时,扫描透镜前后表面反射产生杂散光,杂散光在中心形成干扰斑,如图 4(a)所示,杂散光会对检测造成较大干扰。为了有效抑制杂散光信号,避免杂散光反射进入光路在中心形成干扰信号,影响成像质量,设计了共焦孔<sup>[14]</sup>。考虑到扫描透镜的焦距为 39 mm,选用直径为 20 mm,焦距为 70 mm 的透镜。透镜对荧光聚焦,共焦针孔位于焦点上,光斑直径为 10  $\mu\text{m}$ ,经激光激发所成像经透镜汇聚后聚焦成 20  $\mu\text{m}$  左右的信号,所以选用孔径大小为 0.03 mm 的共焦孔。放置共焦孔后,焦平面以上或以下的信号在穿过针孔时被挡住,有效滤除了干扰信号,此时采集的滤膜背景信号如图 4(b)所示,图中已无明显干扰斑。

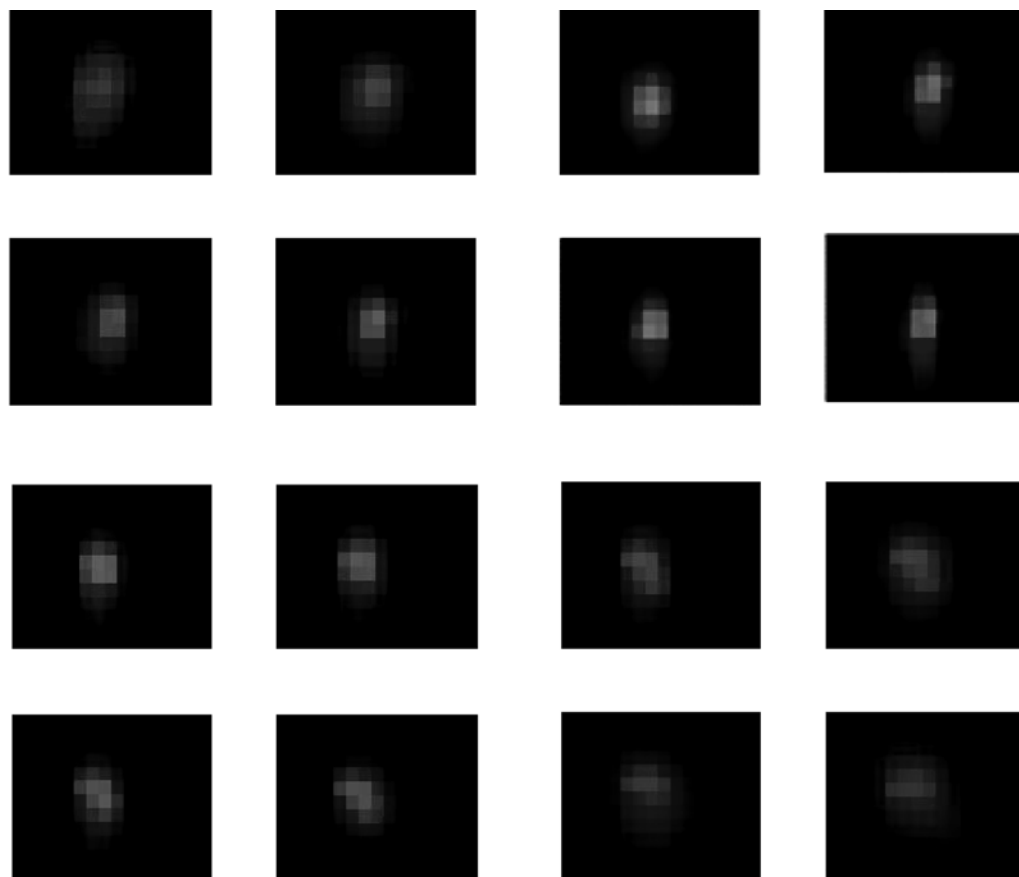


图 3 采集的光斑图像随位置的变化情况

Fig. 3 Variation of spots with positions

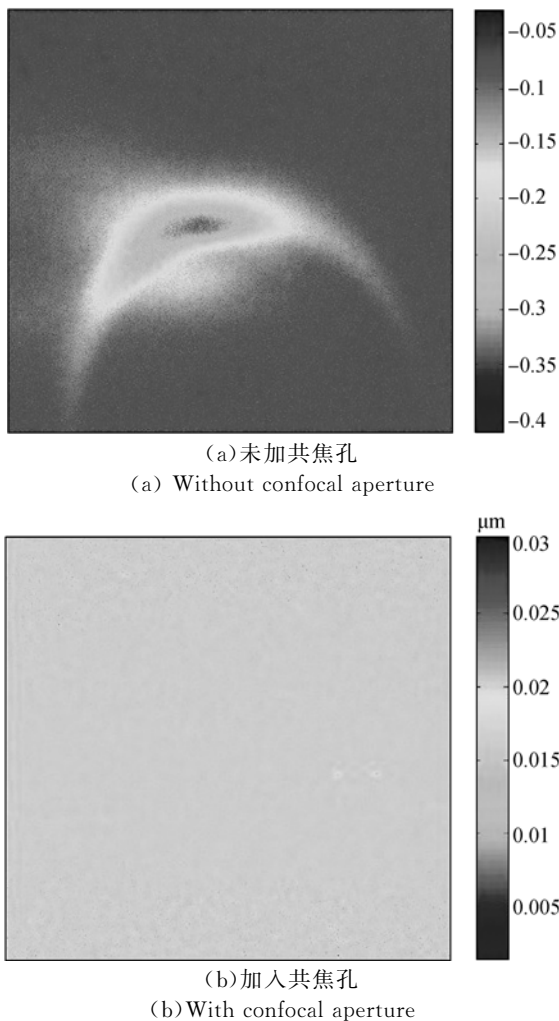


图 4 加共焦孔前后扫描空白滤膜所获的背景信号  
Fig. 4 Background signals received before and after adding cofocal apertures

## 4 扫描及一维信号分析

### 4.1 扫描分析

X、Y 方向振镜的控制电压为 0.8 V, 对应滤膜的扫描范围为 4 mm×4 mm, X 方向以 50 Hz, Y 方向以 0.05 Hz 频率扫描, 采集卡的采样速率为 500 kb/s, X 方向(行扫描)的扫描速度为 0.4 mm/s, 线扫描长度为 4 mm; Y 方向两条扫描线(场扫描)的间距为 4 μm, XY 方向的采样点数为 5 000×1 000, 在 4 mm 范围内横向空间采样点的间隔为 0.8 μm。光斑扫描样本图如图 5 所示, 聚焦 10 μm 的光斑, 在 X 方向振镜控制下形

成一条长为 4 mm 的横向扫描线, 而后沿 Y 方向以 4 μm 的步移扫描, 当光斑移动经过微生物时释放出荧光信号。聚焦光斑的选择主要取决于空间采样点数、细菌分布情况及细菌的尺寸。光斑如果太小, 在空间采样间隔较大的情况下, 对细菌采集的幅值信号很少, 难以与干扰信号区分; 而光斑太大又可能造成误检, 误检位置临近的多个细菌为一个。

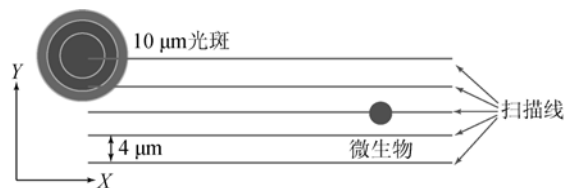


图 5 扫描样本示意图  
Fig. 5 Schematic of scanning process

### 4.2 采集一维信号分析

一维信号为入射激光强度与细菌直径分布的卷积, 其表达式为:  $y(n) = x(n) * h(n)$ , 其中  $x(n)$  为入射激光光强的分布函数。光束波面的振幅呈高斯型分布, 如图 6(a) 所示, 高斯光束的光斑延伸到无穷远, 其截面中心的振幅最大, 随着光束截面半径的增大, 振幅越来越小。  $h(n)$  为细菌直径对应函数, 为一矩形系列, 宽度随细菌直径的增大而增大, 如图 6(b) 所示。

$y(n)$  为两函数卷积所得的一维信号, 当细菌直径不同时, 矩形宽度不同, 所得的一维信号幅值以及半宽高也不同。图 6(c) 为卷积所获得的信号图, 大幅值曲线为  $h(n)$  宽度为 2 时的卷积曲线, 小幅值曲线为  $h(n)$  宽度为 1 时的卷积曲线。由图可知, 细菌直径越大, 对应  $h(n)$  宽度越大, 卷积后曲线信号越强, 宽度越大。光斑大小为 10 μm, 横向空间采样点间隔为 0.8 μm, 对于长为 2~3 μm 左右的大肠杆菌, 一维信号有 10 个左右的有效幅值信号; 而对于杂扰信号, 如背景荧光信号, 其有效幅值信号数通常低于 4 个。通过巴特沃斯低通滤波器进行一维信号的预处理, 可以滤除部分干扰信号, 实现对有效信号的提取。

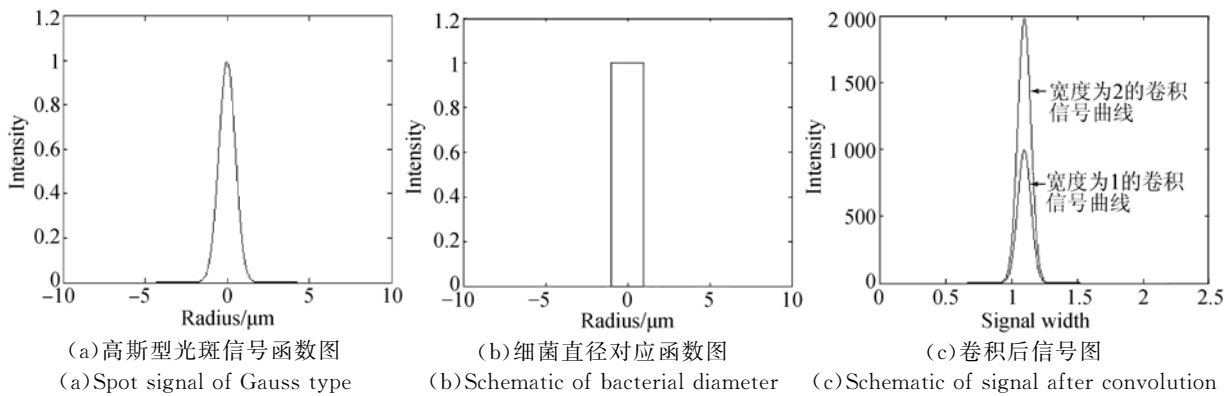


图 6 一维信号采集分析结果

Fig. 6 Results for one-dimensional signal acquisition

### 5 实验验证

#### 5.1 实验材料和方法

实验材料主要有:大肠杆菌(武警后勤学院提供),millipore 孔径为  $0.4\ \mu\text{m}$ ,直径为 13 mm 的黑色聚碳酸酯滤膜以及过滤器,life 品牌 SYTO9 荧光染料,Nikon 倒置荧光显微镜 TE2000。

首先取 5 mL 子弹头离心管,管内为已知浓度的细菌液,用 SYTO9 荧光染料染色,常温避光孵化 10 min,注射器吸取染色标记后的细菌液,通过  $0.4\ \mu\text{m}$  孔径滤膜过滤,截留细菌于滤膜上。将滤膜取下置于载玻片上,盖上盖玻片后置于系统平台下检测。

实验搭建的痕量微生物快速检测系统平台如图 7 所示。由于激光能量较强,对滤膜扫描时会



图 7 痕量微生物快速检测系统平台

Fig 7 Experiment platform of rapid trace microbial detection system

造成光漂白及扫描后滤膜上水分快速蒸干等现象,因此用衰减片对入射激光强度进行衰减。

#### 5.2 检测结果对比分析

荧光显微镜镜检法是目前常用的痕量生物检测方式<sup>[15]</sup>,因此本文通过对比荧光显微镜采集的图像,初步验证设计系统的检测结果的有效性。首先对微生物样本进行预处理,选用 SYTO9 荧光染料对大肠杆菌进行荧光标记,经滤膜过滤后,分别在微生物快速检测系统及荧光显微镜下观察两者的扫描结果,如图 8 所示。图中大团块为用于位置标记的标记物,清晰可见亮点为染色后的大肠杆菌,图中荧光显微镜所获得的细菌分布图像与痕量微生物快速检测系统扫描获得的细菌分布图像具有一致性,由此初步验证了设计系统的准确性。

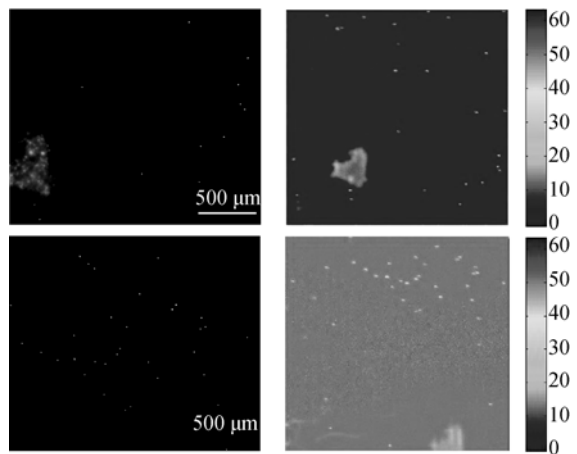


图 8 荧光显微镜与痕量微生物快速检测系统扫描对比图

Fig. 8 Comparison of detection results between fluorescence microscopy and rapid trace microbial detection system

### 5.3 不同浓度细菌的染色过滤检测

这里分别对浓度为  $10, 10^2, 10^3$  cfu/mL 大肠杆菌用 SYTO9 进行了染色及过滤,用量均为 1 mL。由于在样本液较少的情况下过滤较为困难,因此需要对样本液进行稀释,使溶液体积变大而细菌数量不变,实验显示体积稀释至 3 mL 左右能保证过滤、染料的冲洗以及细菌的较均匀分布。

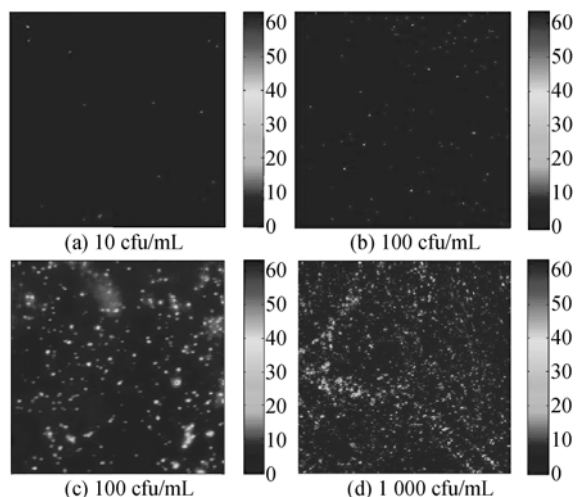


图 9 不同浓度细菌的扫描结果

Fig. 9 Detection results of bacteria in different concentrations

### 参考文献:

- [1] 鲁巍,王云,张晓健. 饮用水中几种细菌计数方法的比较[J]. 环境科学, 2004, 25(4): 167-169.  
LU W, WANG Y, ZHANG X J. Methods of enumeration of bacteria in drinking water[J]. *Environmental Science*, 2004, 25(4): 167-169. (in Chinese)
- [2] 徐尔尼,许杨,刘文群,等. 快速检测大肠菌群数的研究[J]. 南昌大学学报:理科版, 2001, 25(4): 339-343.  
XU E N, XU Y, LIU W Q, et al.. Study on the method of rapidly detection the number of coliforms [J]. *Journal of Nanchang University: Natural Science*, 2001, 25(4): 339-343. (in Chinese)
- [3] 刘弋青,吕维敏,刘魁武,等. 基于滤膜上细菌直接计数法的细菌总数快速检测[J]. 生物医学工程研究, 2009, 28(1): 60-62.  
LIU Y Q, LÜ W M, LIU K W, et al.. Rapid detection of total bacteria number by observing directly on filter [J]. *Biomedical Engineering Research*, 2009, 28(1): 60-62. (in Chinese)

过滤完成后,在检测系统下扫描获得的检测结果如图 9 所示,亮点代表细菌。由图中亮点数可知,扫描系统的检测浓度为  $10 \sim 10^3$  cfu/mL。

## 6 结 论

本文针对当前微生物检测中存在的耗时长、结构复杂、探测精度低的现状,提出了痕量微生物快速检测系统。通过结合荧光标记、微孔滤膜过滤和荧光成像技术设计痕量微生物快速检测系统,并构建了微生物快速扫描检测系统平台,完成了对微生物的快速成像检测。该系统采用大视场、大景深、长焦距的扫描透镜,可以在 10 min 内完成对  $10 \sim 2.5 \times 10^3$  cfu/mL 微生物的准确检测,检测下限为 10 cfu/mL。不过,该检测系统为单通道单路激光模式,仅支持一路激光扫描及检测,应用范围有限,下一步将设计多通道检测系统,添加两路以上的激光,以实现多重荧光标记与多参数探测,从而扩展该系统的应用范围,例如应用 LIVE/DEAD Baclight(包括 SYTO9 和 PI)进行活死菌的区分、细菌存活率实验等。同时,提高系统采样率,完成对系统的进一步优化及算法的设计,实现对细菌的自动计数检测。

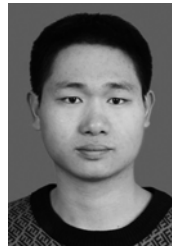
- [4] LIU X X, HUO ZH ZH, YUN H. Application of flow cytometry to rapid detection of bacteria[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(1): 161-168.
- [5] O K, A W, SB N, et al.. Bacteria detection by flow cytometry [J]. *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine*, 2008, 46(7): 947-953.
- [6] GUNASEKERA T S, ATTFIELD P V, VEAL D A. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk[J]. *Applied & Senviromental Microbiology*, 2000, 66(3): 1228-1232.
- [7] WILLIAM J, MACH R N, AMANDA R, et al.. Flow cytometry and laser scanning cytometry, a comparison of techniques [J]. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, 2010, 24: 251-259.
- [8] JONES D L, BRAILSFORD M A, DROCOURT J L. Solid-phase, laser-scanning cytometry: a new two-hour method for the enumeration of microorganisms in pharmaceutical water [J]. *Pharmaco-peial Forum*, 1999, 23: 7626-7645.
- [9] KARINE M G, GUILLET J G, CECILE B. Solid

- phase cytometry for detection of rare events[J]. *Cytometry*, 1997, 27: 336-344.
- [10] OSWALD J, JØENSEN B, POMPE T, *et al.*. Comparison of flow cytometry and laser scanning cytometry for the analysis of CD34+ hematopoietic stem cells[J]. *Cytometry Part A*, 2004, 57A(2): 100-107.
- [11] LIES M E, VANHEE H J. Nelis and tom coenye. detection and quantification of viable, airborne bacteria and fungi using solid-phase cytometry [J]. *Nature Protocols Recipes for Researchers*, 2009, 4(2): 224-231.
- [12] 芦起, 杨锡强, 余加林, 等. SYT09/PI 荧光探针标记 lasR rhIR 基因缺陷对铜绿假单胞菌生物膜形成影响的体外实验研究[J]. *中国微生物学杂志*, 2011, 23(6): 493-495
- LU Q, YANG X Q, YU J L, *et al.*. The quantitative analysis of sequential development of biofilm spatial structure *paeruginosa* lasR rhIR mutant tagged with green fluorescence protein[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2011, 23(6): 493-495.
- (in Chinese)
- [13] 梁鹏, 黄霞. 利用 LIVE/DEAD BacLight 染色测定活性污泥中的活菌水平[J]. *环境化学*, 2007, 26(5): 598-601.
- LIANG P, HUANG X. The LIVE/DEAD bac-light staining method for monitoring the level of live bacteria in activated sludge[J]. *Environmental Chemistry*, 2007, 26(5): 598-601. (in Chinese)
- [14] 周拥军, 陈德强, 黄文浩, 等. 共聚焦激光扫描荧光显微镜扫描系统研制[J]. *光学精密工程*, 2002, 10(6): 582-587.
- ZHOU Y J, CHENG D Q, HUANG W H, *et al.*. Development of the scanning system for confocal laser scanning fluorescence microscope[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2002, 10(6): 582-587. (in Chinese)
- [15] 闫雪, 姚卫蓉, 钱和. 国内外食品微生物快速检测技术应用进展[J]. *食品科学*, 2005, 26(6): 269-271
- YAN X, YAO W R, QIAN H. The development and application of food rapid microbial detection methods[J]. *Food Science*, 2005, 26(6): 269-271. (in Chinese)

#### 作者简介:



吴太虎(1962—),男,山西长治人,研究员,博士生导师,主要从事野战急救技术与装备系统集成方面的研究。E-mail: wutaihu@vip.sina.com



毛佳文(1990—),男,江西鹰潭人,硕士研究生,2013年于江西中医药大学获得学士学位,主要从事智能仪器方面的研究。E-mail: maojiawenlxc1314@sina.com

#### 通讯作者:



李抄(1983—),男,河北保定人,助理研究员,主要从事野战生物快速检验仪器与装备方面的研究。E-mail: nk\_lich@hotmail.com

(版权所有 未经许可 不得转载)