

利用 T₄ 快速检测 T₄ 宿主型大肠杆菌初探

刘邻渭¹, 杨公明², Mansel Griffiths³

(1 西北农林科技大学 食品学院, 陕西 杨凌 712100; 2 华南农业大学 食品学院, 广东 广州 510642;

3 Canadian Research Institute for Food Safety, University of Guelph, ON N1G2W1)

【摘要】【目的】建立一种定量检测噬菌体宿主菌的简捷方法。【方法】按体积比 1 : 9 将 4.4×10^9 pfu/mL 的 T₄ 工作液和已知活菌浓度的 T₄ 宿主型大肠杆菌工作液混合形成模拟样品, 立即在 37 °C 150 r/min 下作用 5 min 完成侵染, 接着采用离心、微滤分离技术清除样品中直径 0.22 μm 以下的物质(包括游离 T₄), 同时将颗粒物(包括受侵染的大肠杆菌)截留在微滤膜中。待受侵染大肠杆菌裂解后, 用 SM 缓冲液将子代 T₄ 从微滤膜中洗滤出来, 收集滤液得到转换样品。通过噬菌斑计数法测出转换样品子代 T₄ 数量, 分析其与模拟样品 T₄ 宿主型大肠杆菌活菌数量的定量关系。【结果】模拟样品 T₄ 宿主型大肠杆菌活菌数的对数和转换样品子代 T₄ 数量的对数呈一元线性关系; 参试菌株和试验条件决定着方程的斜率和截距。【结论】按照上述方法转换样品, 并根据转换样品子代 T₄ 数量和上述一元线性关系, 可以快速测定样品中 T₄ 宿主型大肠杆菌的活菌含量。

【关键词】 大肠杆菌; T₄ 噬菌体; 定量检测

【中图分类号】 R155.5; R378.2⁺1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2008)12-0181-06

Initial detection of T₄ host *E. coli* based on sample transformation

LIU Lin-wei¹, YANG Gong-ming², Mansel GRIFFITHS³

(1 College of Food Sci-Tech, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou, Guangdong 510642, China;

3 Canadian Research Institute for Food Safety, University of Guelph, ON N1G2W1, Canada)

Abstract: 【Objective】 A simple and fast method was investigated for quantitative detection of phage host. 【Method】 The T₄ suspension of 4.4×10^9 pfu/mL and the T₄-host *E. coli* suspension of known CFU were mixed by 1 : 9 (V/V) to make a simulated sample. It was immediately incubated at 37 °C with 150 r/min for 5min to complete infection. Then the substances smaller than 0.22 μm, including free T₄s, were separated by supercentrifugation and millipore filtration. Meanwhile, the particulates, including infected *E. colis*, were trapped in the syringe filter. After the *E. colis* lysed, the progeny T₄s were eluted out from the filter by SM buffer to get derivative sample. Then progeny T₄s were quantitated by plaque counting, and the quantitative relationship between the numbers of the alive T₄-host *E. colis* in the simulated sample and the progeny T₄s in the derivative sample was analyzed. 【Result】 The logarithm of the progeny T₄ number was linear correlated with the logarithm of the T₄ host number, shown as an equation of linear regression. The slope rate and the intercept of the equation depended on the tested *E. coli* strain and the experimental conditions. 【Conclusion】 Transforming the sample with the method mentioned above, and relying on the progeny T₄ number in the derivative sample and the linear relationship, the alive T₄-host *E. coli* in the sample can be fast enumerated.

Key words: *E. coli*; T₄; quantitative detection

* [收稿日期] 2007-12-07

[作者简介] 刘邻渭(1953—), 男, 河南伊川人, 教授, 博士, 主要从事食品化学、食品检验和食品安全研究。

近年来,大肠杆菌被重申为权威的水源和食品污染指示菌^[1-2],其较大肠菌群能更恰当地指示粪便的污染程度。由于经典的大肠杆菌检测方法^[3]和常用的大肠杆菌快速检测方法分别需要耗时 48 和 24 h 以上^[3-4],所以利用现代细菌检测技术研究建立更快的检测方法一直是一个热门课题^[5]。利用噬菌体技术检测细菌是现代细菌检测技术之一^[6],Funatsu 等^[7]研究使用生物发光噬菌体检验大肠杆菌,可在 6 h 内得到检测结果。Neufeld 等^[8]研究使用噬菌体裂解产物分析技术检验大肠杆菌,可在 6~8 h 内得到检测结果。Yasunori 等^[9]提高了生物发光噬菌体技术检验大肠杆菌的速度,可在 1 h 内给出检测结果。Neufeld 等^[10]研究使用噬菌粒并通过表达碱性磷酸酶来检测大肠杆菌,可在 3 h 内检出结果。Masahito 等^[11]和 Awais 等^[12]也分别构建了不同的快速检测大肠杆菌 O157:H7 的发光噬菌体技术。这些方法的优点是特异性高、速度快,缺点是要使用构建难度大、造价高及侵染力和繁殖力可能受到不良影响的基因工程噬菌体;另外,这些方法依赖荧光强度的测定进行定量检测或利用荧光显微计数进行靶细菌计数,故检测的精密度受样品复杂性和均匀性的影响较大。因此,建立低成本、高精度、快速、方便的利用噬菌体技术检测大肠杆菌的方法,仍是今后研究的重要方向。

本研究以 T4 噬菌体侵染模拟样品中的 T4 宿主型大肠杆菌,以离心-微滤技术清除侵染后样品中的游离 T4 和可溶性杂质,以微滤技术分离颗粒性杂质和子代 T4,以噬菌斑计数法测定子代 T4 的数量,通过回归分析和理论分析,确定了模拟样品中 T4 宿主型大肠杆菌和子代 T4 的定量关系,初步建立了利用天然 T4 噬菌体和常规试验设备,并且不需要任何特殊试剂的快速检验 T4 宿主型大肠杆菌的方法,以期为大肠杆菌及其他细菌的快速检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料有 T4 噬菌体(ATCC 11303-B4TM)、大肠杆菌 B(*E. coli* B)(ATCC 11303)、大肠杆菌 AMC 198(*E. coli* AMC 198)(ATCC 11229)、大肠杆菌 K12(*E. coli* K12)(ATCC 23716)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)(ATCC 13525TM)、付氏柠檬酸细菌(*C. Froundii*)(CRIFS c881)等,均由加拿大食品安全研究所提供。

LB 肉汤(Fisher, Cat No. BP1426-2)、LB 琼脂(Fisher, Cat No. BP1425-2)、SM 缓冲液(Krackeler Sci, Cat No. 17-3070-044),均按使用说明加水配制和灭菌。

顶层 LB 琼脂由等体积 LB 肉汤和 LB 琼脂混合,分装在试管中,按照 LB 琼脂相同的灭菌方法灭菌。

0.01 mol/L MgSO₄ 水溶液,配制后在 121 °C 下湿热作用 15 min 灭菌。

PES 注射式膜组件,直径 33 mm,孔径 0.22 μm (Millipore Millex * GP Cat No. SLGP 033RS)。

MC 注射式膜组件,直径 47 mm,孔径 0.20 μm (Gelman Sciences Inc. Product No. 66234),使用前剪成 33 mm 直径的膜片,装入 33 mm 内径的膜套,用铝箔裹住,在 121 °C 下减压干热 20 min 灭菌。

1.2 试验方法

1.2.1 大肠杆菌工作液的制备 挑取参试大肠杆菌的单个菌落,接种于 15 mL LB 肉汤,37 °C 下摇瓶培养过夜,用 0.01 mol/L MgSO₄ 水溶液连续多次 10 倍稀释,得到大肠杆菌活菌浓度分别是培养液浓度 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ 和 10⁻⁷ 倍的系列稀释液,各取少许进行活菌浓度测定,其余的于 0 °C 保存,使用期为 3 h。另以 0.01 mol/L MgSO₄ 水溶液作为活菌浓度为零的大肠杆菌工作液。

1.2.2 其他细菌工作液的制备 挑取参试非大肠杆菌细菌的单个菌落,接种于 15 mL LB 肉汤,在最适生长温度下(荧光假单胞菌为 30 °C,付氏柠檬酸细菌为 37 °C)摇瓶培养过夜,用灭菌水连续多次 10 倍稀释,得到参试菌活菌浓度分别是培养液浓度 10⁻⁵, 10⁻⁶ 和 10⁻⁷ 倍的系列稀释液,各取少许进行活菌浓度测定,其余的于 0 °C 保存,使用期为 3 h。另以灭菌水作为活菌浓度为零的非大肠杆菌细菌工作液。

1.2.3 T4 工作液的制备 用 SM 缓冲液将 T4 贮备液连续 2 次 10 倍稀释,得到 T4 滴度分别是贮备液滴度 10⁻¹ 和 10⁻² 倍的 2 种稀释液,各取少许进行 T4 计数,其余的于 4 °C 保存。使用期为 15 d。

1.2.4 活菌数的测定 参照平板菌落计数法^[13]进行。

1.2.5 T4 计数 参照噬菌体的效价测定^[13]进行。

1.2.6 转换样品的制备 在无菌操作条件下,将 800 μL LB 肉汤、100 μL 参试菌工作液和 100 μL T4 工作液(4.4 × 10⁹ pfu/mL),于 1.5 mL 无菌试管中混合作为模拟样品,立即转入摇床在最适生长

温度和 150 r/min 条件下培养 5 min,接着于 13 000 r/min离心 2 min,弃去上清液,沉淀物重新分散在 1 mL LB 肉汤中,再以同样的离心-重新分散操作处理 2 次。将最终重新分散液转入注射式微滤膜组件,用 90 mL LB 肉汤冲洗滤膜中样品并弃去滤液,将已受侵染的参试菌截留在膜组件中。将膜组件在参试菌最适生长温度下保温 90 min,并凭借残留在膜组件中的 LB 肉汤提供营养,使受侵染菌裂解产生子代 T4。最后用 10 mL SM 缓冲液洗脱膜组件中的子代 T4,收集滤液即为转换样品。

按照上述方法,当使用的参试菌工作液活菌浓度为零时,所得的转换样品为空白转换样品;当使用的参试菌株相同,参试菌工作液的活菌浓度依次 10 倍递增,并且其他试验条件完全一致时,所得的各转换样品即为系列转换样品;当改变使用的参试菌株、膜组件和/或膜组件中残留的 LB 肉汤(作为受侵染大肠杆菌完成其产生子代 T4 生理功能的营养供给物)量时,就制得了不同系列的转换样品。每一系列转换样品制成后立即进行 T4 计数。

表 1 模拟样品中 T4 宿主型大肠杆菌活菌数和转换样品中的子代 T4 噬菌体数

Table 1 Numbers of alive T4 infective *E. coli* in simulated samples and progeny T4 in derivative samples

系列 试验号 Number of serial experiment	参试菌株 Tested strain	膜组件 Usedfilter	LB 残留 LB residue	系列模拟样品中参试菌活菌数/cfu Number of tested strain in serial simulate samples				系列转换样品中子代 T4 数量/pfu Number of progeny T4 in serial derivative samples			
				S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
1	<i>E. coli</i> B	PES	少量 SA	75	750	7 500	—	1 450	15 050	78 880	—
2	<i>E. coli</i> B	MC	较多 MA	92	920	9 200	—	32 800	66 500	547 500	—
3	<i>E. coli</i> B	MC	少量 SA	20	200	2 000	—	2 250	3 450	12 780	—
4	<i>E. coli</i> K 12	MC	少量 SA	22	224	2 240	—	2 100	3 150	5 600	—
5	<i>E. coli</i> AMC 198	MC	少量 SA	154	1 540	15 400	154 000	7 200	26 700	144 700	457 700

注:(1)S₁、S₂、S₃、S₄ 指同一系列试验中不同样品的编号;(2)“少量”指膜上自然吸附的 LB 肉汤量;(3)“较多”指膜上自然吸附上加膜组件顶隙中保留的 LB 肉汤量。

Note:(1)S₁、S₂、S₃、S₄ are the different exp. numbers of a serial experiment. (2)“SA” means small amount of LB broth which equals to the membrane physio-absorbed amount. (3)“MA” means more amount of LB broth which equals to the membrane physio-absorbed amount plus the amount in the cupular space of the filter.

根据表 1 中各系列试验的试验数据,用 1.2.9 的方法建立的一元线性回归方程依次为:

$$Y_1 = 1.5836 + 0.8678X_1, (r = 0.9952); (1)$$

$$Y_2 = 3.2120 + 0.6137X_2, (r = 0.9651); (2)$$

$$Y_3 = 2.7977 + 0.3772X_3, (r = 0.9596); (3)$$

$$Y_4 = 3.0249 + 0.2121X_4, (r = 0.9948); (4)$$

$$Y_5 = 2.5107 + 0.6144X_5, (r = 0.9976). (5)$$

式中:Y_i 为系列试验中转换样品子代 T4 数量的常用对数预测值,X_i 是模拟样品中 T4 宿主型大肠杆菌活菌数的常用对数值。

应用双侧检验,在 α=0.1 的检验水准上,方程(1)、(4)和(5)的相关系数都大于临界值(0.988);在

1.2.7 模拟样品参试菌活菌数的确定 配制模拟样品时,将参试菌工作液的活菌浓度和其体积相乘,所得的积即为模拟样品中参试菌的活菌数。

1.2.8 转换样品子代 T4 数量的确定 转换样品中的 T4 数量减去相应空白转换样品中的 T4 数量,即可得到转换样品中的子代 T4 数量。

1.2.9 *E. coli* 和 T4 数量关系的推求 对模拟样品中 T4 宿主型大肠杆菌的活菌数和转换样品中子代 T4 的数量分别取对数,用回归分析方法进行回归,建立二者之间的一元线性回归方程,并用相关系数检验所得方程的可靠性^[14]。

2 结果与分析

2.1 模拟样品中 T4 宿主型大肠杆菌活菌数和转换样品中子代 T4 数量的关系

选用不同的 T4 宿主型大肠杆菌、膜组件和膜组件中的 LB 肉汤残留量,按照 1.2 的方法共进行 5 个系列试验,具体参试菌株、试验条件和试验结果如表 1 所示。

α=0.05 水准上,方程(5)的相关系数略大于临界值(0.997)。应用单侧检验,在 α=0.1 水准上,以上 5 个回归方程的相关系数都大于临界值(0.951);在 α=0.05 水准上,方程(1)、(4)和(5)的相关系数都大于临界值(0.988)。由于转换样品中的子代 T4 显然不可能因样品中 T4 宿主型大肠杆菌的增多而减少,所以应用单侧检验更为合理,其检验结果初步说明模拟样品 T4 宿主型大肠杆菌活菌数的对数与转换样品子代 T4 数量的对数呈一元线性关系。

以上 5 个系列试验采用的基本试验方法以及膜孔径和膜面积几乎完全相同。系列试验 1,2,3 的参试菌株也相同,所以方程(1)、(2)、(3)间差别显然是

由于膜材料、膜组件的构造和膜组件内 LB 肉汤残留量的差异造成的。方程(1)的相关系数相对更高的原因是由于系列试验 1 所用的 PES 膜组件的顶隙小且透明,因此其中残留 LB 肉汤量的精密度控制得最高所致。方程(1)比方程(2)和(3)的截距小而斜率大,这可能是由于 PES 膜组件较 MC 膜组件的顶隙小且其对 T4 的吸附力更小所致。方程(2)比方程(3)的截距和斜率值高,显然是由于系列试验 2 膜组件内的 LB 肉汤残留量较试验 3 更高,因而系列试验 2 较试验 3 提供给受感染大肠杆菌的营养物质更多所致。系列试验 3,4,5 除了参试菌株不同外,其他试验条件皆相同,所以方程(3)、(4)、(5)间的相互差异显然是由于参试菌株不同造成的。可以看出,菌株不同主要影响回归曲线的斜率,其中 *E. coli* AMC 198 是一个抗逆性强的菌株,这可能正是方程(5)的斜率最大的主要原因。另外,方程(5)的相关系数相对最高,极可能与系列试验 5 包含的试验样本量最大有关。

2.2 线性关系的成立条件和影响因素分析

当选定任意 1 株 T4 宿主型大肠杆菌进行试验时,由于样品转换中采用了 4.4×10^8 pfu/mL 的 T4 进行摇瓶感染,其极高的滴度可以保证 T4 宿主型大肠杆菌能被完全感染^[15]。所以在一次样品转换中,每个 T4 宿主型大肠杆菌产生子代 T4 的数量可视为相同,模拟样品 T4 宿主型大肠杆菌的数量和转换样品子代 T4 的数量间应为正比例关系。

若用 k 表示该正比例系数,固定参试菌株和样品转换方法, k 值就固定不变;若改变参试菌株时,菌株产生子代 T4 的固有能力强, k 值就越大。但表 1 的试验数据说明,即使同一系列试验中不同试验的参试菌株和样品转换方法已经固定,由参试大肠杆菌活菌含量 10 倍递增的系列模拟样品转换得到的系列转换样品中,其子代 T4 的含量比并不是 10 倍递增。

如果考虑到每个受感染的大肠杆菌所能产生的子代 T4 的数量还与供给的营养有关,这一现象就可得到合理解释。这是因为在样品转换中,受感染大肠杆菌的营养供给量,是由膜组件中 LB 肉汤的残留量和微生物(它们都在竞争性地消耗总营养)的数量决定的,在肉汤残留量有限和其他微生物数量不变的情况下,每个受感染大肠杆菌平均得到的营养以及所能产生的子代 T4 数量就必然均与受感染大肠杆菌的数量成反比例关系。本研究用一个函数 $F(aN/x)$ 表示营养产生的影响,并称其为营养因

子,式中 N 为提供给受感染大肠杆菌的总营养, x 为受感染大肠杆菌的个数,其等于模拟样品中 T4 宿主型大肠杆菌的数量, a 表示参试大肠杆菌的种类。当 $N/x=1$ 时,营养因子就变成成为 $F(a)$,其表示 1 单位营养对 1 个已受感染大肠杆菌所能够产生 T4 数量的影响。当 N 保持一定而 x 增加 u 倍时,营养因子就应该降低 q 倍。所以设立营养因子就可正确表示上述的反比例关系。

另外,受感染大肠杆菌和子代 T4 在样品转换过程中的操作损失,也是影响转换样品子代 T4 数量的重要因素。然而,当样品转换方法固定时,这些因素的影响也是固定的。设样品转换中未丢失的受感染大肠杆菌占模拟样品中 T4 宿主型大肠杆菌的比例为 n ,最终被收集到的转换样品中子代 T4 的数量占样品转换中全部产生的子代 T4 数量的比例为 m ,则模拟样品中 T4 宿主型大肠杆菌和转换样品中子代 T4 数量的关系可表示为:

$$y = nmk x F(aN/nx). \quad (6)$$

式中: y 为转换样品中子代 T4 的数量, x 为模拟样品中 T4 宿主型大肠杆菌的数量。

由于前述的每一个系列试验都满足 n, m, k, a 和 N 为定值的条件,所以该式对其都成立,只不过在不同的系列试验中, n, m, k, a 和 N 不完全相同。

设在任何 1 个 3 样本的系列试验中,3 个模拟样品中的 T4 宿主型大肠杆菌的活菌数分别为 $x_1 = x, x_2 = ux$ 和 $x_3 = u^2x$ (u 为任一正数),对应的 3 个转换样品的子代 T4 数量分别是 y_1, y_2 和 y_3 。那么,该系列试验里相邻的模拟样品中 T4 宿主型大肠杆菌活菌数的对数差,以及对应的相邻转换样品中子代 T4 数量的对数差可分别表示为:

$$\lg x_2 - \lg x_1 = \lg ux - \lg x = \lg u, \quad (7)$$

$$\lg x_3 - \lg x_2 = \lg u^2x - \lg ux = \lg u, \quad (8)$$

$$\lg y_2 - \lg y_1 = \lg [nmkuxF(aN/nux)] - \lg [nmkxF(aN/nx)] = \lg u +$$

$$\lg F(aN/nux) - \lg F(aN/nx) = v, \quad (9)$$

$$\lg y_3 - \lg y_2 = \lg [nmku^2xF(aN/u^2x)] - \lg [nmkuxF(aN/ux)] = \lg u + \lg F(aN/nu^2x) - \lg F(aN/nux) = v'.$$

上面 4 个式子中,(7)式和(8)式表示在所设计的系列试验中,系列模拟样品中 T4 宿主型大肠杆菌活菌数的对数是等差序列;(9)式和(10)式表示对应的相邻两个转换样品中子代 T4 数量的对数差。如果可以证明这两个差值相等,即 $v = v'$,那么,系列转换样品中子代 T4 数量的对数也是等差序列。又由

于 $x \rightarrow 0$ 时必然有 $y \rightarrow 0$, 所以当 x 以任一正数倍连续改变时, $\lg x$ 和 $\lg y$ 总是起点均趋近于 $-\infty$ 的 2 个等差序列, 也就是说模拟样品 T4 宿主型大肠杆菌活菌数的对数和转换样品子代 T4 数量的对数一定是一元线性关系。

证明:

$$\begin{aligned} v - v' &= \lg u + \lg F(aN/nux) - \lg F(aN/nx) - \\ &[\lg u + \lg F(aN/nu^2x) - \lg F(aN/nux)] = \\ &2\lg F(aN/nux) - \lg F(aN/nx) - \lg F(aN/nu^2x) = \\ &\lg \{ [F(aN/nux)]^2 / [F(aN/nx)F(aN/nu^2x)] \} = \\ &\lg \{ [F(aN/nx)/q]^2 / [F(aN/nx)F(aN/nx)/q^2] \} = \\ &\lg 1 = 0. \end{aligned}$$

证毕。

所以, 只要样品中仅含 1 株 T4 宿主型大肠杆菌, 并且保持样品转换方法和操作稳定(即 n, m, k, a 和 N 保持恒定), 那么样品中 T4 宿主型大肠杆菌活

表 2 模拟样品中非 T4 宿主菌的活菌数量和转换样品中子代 T4 的数量

Table 2 Numbers of alive non-T4-host bacteria in simulated samples and progeny T4 in derivative samples

系列试验号 Number of serial experiment	参试菌 Tested bacterium	系列模拟样品中参试非 T4 宿主菌的活菌数 Number of alive non-T4 -host bacterium in serial simulate samples			系列转换样品中子代 T4 的数量 Number of progeny T4 in serial derivative samples		
		S ₁	S ₂	S ₃	S ₁	S ₂	S ₃
6	<i>P. fluorescens</i>	32	320	3 200	-150	300	-450
7	<i>C. Froundii</i>	64	637	6 370	-1 800	-200	300

从表 2 可以看出, 由非 T4 宿主菌配制的系列模拟样品在进行样品转换时, 系列转换样品中子代 T4 的数量是围绕着零波动的随机数。这种随机波动源于试验中的随机误差, 因为这些细菌在试验中不会真正产生子代 T4, 但这并不是说其不会干扰受侵染的大肠杆菌产生子代 T4, 因为若样品中有这些细菌, 那它们就会与受侵染的大肠杆菌争夺营养, 从而降低 N 值。只不过当样品给定时这种影响就是一定的, 实际上相当于换了个了 N 值。因此, 样品 T4 宿主型大肠杆菌活菌数的对数和转换样品子代 T4 数量对数间的一元线性关系, 并不会因之而改变。

2.4 实际样品测定方法的设计

将欲检测的 T4 宿主型大肠杆菌的纯培养液, 稀释成活菌浓度 10 倍递增的系列标准工作液, 分别等体积加入到几份等体积的待测样品中, 形成的加标样品系列经过完全相同的试验方法平行进行样品转换。用噬菌斑计数法测出系列转换样品中子代 T4 的数量, 然后以加标样品中加入的 T4 宿主型大肠杆菌活菌数的对数为横坐标(x 轴), 以转换样品中子代 T4 的对数为纵坐标(y 轴)作图, 将所得的直

菌数的对数和转换样品中子代 T4 数量的对数呈一元线性关系。这和本文 2.1 中通过试验数据回归分析得出的结果一致。

参试的 T4 宿主型大肠杆菌菌株变更时, k 和 a 将发生变化, 所以对应的线性关系必有所变化。但是, 若以代表性 T4 宿主型大肠杆菌菌株作为参试菌株来建立回归方程, k 和 a 就可视为常数, 从而解决了实际样品中可能含有多株 T4 宿主型大肠杆菌所带来的问题。

2.3 其他细菌对测定的影响

其他细菌是指各种非 T4 宿主菌。为了考察它们对测定 T4 宿主型大肠杆菌的影响, 本研究分别用荧光假单胞菌和付氏柠檬酸细菌作为参试菌, 按照 1.2 的方法共进行 2 个系列试验, 试验采用的膜组件皆为 MC, 膜组件中的 LB 肉汤残留量皆为膜上自然吸附的 LB 肉汤量, 试验结果见表 2。

线外推, 其与横坐标轴交点的 x 值的绝对值的反对数, 即是待测样品中 T4 宿主型大肠杆菌的活菌数。

利用这种方法进行测定时, 样品转换需 2 h, 测定转换样品中子代 T4 数量需 7 h。如果采用实时 PCR 代替噬菌斑计数, 则测定转换样品中子代 T4 数量仅需 1~1.5 h^[16]。

批量和在线检测往往以监控样品中靶细菌含量的动态变化为目的, 如果使用靶细菌的噬菌体进行样品转换并测定转换样品中子代噬菌体的含量, 就可以直接以它的动态变化来表示靶细菌含量在样品中的动态变化。因此可以预见, 此类检验的实际方法还可进一步简化。

3 结 论

采用高滴度的 T4 迅速完成对样品中 T4 宿主型大肠杆菌的侵染, 使用离心-微滤分离技术清除侵染过后样品中的游离 T4 和杂质; 待受侵染的大肠杆菌裂解后, 使用微滤技术进一步清除样品中的杂质并得到相当纯净的转换样品; 然后采用噬菌斑计数法测出转换样品中子代 T4 的数量后, 根据样品中 T4 宿主型大肠杆菌活菌数的对数和转换样品中

子代 T4 数量的对数呈一元线性关系,就可快速求得样品中 T4 宿主型大肠杆菌的活菌数。该方法要求的技术条件较其他利用噬菌体检验宿主菌方法要求的技术条件更为简单,而且采用任意一种烈性噬菌体都可套用此方法测定其宿主菌的含量,所以预计该方法的适用范围更为广泛。

[参考文献]

- [1] World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality (Vol. 1) [M]. 3rd Edition. Gellvea, Switzerland: WHO, 2004;284.
- [2] 中华人民共和国卫生部,国家标准化管理委员会. GB 5749—2006 生活饮用水卫生标准 [S]. 北京:中国标准出版社, 2006.
People's Republic of China Ministry of Health, State Commission for Administration of Standardization. GB 5749—2006 Hygiene standard of drink woter [S]. Beijing; Standards Press of China, 2006. (in Chinese)
- [3] 中华人民共和国国家进出口商品检验局. SN 0169—1992 出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检验方法 [S]. 北京:中国标准出版社, 1992.
People's Republic of China Import and Export Commodity Inspection Bureau. SN 0169—1992 Method for examination of *Coliform*, *Fecal coliform* and *Escherichia coli* in food for export [S]. Beijing; Standards Press of China, 1992. (in Chinese)
- [4] 中华人民共和国国家进出口商品检验局. SN 0333—1994 出口食品中大肠杆菌(葡萄糖苷酶荧光)检验方法 [S]. 北京:中国标准出版社, 1994.
People's Republic of China Import and Export Commodity Inspection Bureau. SN 0333—1994 Method for inspection of *Escherichia coli* in food for export -Fluorescence measurement of glucosidase [S]. Beijing; Standards Press of China, 1994. (in Chinese)
- [5] Annie R, Pierre S, Julia B, et al. Detection and enumeration of coliforms in drinking water; current methods and emerging approaches [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 49 (1): 31-54.
- [6] Richard J M, Tim W M. Phage as a diagnostic—the use of phage in TB diagnosis [J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2001, 76(10): 683-688.
- [7] Funatsu T, Taniyama T, Tajima T, et al. Rapid and sensitive detection method of a bacterium by using a GFP reporter phage [J]. *Microbiol Immunol*, 2002, 46(6): 365-369.
- [8] Neufeld T, Schwartz-Mittelmann A, Biran D, et al. Combined phage typing and amperometric detection of released enzymatic activity for the specific identification and quantification of bacteria [J]. *Anal Chem*, 2003, 75(3): 580-565.
- [9] Yasunori T, Chiaki F, Suk-Hyun N, et al. *Escherichia coli* detection by GFP-labeled lysozyme-inactivated T4 bacteriophage [J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 114(10): 11-20.
- [10] Neufeld T, Mittelman A S, Buchner V, et al. Electrochemical phagemid assay for the specific detection of bacteria using *Escherichia coli* TG-1 and the M13KO7 phagemid in a model system [J]. *Anal Chem*, 2005, 77(2): 652-657.
- [11] Masahito O, Masatomo M, Hajime U, et al. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by using green fluorescent protein-labeled PP01 bacteriophage [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2004, 70, (1): 527-534.
- [12] Awais R, Fukudomi H, Miyanaga K, et al. A recombinant bacteriophage-based assay for the discriminative detection of culturable and viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Biotechnol Prog*, 2006, 22(3): 853-859.
- [13] 杨革. 微生物学实验教程 [M]. 北京:科学出版社, 2004.
Yang G. Guide microbiology experiment [M]. Beijing; Science Press, 2004. (in Chinese)
- [14] 邓勃. 数理统计方法在化学分析中的应用 [M]. 北京:化学工业出版社, 1981.
Deng B. Mathematical statistical methods in the chemical analysis [M]. Beijing; Chemical Industry Press, 1981. (in Chinese)
- [15] 刘邻渭, Griffiths M, 杨公明. 根据噬菌体检验寄主菌方法的感染条件研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2008, 29(4): 307-310.
Liu L W, Griffiths M, Yang G M. Ensuring infection condition of bacteria detection based on bacteriophage [J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2008, 29 (4): 307-310. (in Chinese)
- [16] 刘邻渭, 杨公明. 子代 T4 的 PCR 和 real time PCR 测定 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(8): 1374-1377.
Liu L W, Yang G M. Quantification of progeny T4 by PCR and real time PCR [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2007, 17(8): 1374-1377. (in Chinese)