

基于多波长透射光谱的水体细菌生长阶段特征参数反演研究

胡玉霞^{1,2,3}, 赵南京^{1,3}, 甘婷婷^{1,3}, 段静波^{1,3}, 刘建国^{1,3}, 刘文清^{1,3}

¹中国科学院环境光学与技术重点实验室, 中国科学院安徽光学精密机械研究所, 安徽 合肥 230031;

²中国科学技术大学, 安徽 合肥 230026;

³安徽省环境光学监测技术重点实验室, 安徽 合肥 230031

摘要 研究细菌的生长规律,快速获取细菌在生长过程中浓度、结构、化学组分等特征参数的变化,能够为环境评估、微生物研究等领域的细菌快速检测提供依据。采用紫外-可见分光光度法测定水体常见大肠埃希氏菌(大肠杆菌)在生长过程中 240~900 nm 波段的透射光谱,基于 Mie 散射理论对测量得到的可见光波段的透射光谱进行解析,得到细菌的浓度和大小等信息;以核酸、发色团氨基酸吸收特性为基础,根据细菌紫外吸收光谱计算了细菌的核酸含量。结果表明:通过透射光谱反演出的参数能够反映细菌在生长过程中浓度、大小和化学组分的变化,这些变化表明大肠杆菌在适宜的生长条件下经历了不同的生长时期,符合细菌生长规律。多波长透射光谱技术可以对细菌在生长过程中进行动态跟踪检测,获得细胞形态学和化学组分信息,为研究细菌多参数测量提供了一种新方法。

关键词 生物光学; 光谱学; Mie 散射; 多波长透射光谱; 细菌检测; 细菌生长

中图分类号 O433.4

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0207023

Growth Stages Characteristic Parameters of Bacteria in Water Based on Multi-Wavelength Transmission Spectra

Hu Yuxia^{1,2,3}, Zhao Nanjing^{1,3}, Gan Tingting^{1,3},
Duan Jingbo^{1,3}, Liu Jianguo^{1,3}, Liu Wenqing^{1,3}

¹Key Laboratory of Environment Optics and Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031, China;

²University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China;

³Anhui Key Laboratory of Environment Optical Detection Technology, Hefei, Anhui 230031, China

Abstract Research on the laws of bacterial growth and rapid acquisition of the changes in concentration, structure and chemical composition of bacterial cells can provide evidence for fast bacterial detection in environmental assessment and microbiological research fields. The transmission spectra in the region of 240-900 nm of *Escherichia coli* suspension during growth are recorded by ultraviolet-visible spectrophotometry. The measured transmission spectra in the visible regions are interpreted based on Mie scattering theory, and the information of concentration and size of bacteria during growth are acquired. According to the ultraviolet absorption spectra of bacteria, the nucleic acid content is calculated with the absorption characteristics of chromophore amino acid and nucleic acid. The results show that the parameters interpreted from the spectra can reflect changes in concentration, size and chemical composition of bacteria during growth. These changes demonstrate that *Escherichia coli* cells undergo different growth stages under suitable growth condition, which is consistent with the laws of bacterial growth. Multi-

收稿日期: 2017-09-19; 收到修改稿日期: 2017-11-01

基金项目: 安徽省自然科学基金(1508085JGD02,1608085QF137)、安徽省科技重大专项(15CZZ04125)、国家自然科学基金(61378041,61705237)

作者简介: 胡玉霞(1984—),女,博士,主要从事水体细菌微生物光谱检测技术方面的研究。E-mail: yxhu@aiofm.ac.cn

导师简介: 赵南京(1976—),男,博士,研究员,博士生导师,主要从事环境污染光学与光谱学监测新技术与方法方面的研究。E-mail: njzhao@aiofm.ac.cn(通信联系人)

wavelength transmission spectroscopy can realize bacteria motion-tracking detection during growth, and can obtain morphological characteristics and chemical composition of bacteria, which provides a new method for multiple parameters measurement of bacteria.

Key words biotechnology; spectroscopy; Mie scattering; multi-wavelength transmission spectroscopy; bacteria detection; bacteria growth

OCIS codes 290.4020; 300.6390; 170.1530; 300.1030

1 引 言

细菌是引起水体污染的重要污染物之一。掌握细菌的生长变化,估算细菌在生长过程中浓度、结构、化学组分等信息的变化,无论是对微生物学研究,还是对水体细菌微生物在线监测,都具有十分重要的意义。

目前,在细菌生长过程中进行多参数测量是识别水体细菌的重要方法之一,也是微生物学家长期以来研究的方向之一。测量水体细菌微生物浓度、大小的平板计数法、滤膜法、显微镜法等^[1-4],具有准确率较高的特点,但操作复杂,耗时长,不适合对水体细菌微生物进行实时采集和检测。细胞内大分子组分含量测量方法,如显微荧光光度法,具有检测速度快的特点,但需要荧光试剂辅助,容易污染环境^[5]。流式细胞术法具有操作简单、快速等优点,但仪器价格昂贵,不适于现场检测^[6]。

多波长透射光谱产生于光与被测样品之间的相互作用,通过光谱分析可以获得样品结构和化学组分等特征信息,多波长透射光谱技术具有测试简单、无损伤、精度高、单次确定样品多个参数等优点。一些学者已经利用该技术在生物领域开展了相关研究工作,Callahan 等^[7]通过测量隐孢子虫卵囊悬浮液的透射光谱得到了隐孢子虫卵囊的大小等参数;Mattley 等^[8]测量了人体血小板的透射光谱,利用光散射理论分析了细胞的数量和粒径分布;Katz 等^[9]利用高斯散射理论和反常衍射理论分析了 3 种不同细菌的透射光谱,得到了不同细菌的平均大小。国内基于光谱学技术进行细菌微生物检测的研究较少,陶站华等^[10]利用光镊拉曼光谱技术研究了不同环境因素对葡萄球菌黄素合成的影响;卜敏等^[11]研究了白细胞对偏振光的散射特性,结果表明散射分布规律和细胞模型的形体参量、光学参量具有相关性;王久悦等^[12]研究了细菌对可见光的散射特性,获得了细胞大小和数量参数,但未得到细菌内化学组分的信息。

本课题组以水体常见细菌——大肠杆菌为研究对象,用紫外-可见分光光度计采集其各生长阶段的多波长透射光谱,分析了不同波段的光谱特征。基

于 Mie 散射理论和 Lambert-Beer 定律,对测量的透射光谱进行解析,得到了大肠杆菌生长过程中细胞浓度、大小和核酸含量的变化信息。

2 基本原理

水体细菌特征参数的反演计算主要依据 Mie 散射理论和 Lambert-Beer 定律。细菌细胞结构分为两部分:外部结构和内部结构。外部结构由细胞质和细胞壁构成;内部结构由不吸收大分子(蛋白质、多糖、脂肪等)的细胞器构成,具有特殊的折射率增量。根据 Mie 散射理论,在 240~900 nm 波段范围内,细菌悬浮液整体散射光谱的光密度表达式为^[12]

$$\tau(\lambda) = N_p l \left(\frac{\pi}{4} \right) \{ \omega Q_{\text{sca}} [m_{\text{outer}}(\lambda), D_1] D_1^2 + (1 - \omega) Q_{\text{sca}} [m_{\text{inner}}(\lambda), D_2] D_2^2 \}, \quad (1)$$

式中 λ 为入射光波长, N_p 为单位体积的细菌数, l 为光程, ω 为细菌外部结构对总散射光的贡献比例, D_1 、 D_2 分别为细菌体的平均粒径和内部结构的平均粒径, Q_{sca} 为细菌的散射系数, $m_{\text{outer}}(\lambda)$ 、 $m_{\text{inner}}(\lambda)$ 分别为细菌体相对于周围介质的折射率与内部结构相对于周围介质的折射率。细菌体悬浮介质的折射率可根据文献^[13]的方法求得;大肠杆菌外部结构的折射率 n_{outer} 可由 $n_{\text{outer}} = 1.3776 + 3034.9100/\lambda^2$ 求得^[14];内部结构的平均折射率 n_{inner} 可以由 $n_{\text{inner}} = 1.5500 + 5900/\lambda^2$ 求得^[15]。

细菌中每部分的散射系数的表达式为^[16]

$$Q_{\text{sca}} = \frac{2}{\alpha^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) (|a_n|^2 + |b_n|^2), \quad (2)$$

式中 $\alpha = \pi D/\lambda_0$ 为无因次粒径参数,其中 λ_0 为入射光在细胞周围介质的波长; a_n 、 b_n 为 Mie 系数,是无因次粒径参数 α 和折射率 $m_{\text{inner}}(\lambda)$ 、 $m_{\text{outer}}(\lambda)$ 的函数:

$$a_n = \frac{\psi'_n(m\alpha)\psi_n(\alpha) - m\psi_n(m\alpha)\psi'_n(\alpha)}{\psi'_n(m\alpha)\xi_n(\alpha) - m\psi_n(m\alpha)\xi'_n(\alpha)}, \quad (3)$$

$$b_n = \frac{m\psi'_n(m\alpha)\psi_n(\alpha) - \psi_n(m\alpha)\psi'_n(\alpha)}{m\psi'_n(m\alpha)\xi_n(\alpha) - \psi_n(m\alpha)\xi'_n(\alpha)}, \quad (4)$$

式中 $\psi_n(x) = \sqrt{\pi x/2} J_{n+1/2}(x)$, $\xi_n(x) = \sqrt{\pi x/2} \cdot H_{n+1/2}^2(x)$, $J_{n+1/2}$ 为半整数阶 Bessel 函数, $H_{n+1/2}$ 为

第二类 Hankel 函数。

细菌吸收部分的特征参数反演可根据 Beer-Lambert 定律得到。当一束强度为 I_0 的入射光照射到一定浓度的样品时,由于样品的原子或分子吸收特征频率的辐射能量,使得穿过光的强度降低,吸光度与样品的浓度关系为

$$A = \lg(I_0/I_t) = \epsilon(\lambda)cl, \quad (5)$$

式中 A 为吸光度, I_t 为透射光强度, c 为光速, $\epsilon(\lambda)$ 为与波长相关的吸光物质的特征常数, l 为光程。通过(5)式可以在一定光程下根据物质的吸收光谱求出物质的成分和浓度。

3 实验分析

3.1 细菌培养及制备

实验使用的大肠埃希氏菌购自中国工业菌种保藏管理中心。取大肠埃希氏菌斜面菌种 1 支,用接种环取菌苔,接入牛肉膏蛋白胨培养液中,静止培养 18 h 左右,获得细菌培养液(“种子”培养液)。吸取 0.2 mL 细菌培养液,接种于盛有 20 mL 的牛肉膏蛋白胨培养基的锥形瓶内。将已接种好的锥形瓶置于摇床上振荡,温度为 25 °C,振荡频率为每分钟 150 次,同批培养 7 个样品,按标记好的培养时间取出锥形瓶,并立刻放入冰箱(4 °C)中贮存。摇动培养瓶,分别吸取 3 mL 不同生长时间的细菌培养液,加入离心管中,以 12000 $r \cdot \min^{-1}$ 的速度离心 5 min。吸取其上清液,加入去离子水,以此方法清洗三遍,最后一次加入去离子水,得到细菌悬浮液。

3.2 试剂与仪器

实验所用牛肉膏、蛋白胨、氯化钠均购于国药化学试剂有限公司。实验仪器包括紫外-可见分光光度计(UV2550 型)、智能培养箱(HP400G 型)、无菌操作台(SW-CJ-ID 型)、高速冷冻离心机(H-1650R 型)、组合式光照振荡培养箱(MQP-B3G 型)、石英比色皿(光程为 10 mm)。

3.3 光谱测定

大肠杆菌悬浮液制备完成后,调节紫外-可见分光光度计波长为 240~900 nm,采样间隔为 1 nm,以去离子水作为对照,测定不同培养时间的大肠杆菌菌液的光密度,对每个悬浮液测量 3 次,取其平均值。在光谱采集前,需要用去离子水校正分光光度计的零点,以消除杂散光的影响。

3.4 细菌浓度的测定

将不同培养时间的大肠杆菌菌液用 10 倍稀释法进行一系列稀释,再用无菌吸管吸取 1 mL 不同稀释

度的菌液(10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7})于无菌平皿中,然后在平皿中分别倒入 45 °C 的营养琼脂培养基。轻轻转动平皿,使菌液与培养基混合均匀,冷凝倒置,然后置于培养箱中培养(37 °C/24 h),直至长出菌落,即可对不同平皿中的细菌进行计数。最后根据取样接种量和稀释倍数即可计算出样品中的细菌数。

3.5 细菌大小的测定

取干净的载玻片,用无菌吸管吸取少量大肠杆菌的浓菌液,制成薄涂面;涂片经酒精灯火焰固定后,依次经过如下处理:结晶紫初染 1 min,水洗,碘液水洗 1 min,脱色液脱色约 1 min,复染液复染 30 s,最后用吸水纸轻轻吸干。利用光学显微镜(CX41 型)观察细菌的大小。

4 结果与讨论

4.1 细菌在培养期间透射光谱的动态变化

以细菌菌液的培养时间为横坐标,以各时间点稀释液测得的光密度(波长为 600 nm)为纵坐标,得到大肠杆菌的生长动态曲线,如图 1 所示。由图 1 可见:1~3 h 为延迟期,细菌主要是适应环境,生长速度较慢;3~6 h 为对数期,此时细菌已适应环境,营养物质充足,处于快速生长状态;6~7 h 处于对数后期,细菌繁殖速度下降,这是由于此时培养基内的营养物质减少,细菌新陈代谢产生的毒性物质开始积累。

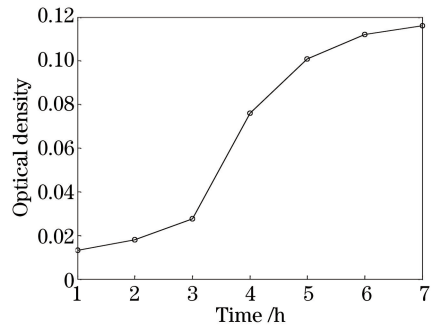


图 1 水体大肠杆菌在 600 nm 波长处随时间变化的光密度

Fig. 1 Optical density of *Escherichia coli* in water at 600 nm versus time

菌液浓度在测量过程中难以控制,为了使不同培养阶段的透射光谱对应的样品浓度相等,首先对原谱线进行总和归一化处理。图 2 为菌液在 240~900 nm 波段的归一化透射光谱,纵坐标为光密度,即入射光强与透射光强之比的常用对数值,表示细菌散射和吸收的信息。由图 2 可知:在 400~900 nm 波段,随着培养时间延长,光谱的光密度逐渐增大,其原因为随着培养时间延长,细菌体内无发色团的蛋白质和脂类等物质含量的增加,使得

散射能力增强。在 240~300 nm 波段范围内,测得的归一化光谱的光密度逐渐减小,其原因是随着细菌的平均尺寸逐渐增大,当波长比细胞尺寸小很多时,就会发生阴影效应;另一个原因是细胞器大小或数量的增加会引起光谱下降。在 250~280 nm 波段范围内有一个较大的吸收峰,其原因为细菌内的核酸组分在该波段范围内对光有较强的吸收作用。综上所述,在不同的生长时期,光谱有明显的变化,故而可以利用多波长透射光谱获取细菌生长过程中的特征参数变化。

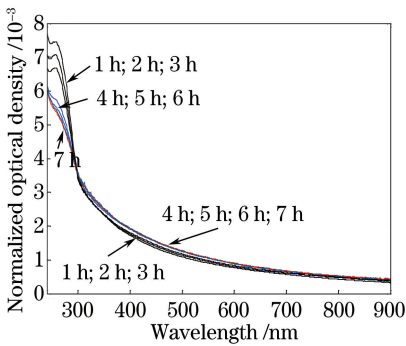


图 2 大肠杆菌菌液在不同生长时间的归一化光谱

Fig. 2 Normalized spectra of *Escherichia coli* suspension at different growth stages

4.2 细菌在培养期间大小的变化

在 400~900 nm 波段,透射光谱主要表现为细菌微生物的整体粒径和内部所含细胞器的散射作用,反映了细菌粒径大小以及结构等相关信息^[10]。根据(1)式,利用非线性最小二乘算法对归一化透射光谱进行迭代拟合,直到误差小于 10^{-8} ,即可计算出菌液的散射光谱。根据光谱拟合结果可以得到不同培养时期细菌的宏观结构、内部结构平均大小的动

态变化,如图 3 所示。由图 3 可见:在不同的培养时间下,细菌细胞的平均大小是动态变化的;在培养前期(1~3 h),细菌的平均大小增大,这是由于细菌接种到新的培养基中时,细胞并不马上分裂,但细菌并不是完全处于静止状态,细胞的化学组分(RNA、蛋白质)的含量增加,使得细胞的体积相对增大;在细菌培养对数期(3~6 h),细菌的平均大小上下波动,这是因为在对数期一部分细胞生长,细胞体积增大,另一部分细菌开始以二分裂繁殖,单个细胞的体积变小。综上所述,细菌在培养过程中的大小是波动变化的,与文献^[17]的结果一致。

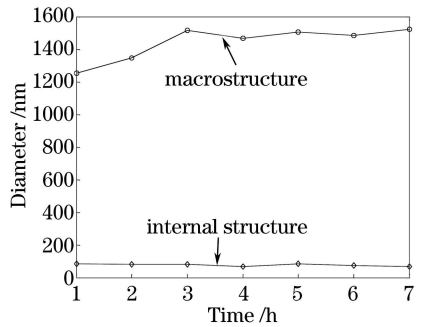


图 3 水体大肠杆菌不同生长时间下细胞平均大小、内部结构平均大小的变化趋势

Fig. 3 Changes of average size and the internal average size of *Escherichia coli* cells in water versus time

利用显微镜观察得到了不同生长时间点具有代表性的细菌菌体大小的变化图,如图 4 所示。在大肠杆菌悬浮液中,细菌菌体的大小随着培养时间延长呈现先增大后波动变化的趋势,其结果与计算得到的细菌大小随时间变化的规律基本一致。

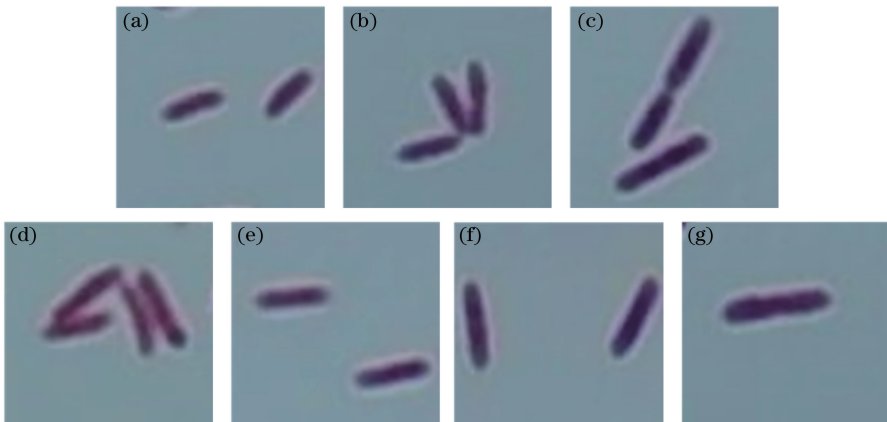


图 4 不同生长时间下大肠杆菌显微镜图。(a) 1 h;(b) 2 h;(c) 3 h;(d) 4 h;(e) 5 h;(f) 6 h;(g) 7 h

Fig. 4 Micrographs of *Escherichia coli* cells at different growth stages.

(a) 1 h; (b) 2 h; (c) 3 h; (d) 4 h; (e) 5 h; (f) 6 h; (g) 7 h

4.3 细菌在培养期间的浓度变化

根据(1)式拟合得到的细菌宏观结构、内部结构平均粒径大小以及内外结构的消光比例可计算出400~900 nm波段的透射光谱,与原始测量光谱进行线性回归,可得出细菌浓度。图5为不同培养时间内细菌浓度的变化,可见:在细菌培养前期,细菌数目增长较缓慢;当进入对数期后,细菌数目快速增长;在细菌对数后期,细菌繁殖速度下降,进入大致稳定的状态。利用平板计数法对不同培养时间的大肠杆菌菌液进行检测,获得大肠杆菌菌落数。平板菌落计数法得到的水体细菌浓度变化趋势与透射光谱法的结果基本相符:在3~6 h为细菌的对数期,死亡细菌较少,两种方法计算出的细菌数目最为接近;在6~7 h为对数后期,部分细菌死亡,平板计数结果偏低。

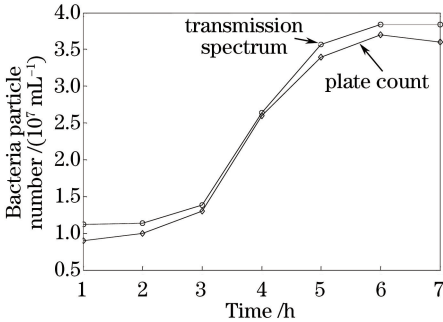


图5 不同培养时间下细菌浓度的变化趋势
Fig. 5 Bacteria concentration versus time

4.4 细菌在培养期间核酸含量的变化

大肠杆菌干物质的主要化学组分是蛋白质与核酸,几乎占整体的80%^[18]。大肠杆菌对紫外光的吸收能力主要来自于细菌内的化学组分(核酸、发色团氨基酸)。细菌微生物中核酸、发色团氨基酸和吡啶二羧酸的吸收系数与波长的关系如图6所示^[19]。

在生物体中组成蛋白质的氨基酸大约有20种,这些天然氨基酸在230~310 nm波长范围内大都没有吸收,只有芳香族氨基酸——酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸在250~300 nm波段均有吸收峰,其最大吸收系数对应的波长为280 nm。核酸中的核糖和磷酸在紫外区没有吸收,但嘌呤、嘧啶碱基具有共轭双键系统,对250~280 nm波段的紫外光具有强烈的吸收作用。选择细菌中发色团氨基酸和核酸吸收系数最大的波段(250~300 nm)的吸光度进行分析。

已知细菌浓度、粒径大小等参数,根据(1)式可以将散射光谱扩展到240~400 nm波段范围,从而得到整个测量波段范围内的散射光谱,然后用测量所得的

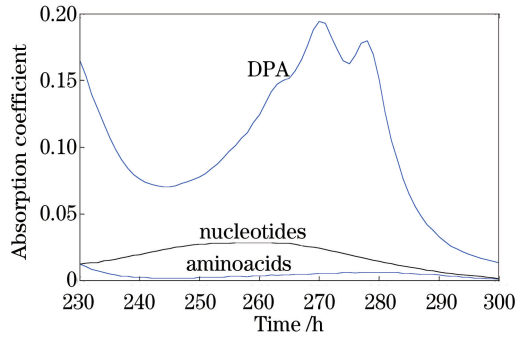


图6 细菌微生物中总核酸、发色团氨基酸和吡啶二羧酸的吸收系数^[19]

Fig. 6 Absorption coefficients of total nucleic acid, chromophoric amino acids, and dipicolinic acid (DPA) in microorganism^[19]

透射光谱减去计算所得的散射光谱,就可以得到细菌的吸收光谱。根据 Lambert-Beer 定律可知,某一波长处的吸光度与各组分含量呈线性关系,但在大肠杆菌细胞中,除了核酸、发色团氨基酸对光有吸收外,还有其他成分的浓度及基线等因素影响吸光度。将大肠杆菌紫外吸收光谱 $A(\lambda)$ 分解为若干基本组分的组合,核酸、发色团氨基酸的吸光系数分别为 $\epsilon_1(\lambda)$ 和 $\epsilon_2(\lambda)$,其他组分的吸光度用常数 c_3 表示(常数项),则紫外吸收光谱表达式如下:

$$A(\lambda) = c_1\epsilon_1(\lambda) + c_2\epsilon_2(\lambda) + c_3, \quad (6)$$

式中 c_1 、 c_2 分别为核酸浓度和发色团氨基酸浓度。利用多元线性回归分析可得核酸浓度。

计算得到了大肠杆菌在不同培养时间下细胞群体核酸含量的变化,如图7(a)所示,细菌群体中总核酸含量呈先增长后逐渐稳定的趋势,这是因为细菌接种到新鲜培养基后,细胞内的 RNA、蛋白质物质含量增加,为细菌繁殖积累做好了准备;一段时间以后,随着营养物质的消耗,核酸增长速率降低。结果与文献^[16]报道大肠杆菌核酸含量的变化一致。

由单位体积的核酸含量和细菌浓度的比值可以得到单个大肠杆菌细胞内的核酸含量,如图7(b)所示。在延迟期,单个细菌细胞内核酸的含量处于上升趋势,这是由于细胞内 RNA、DNA 含量增加,而细菌数量增加很少;进入对数期后,虽然细菌内的核酸含量有所增加,但细菌数量急剧增长,使得单个大肠杆菌细胞内的平均核酸含量处于下降的趋势。不同培养时间下单个大肠埃希氏菌细胞内的核酸含量为 $1.1120 \times 10^{-13} \sim 3.0920 \times 10^{-13}$ g/cell,这一结果在激光共聚焦显微镜方法所报道的单个大肠杆菌细胞核酸含量的合理范围内^[20]。

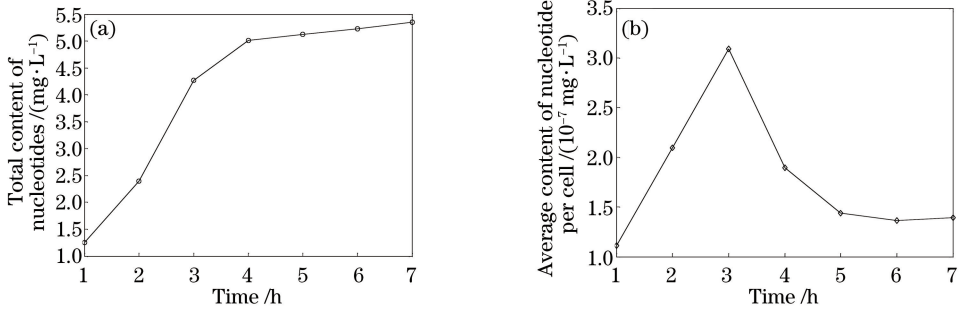


图 7 (a)大肠杆菌悬浮液总核酸含量随时间的变化趋势;(b)单个大肠杆菌平均核酸含量随时间的变化趋势

Fig. 7 (a) Total content of nucleotides in suspensions of *Escherichia coli* versus time;
(b) average content of nucleotides per cell of *Escherichia coli* versus time

5 结 论

采用分光光度法测定大肠杆菌在生长过程中紫外-可见光波段的透射光谱。根据 Mie 散射理论,对水体大肠杆菌在 400~900 nm 波段的散射光谱进行解析,得到了细菌在生长过程中细胞结构特征、浓度信息的变化。根据 Lambert-Beer 定理,采用吸光系数法计算出了不同生长阶段中大肠杆菌核酸的含量变化,与文献[20]的数据具有较好的一致性。综上所述,基于多波长透射光谱技术可以准确获取大肠杆菌结构特征和化学组分特征参数的动态变化,为水体细菌的在线快速检测和识别提供了技术支持,也为细胞多参数测量提供了一种新方法。

参 考 文 献

[1] Loske A M, Tello E M, Vargas S, *et al.* *Escherichia coli* viability determination using dynamic light scattering: a comparison with standard methods [J]. *Archives of Microbiology*, 2014, 196(8): 557-563.

[2] Kuhn K, Derek A, Suzanne A, *et al.* Usefulness of the paralens fluorescent microscope adaptor for the identification of mycobacteria in both field and laboratory settings [J]. *The Open Microbiology Journal*, 2010, 4: 30-33.

[3] Shen P, Chen X D. *Microbiology* [M]. 8th ed. Beijing: Advanced Education Press, 2016: 38-39.

[4] Luo Y, Zhao J F, Zhou E M, *et al.* Comparison of the national standardization method and the membrane filter technique for microbiology detection [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 1999, 20(6): 54-56.

罗祎, 赵晋府, 周尔明, 等. 微生物检测国标法和滤膜法的比较[J]. *食品工业科技*, 1999, 20(6): 54-56.

[5] Li S W, Huo M P, Cheng R X, *et al.* Quantitative, correlated determination of DNA, RNA and protein

content of individual cell using a microspectrofluorometer[J]. *Acta Biophysica Sinica*, 1987, 3(4): 420-423.

李素文, 霍满鹏, 成汝萱, 等. 对同一细胞内 DNA、RNA 和蛋白质含量相关测定的显微荧光光度法[J]. *生物物理学报*, 1987, 3(4): 420-423.

[6] Robertson B R, Button D K, Koch A L. Determination of the biomasses of small bacteria at low concentrations in a mixture of species with forward light scatter measurements by flow cytometry [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3900-3909.

[7] Callahan M R, Rose J B, Garcia-Rubio L, *et al.* Use of multiwavelength transmission spectroscopy for the characterization of cryptosporidium parvum oocysts: Quantitative interpretation [J]. *Environmental Science and Technology*, 2003, 37(22): 5254-5261.

[8] Mattley Y, Leparc G, Potter R, *et al.* Light scattering and absorption model for the quantitative interpretation of human blood platelet spectral data [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2000, 71(5): 610-619.

[9] Katz A, Alimova A, Xu M, *et al.* Bacteria size determination by elastic light scattering [J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2003, 9(2): 277-287.

[10] Tao Z H, Ke K, Shi D Q, *et al.* Study on effect of various environmental factors on staphyloxanthin biosynthesis using laser tweezers Raman spectroscopy [J]. *Laser and Optoelectronics Progress*, 2017, 54(12): 123001.

陶站华, 柯珂, 师德强, 等. 利用光镊拉曼光谱分析环境因素对葡萄球菌黄素生物合成的影响[J]. *激光与光电子学进展*, 2017, 54(12): 123001.

[11] Bu M, Hu S S, Tao Z H, *et al.* Relationship between scattering behavior and structure of leukocytes with polarized light incidence [J]. *Chinese*

- Journal of Lasers, 2017, 44(10): 1007002.
卜敏, 胡双双, 陶兆禾, 等. 偏振光下白细胞散射特征及其与细胞结构关系的分析[J]. 中国激光, 2017, 44(10): 1007002.
- [12] Wang J Y, Zhao N J, Duan J B, *et al.* Rapid quantitative detection in water based on multi-wavelength scattering[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2017, 37(2): 333-337.
王久悦, 赵南京, 段静波, 等. 水体细菌微生物多波长散射光谱快速定量检测[J]. 光谱学与光谱分析, 2017, 37(2): 333-337.
- [13] Thormählen I, Straub J, Grigull U. Refractive index of water and its dependence on wavelength, temperature, and density[J]. Journal of Physical and Chemical Reference Data, 1985, 14(4): 933-946.
- [14] Alupoaei C E, Olivares J A, Garcia-Rubio L H. Quantitative spectroscopy analysis of prokaryotic cells: Vegetative cell and spores[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2004, 19(8): 893-903.
- [15] Mourant J R, Campolat M, Brocke C. Light scattering from cells: The contribution of the nucleus and the effects of proliferative status[J]. Journal of Biomedical Optics, 2000, 5(2): 131-137.
- [16] Bohren C F, Huffman D R. Absorption and scattering of light by small particles[M]. New York: John Wiley & Sons, 1983: 228-338.
- [17] Cooper S. Bacterial growth and division[M]. San Diego: Academic Press, 1991: 5.
- [18] Churchward G, Bremer H, Young R. Macromolecular composition of bacteria [J]. Journal of Theoretical Biology, 1982, 94(3): 651-670.
- [19] Murrell W G. Chemical composition of spores and spore structures, in the bacterial spores [M]. New York: Academic Press, 1969: 215-220.
- [20] Valkenburg J A, Woldringh C L. Phase separation between nucleoid and cytoplasm in *Escherichia coli* as defined by immersive refractometry[J]. Journal of Bacteriology, 1984, 160(3): 1151-1157.