

水体细菌微生物多波长透射光谱定量分析 归一化方法研究

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

¹中国科学院安徽光学精密机械研究所, 中国科学院环境光学与技术重点实验室, 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 快速准确获取水体细菌微生物浓度信息,对饮用水卫生安全监管具有重要意义。基于多波长透射光谱技术研究了水体细菌微生物浓度定量反演方法,并重点研究了光谱数据的归一化处理(颗粒浓度归一化、最大值归一化、积分归一化、平均归一化)对水体细菌微生物浓度反演结果准确性的影响。基于 Mie 散射理论建立了大肠埃希氏菌(大肠杆菌)多波长透射光谱解析模型,通过对归一化后的光谱进行解析,获取了大肠杆菌的结构信息,并以此构建出单种细菌的多波长透射参考光谱;根据测量光谱与单种细菌参考光谱的相关性反演细菌浓度,并对比分析了不同归一化处理方法下细菌浓度反演结果的准确性。研究结果表明:与平板菌落计数法相比,平均归一化光谱反演细菌浓度的最大相对误差为 0.92%,平均相对误差为 0.70%,线性相关系数达到 0.9984,其准确性和稳定性均为最优。本研究为水体细菌微生物的快速定量检测与预警提供了基础数据。

关键词 光谱学;多波长透射光谱;细菌微生物;光谱归一化处理;定量检测

中图分类号 O433.4

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201838.0430001

Normalization of Quantitative Analysis for Bacteria Multi-Wavelength Transmission Spectroscopy in Water

Hu Yuxia^{1,2,3}, Zhao Nanjing^{1,3}, Gan Tingting^{1,3}, Duan Jingbo^{1,3},
Meng Deshuo^{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 Acquiring the concentration of bacteria in water quickly and accurately is of great significance for the supervision hygiene and safety of drinking water. We use multi-wavelength transmission spectroscopy to determine the concentration of bacteria in water, and mainly study the influences of different normalizations of the spectra (particle concentration normalization, maximum normalization, integral normalization, and average normalization) on the accuracy of bacterial concentration. According to the spectra interpretation model of *Escherichia coli* (*E. coli*) established on Mie scattering theory, we can obtain the bacteria size by the normalized spectra interpretation, and calculate a single bacterium's reference spectra. Based on the relation curve between the measured spectra and a single bacterium's reference spectra, we can obtain the bacterial concentration and analyze the accuracy of the bacterial concentration by several normalization procedures. Compared with plate counting, the bacterial concentration

收稿日期: 2017-10-17; 收到修改稿日期: 2017-11-20

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

作者简介: 胡玉霞(1984—),女,博士研究生,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,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)

calculated by the average normalization has the maximum relative error of 0.92%, the average relative error of 0.70%, and the correlation coefficient of 0.9984. The accuracy and stability of the method are the best. The study can provide the basic data for the quantitative detection and early warning of bacteria in water.

Key words spectroscopy; multi-wavelength transmission spectra; bacteria; spectrum normalization; quantitative detection

OCIS codes 300.6390; 170.1420; 290.5850; 170.1530

1 引 言

水体细菌微生物污染严重威胁着人们的身体健康,快速准确获取水体细菌微生物的含量信息,对保障饮用水安全具有重要意义。水体细菌微生物含量的常用检测方法有平板计数法、荧光显微镜计数法、流式细胞计数法等^[1-3]。平板计数法根据培养生长后的菌落数来计算细菌的数量,该方法要求操作者技术熟练,而且检测过程复杂,耗时长,难以用于实时快速检测;荧光显微镜计数法基于荧光探针和荧光显微镜对细菌进行计数,需要荧光试剂辅助;流式细胞计数法可以快速获取细菌的数量和大小,但样品的前处理比较复杂,需要专业人员操作,而且仪器的维护比较难。

多波长透射光谱技术可依据细菌对光的吸收或散射特性得到细菌的大小和数量等信息,与常用检测方法相比,具有操作简单、测量快速、不破坏细胞、无需荧光试剂辅助、获取样品信息全面等特点,能够用于水体细菌微生物的快速在线检测。Mattley等^[4]利用多波长透射光谱技术研究了隐孢子虫的平均尺寸;Mourant等^[5]基于多波长透射光谱技术、Rayleigh-Debye-Gans近似和奇异衍射理论,分析了细胞的形状和内在结构。目前,国内基于透射光谱进行水体细菌微生物检测的研究还比较少,王立娟等^[6]利用偏振同步光散射对大肠杆菌的不同菌株进行了鉴别;王亚伟等^[7]进行了细胞光散射相位成像仿真研究,获得了血细胞的结构和形态等参数;陶站华等^[8]利用光镊拉曼光谱技术研究了环境因素对葡萄球菌黄素合成的影响。

光谱数据处理是准确获取水体细菌微生物参数及其进行定性、定量分析的基础。吴正洁等^[9]研究了以最高浓度乙醇拉曼光谱最高点作为归一化参照的乙醇浓度的定量分析方法;孙杜娟等^[10]提出了对微生物远红外波段吸收光谱进行最大值归一化处理并计算样品含水量的方法;汪家升等^[11]利用激光诱导击穿光谱技术并结合强度归一化方法定量分析了岩石中Mg和Ca元素的含量,在一定程度上提高了测量的准确性;翟英花等^[12]对气相色谱进行面积

归一化处理测定了氯气中氧、氢等的含量;王玲等^[13]在建立冰雪目标表观反射率双向反射分布函数(BRDF)模型的基础上,将两个冰雪目标的表观反射率进行归一化,消除了表观反射率中与冰雪目标BRDF特性相关的变化信息,获得了反映遥感辐射性能变化的参量。在多波长透射光谱定量分析中,本文重点研究了光谱数据归一化处理对水体细菌微生物浓度定量反演结果准确性的影响。

2 分析方法

2.1 参数解析与浓度反演

可见波段(400~900 nm)光照射到细菌悬浮液上主要发生散射作用,假设每个细菌的光散射满足不相关单散射,基于Mie散射理论,400~900 nm波段透射光谱的光密度为^[14]

$$f(\lambda) = \ln(I_0/I) = \frac{\pi}{4} l N_p D^2 Q_{\text{scn}}(\lambda, D, m), \quad (1)$$

式中: I_0 和 I 分别为入射光和透射光的强度; l 为光程; N_p 为单位体积内的颗粒数量; Q_{scn} 为散射系数,其精确表达式是由Bohren等在1983给出的与 λ 、 D 和 m 相关的函数^[15],其中 λ 为入射光波长, D 为被测细菌的直径, m 为细菌相对于周围介质的相对折射率。由于细菌本身结构复杂,基于多波长散射光谱对细菌进行分析时,可将细胞结构分为外部结构和内部结构两部分,外部结构由细胞质和细胞壁构成,内部结构由对光没有吸收作用的大分子(如蛋白质、多糖、脂肪等)组成的细胞器构成。因此(1)式可改为

$$f(\lambda) = N_p l \frac{\pi}{4} \{x Q_{1\text{scn}}[m_1(\lambda), D_1] D_1^2 + (1-x) Q_{2\text{scn}}[m_2(\lambda), D_2] D_2^2\}, \quad (2)$$

式中 D_1 为细菌外部结构的等效粒径, D_2 为内部结构的粒径, x 为外部结构占细菌全部散射特性的比例, $m_1(\lambda)$ 、 $m_2(\lambda)$ 分别为细菌外部结构与内部结构相对于周围介质的折射率。大肠杆菌外部、内部的实折射率分别为^[16-17]

$$m_{01}(\lambda) = 1.3776 + \frac{3034.9100}{\lambda^2}, \quad (3)$$

$$m_{02}(\lambda) = 1.5500 + \frac{5900}{\lambda^2}. \quad (4)$$

Thormählen 等在 1985 年给出了 $m_1(\lambda)$ 、 $m_2(\lambda)$ 在不同波长下水的折射率的计算公式^[18]。

由(2)式可知,根据所测透射光谱值求 D_1 、 D_2 、 N_p 时,需要用多个波长光谱的测量值求解。为了准确求解(2)式中的细菌尺寸等参数,首先需要对采集的光谱数据进行归一化处理,使(2)式等号左边项是多波长归一化后的光谱值,它可以通过测量获得,而右边项只是与细菌参数(D_1 、 D_2 、 x)相关的函数。这样,(2)式为线性无关的函数系,对于给定的一组数据,通过最小二乘曲线拟合,便可求出未知参数 D_1 、 D_2 、 x ,然后通过拟合出的细菌参数计算透射光谱,再与原始的测量光谱进行线性回归,从而进一步得到细菌浓度 N_p 。

2.2 光谱处理及误差分析

在基于 400~900 nm 波段的多波长透射光谱对细菌结构参数进行解析之前,首先需要对光谱数据进行归一化处理,以消除细菌浓度引起的光谱变化。分别采用颗粒浓度归一化、最大值归一化、积分归一化、平均归一化方法对采集的光谱进行归一化处理。

1) 颗粒浓度归一化。对光谱数据采用颗粒浓度归一化,即

$$\tau(\lambda) = \tau_0(\lambda)/C_0, \quad (5)$$

$$C_0 = N_p \left(\frac{\pi D^3}{6} \right) \rho, \quad (6)$$

式中 $\tau(\lambda)$ 为归一化后的光密度, $\tau_0(\lambda)$ 为测量不同波长点的光密度, C_0 为单位体积的细菌质量, ρ 为颗粒密度。根据误差传播定理^[19], 光密度函数的标准差为

$$\sigma[\tau(\lambda)] = \frac{\tau_0(\lambda)}{C_0} \sqrt{\frac{\sigma_{N_p}^2}{N_p^2} + \frac{9\sigma_D^2}{D^2} + \frac{\sigma_{\tau_0(\lambda)}^2}{\tau_0^2(\lambda)}}, \quad (7)$$

式中 σ_{N_p} 为颗粒浓度的标准差, σ_D 为颗粒直径的标准差, $\sigma_{\tau_0(\lambda)}$ 光密度测量值的标准差。由(7)式可知: 光密度的标准差与颗粒数量、大小的测量误差有关; 当 $C_0 = N_p$ 时, 光密度函数的标准差只与颗粒数量的测量误差有关。

2) 最大值归一化。光谱最大值归一化可表示为

$$\tau(\lambda) = \frac{\tau_0(\lambda)}{\tau_{\max}(\lambda)}, \quad (8)$$

式中 $\tau_{\max}(\lambda)$ 为光密度最大值。由(8)式可知, 最大值归一化的光密度谱的标准差为

$$\sigma[\tau(\lambda)] = \frac{\tau_0(\lambda)}{\tau_{\max}(\lambda)} \sqrt{\frac{\sigma_{\tau_{\max}(\lambda)}^2}{\tau_{\max}^2(\lambda)} + \frac{\sigma_{\tau_0(\lambda)}^2}{\tau_0^2(\lambda)}}. \quad (9)$$

由于各波长点的光密度值相互独立且精度相同, 即 $\sigma_{\tau_{\max}(\lambda)} = \sigma_{\tau_0(\lambda)}$, 则

$$\sigma[\tau(\lambda)] = \left[\frac{\tau_0(\lambda)}{\tau_{\max}(\lambda)} \right] \left[\sqrt{\frac{1}{\tau_{\max}^2(\lambda)} + \frac{1}{\tau_0^2(\lambda)}} \right] \sigma_{\tau_0(\lambda)}. \quad (10)$$

3) 积分归一化。对光谱采用积分归一化处理的方法, 即

$$\tau(\lambda) = \frac{\tau_0(\lambda)}{\int_{\lambda_j}^{\lambda_{j+1}} \tau_0(\lambda) d\lambda}. \quad (11)$$

(11)式中的积分可通过梯度积分法估算^[20], 即

$$I_T = \int_{\lambda_1}^{\lambda_{n+1}} \tau_0(\lambda) d\lambda = \frac{\Delta\lambda}{2} [\tau_0(\lambda_1) + 2\tau_0(\lambda_2) + \dots + 2\tau_0(\lambda_n) + \tau_0(\lambda_{n+1})], \quad (12)$$

式中 λ_j ($j=1, 2, \dots, n+1$) 为测量的 $\tau_0(\lambda)$ 的离散光密度值的波长点。根据误差传播公式, 积分归一化的光密度谱的标准差为

$$\sigma[\tau(\lambda)] = \frac{\tau_0(\lambda)}{I_T} \sqrt{\frac{\Delta\lambda^2}{I_T^2} \left(M - \frac{3}{2} \right) + \frac{1}{\tau_0^2(\lambda)} \sigma_{\tau_0(\lambda)}^2}, \quad (13)$$

式中 M 为采集离散点的个数, $\Delta\lambda$ 为波长间隔。积分归一化的光谱标准差与最大值归一化标准差在形式上相似, 但因 $I_T \gg \tau_0(\lambda)$, $I_T \gg \Delta\lambda \left(M - \frac{3}{2} \right)$, 因此积分归一化的光密度谱标准差小于最大值归一化标准差。

4) 平均光密度归一化。如果将(11)式中的积分式替换为平均光密度 $\left(\bar{\tau} = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \tau_{oi} \right)$, 则平均归一化后的光密度为

$$\tau(\lambda) = \frac{\tau_0(\lambda)}{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \tau_{oi}}. \quad (14)$$

平均归一化的光密度谱的标准差为

$$\sigma[\tau(\lambda)] = \frac{\tau_0(\lambda)}{\bar{\tau}} \sqrt{\frac{1}{M(\bar{\tau})^2} + \frac{1}{\tau_0^2(\lambda)} \sigma_{\tau_0(\lambda)}^2}. \quad (15)$$

因为 $\frac{M}{I_T^2} > \frac{1}{M(\bar{\tau})^2}$, 所以平均归一化的光密度谱的标准差最小。

3 光谱获取

3.1 试剂及菌种

大肠杆菌 (*Escherichia coli* CICC 10389) 购于中国工业菌种保藏中心; 牛肉膏蛋白胨培养基由 0.9 g 牛肉膏、1.5 g 蛋白胨、1.5 g 氯化钠、300 mL 去离子水混合而成。

3.2 仪器和方法

实验仪器包括:智能培养箱(HP400G),可提供静置温差为 $+1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温环境;高速冷冻离心机(H-1650R);UV-2550紫外可见分光光度计(日本岛津);无菌操作台(SW-CJ-ID型)。

细菌培养:大肠杆菌菌种进行菌种复活后,吸取活化菌液 1 mL ,接种到装有牛肉膏蛋白胨液体培养基的 250 mL 的锥形瓶中,将锥形瓶放入培养箱中静止培养 $16\sim 18\text{ h}$ 。吸取稳定期3个不同培养时间下细菌培养液 5 mL 加入离心管中,以 12000 r/min 的转速离心 10 min ,吸取上清液,加入 5 mL 去离子水,再次离心,以此方法清洗3次。将洗净的细菌加入 5 mL 去离子水并摇匀,得到均匀的细菌悬浮液。

光谱采集:取3支 10 mL 试管,分别加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 上述细菌悬浮液,并用去离子水稀释至 5 mL ,配制成3份不同浓度的细菌稀释液,将稀释液在水浴振荡摇床中振荡 20 min ,以去离子水为参比,分别进行多波长透射光谱测量。光谱测量范围为 $230\sim 900\text{ nm}$,采样间隔为 1 nm ,扫描速度为中速,每个样品测量3次,取平均值。光谱测量后利用平板菌落计数法获取对应菌液的浓度值。

平板菌落计数:取 1 mL 细菌悬浮液,加入去离子水稀释至 10 mL ,摇匀即成 10^{-1} 稀释液,按照10倍稀释方法,制成 $10^{-2}, 10^{-3}, \dots, 10^{-9}$ 等一系列稀释菌液。用 1 mL 无菌吸管吸取不同浓度的稀释液($10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$)放入平皿中,每个稀释液做3个平行样,然后在平皿中分别倒入 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 营养琼脂培养基,轻轻转动平板,使菌液与培养基混合均匀,冷凝倒置,在培养箱($37\text{ }^{\circ}\text{C}$)中培养 24 h ,然后对菌落进行计数。

3.3 光谱测量

不同浓度的大肠杆菌悬浮液在 $230\sim 900\text{ nm}$ 波

段透射光谱的测定结果如图1所示,图中每份悬浮液的透射谱为3次测量结果的平均值。

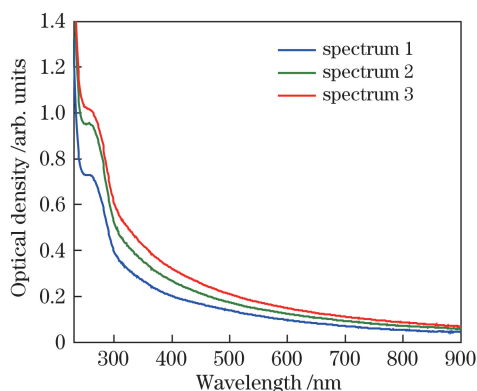


图1 3种浓度大肠杆菌悬浮液的透射光谱

Fig. 1 Transmission spectra of *Escherichia coli* suspension with three concentrations

由图1可知:在 $400\sim 900\text{ nm}$ 波长范围内,透射光谱的变化较平缓,无明显的吸收峰,主要表现为细菌微生物整体和内部所含细胞器的散射作用,反映了细菌浓度、粒径以及结构等相关信息; $230\sim 400\text{ nm}$ 波长范围内的光谱强度高于 $400\sim 900\text{ nm}$ 波长范围内的光谱强度,此波段的光谱不仅包含细菌的散射信息,也包含细菌内部化学组分的吸收信息。因此,采用 $400\sim 900\text{ nm}$ 波长范围内的透射光谱解析细菌的粒径和浓度等信息。

4 结果与讨论

4.1 结构参数的提取

采用颗粒浓度归一化、最大值归一化、积分归一化、平均归一化对大肠杆菌在 $400\sim 900\text{ nm}$ 波长范围内的透射光谱数据进行处理,基于非线性最小二乘 Levenberg-Marquart (LM)算法计算水体大肠杆菌的结构参数,如表1所示。

表1 不同归一化透射光谱反演得到的大肠杆菌的结构参数

Table 1 Structural parameters of *Escherichia coli* obtained with the inversion of different normalization transmission spectra

| Spectrum | Particle concentration normalization | | Maximum normalization | | Integral normalization | | Average normalization | |
|----------|--------------------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| | $D_1 / \mu\text{m}$ | $D_2 / \mu\text{m}$ | $D_1 / \mu\text{m}$ | $D_2 / \mu\text{m}$ | $D_1 / \mu\text{m}$ | $D_2 / \mu\text{m}$ | $D_1 / \mu\text{m}$ | $D_2 / \mu\text{m}$ |
| 1 | 1.4900 | 0.0500 | 1.7571 | 0.0501 | 1.2792 | 0.0501 | 1.2715 | 0.0501 |
| 2 | 1.3900 | 0.0500 | 1.4351 | 0.0501 | 1.4635 | 0.0501 | 1.4602 | 0.0501 |
| 3 | 1.4900 | 0.0500 | 1.4799 | 0.0501 | 1.4086 | 0.0525 | 1.4086 | 0.0500 |

从表1中可以看出,3条光谱使用4种归一化方法反演得到的大肠杆菌的 D_1 不同, D_2 几乎相近,其中 D_1 与文献[3]报道的平均粒径范围($1.26\sim 2.38\text{ }\mu\text{m}$)相符。4种归一化方法得到的体积与文

献[15]采用不同方法得到的大肠杆菌的体积($1\sim 7\text{ }\mu\text{m}^3$)范围相符,这表明通过(2)式反演细菌的尺寸具有一定的可行性。但是,各归一化后光谱反演出的部分菌体的粒径比较接近,不适合作为评判水

体细菌透射光谱归一化优劣的依据。根据表 1 中细菌的结构参数估算出单个大肠杆菌的光谱光密度,对测量和计算得到的光谱的光密度进行线性回归分析,可以获得它们之间的函数关系,进而计算出水体中细菌的浓度,然后与平板计数结果进行比较。

4.2 浓度反演与分析

图 2(a)是光谱 1 颗粒浓度归一化后光密度的测量值与计算值,可以看出,光谱的重合性较高,残差接近于 0,这表明通过 Mie 散射理论解析模型反演大肠杆菌的结构参数具有一定的可行性。图 2(b)是 3 条透射光谱的浓度拟合线,可以看出,3 条光谱的拟合曲线的斜率不同,斜率越大表明细菌浓度越大。与平板菌落计数进行对比后可知,3 条光谱反演细菌浓度的最大相对误差为 30.80%,平均相对误差为 24.45%。

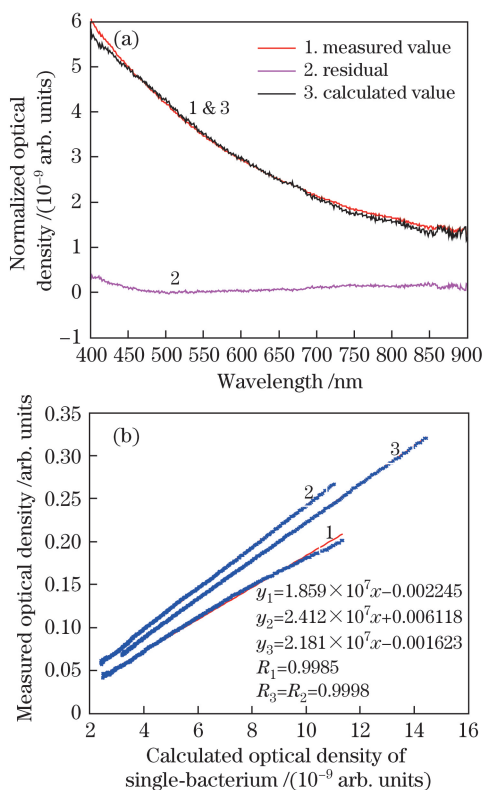


图 2 (a)光谱 1 颗粒浓度归一化后光密度的测量值与计算值;
(b) 3 条透射光谱的浓度拟合线
Fig. 2 (a) Measured and calculated optical density of spectrum 1 after particle concentration normalization;
(b) concentration fitting curves of three different transmission spectra

图 3(a)是光谱 1 最大值归一化后光密度的测量值与计算值。图 3(b)中光密度拟合曲线 2、3 的斜率比较接近,与曲线 1 的斜率相差较大。与平板菌落计数结果相比,3 条光谱反演细菌浓度的相对

误差分别为 70.74%、7.84%和 16.49%,平均相对误差为 31.69%。这主要是因为采集单个波长点的光密度值归一化后的结果,所以光谱解析结果的稳定性较差。

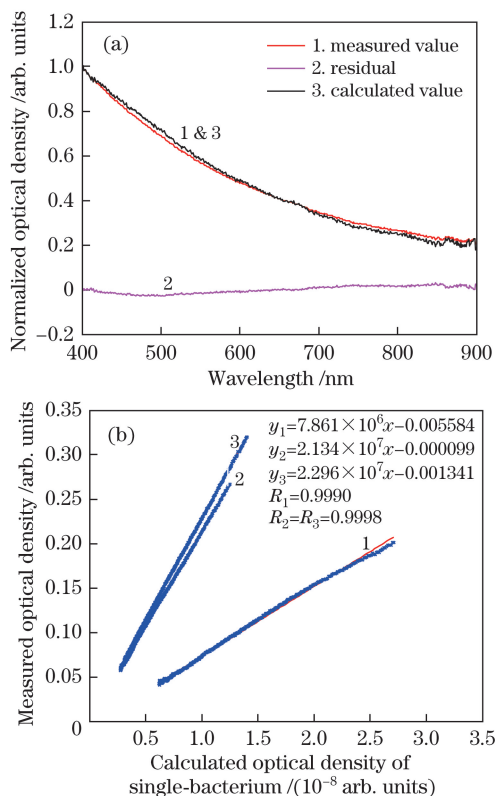


图 3 (a)光谱 1 最大值归一化后光密度的测量值与计算值;
(b) 3 条透射光谱的浓度拟合线
Fig. 3 (a) Measured and calculated optical density of spectrum 1 after maximum normalization;
(b) concentration fitting curves of three different transmission spectra

图 4(a)是光谱 1 积分归一化后光密度的测量值与计算值,残差几乎接近于 0。图 4(b)中光密度拟合曲线 1 和曲线 3 的斜率较接近,与曲线 2 的相差较大。3 条光谱的最小相关系数 R 为 0.9984,与平板菌落计数结果相比,3 条光谱反演细菌浓度的最大相对误差为 2.01%,平均相对误差为 1.14%。显然,与最大值归一化或颗粒浓度归一化比较,积分归一化方法的平均相对误差较小。

图 5(a)为光谱 1 平均归一化后光密度的测量值与计算值,残差十分接近于零。图 5(b)为 3 条透射光谱的浓度拟合线。3 条光谱的最小相关系数 R 高达 0.9984,3 条光谱反演出的细菌浓度与平板菌落计数值比较接近,细菌浓度的最大相对误差为 0.92%,平均相对误差为 0.70%,可见平均归一化方法的平均相对误差最小。

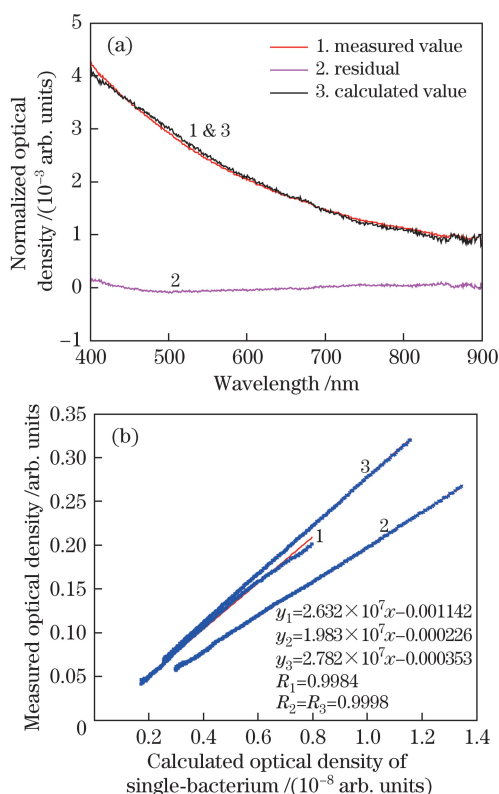


图 4 (a)光谱 1 积分归一化后光密度的测量值与计算值;
(b) 3 条透射光谱的浓度拟合线

Fig. 4 (a) Measured and calculated optical density of spectrum 1 after integral normalization; (b) concentration fitting curves of three different transmission spectra

表 2 为 4 种归一化光谱反演得到的细菌浓度。由表 2 可知:同一光谱采用不同的归一化方法反演得到的大肠杆菌的浓度不同;与平板菌落计数相比,

表 2 4 种归一化法与平板计数法得到的水体大肠杆菌的浓度

Table 2 Concentrations obtained with four normalization methods and serial dilution plate counting method

| No. | Concentration from plate counting / (10 ⁷ mL ⁻¹) | Particle concentration normalization | | Maximum normalization | | Integral normalization | | Average normalization | |
|----------------------------|---|---|-----------|---|-----------|---|-----------|---|-----------|
| | | Concentration / (10 ⁷ mL ⁻¹) | Error / % | Concentration / (10 ⁷ mL ⁻¹) | Error / % | Concentration / (10 ⁷ mL ⁻¹) | Error / % | Concentration / (10 ⁷ mL ⁻¹) | Error / % |
| 1 | 3.4200 | 2.3668 | 30.80 | 1.0008 | 70.74 | 3.3512 | 2.01 | 3.4300 | 0.29 |
| 2 | 2.5200 | 3.0712 | 21.87 | 2.7175 | 7.84 | 2.5248 | 0.19 | 2.5432 | 0.92 |
| 3 | 3.5000 | 2.7766 | 20.67 | 2.9230 | 16.49 | 3.5424 | 1.21 | 3.5310 | 0.89 |
| Average relative error / % | | 24.45 | | 31.69 | | 1.14 | | 0.70 | |

5 结 论

研究了多波长透射光谱数据归一化处理方法,对比了不同归一化方法用于水体细菌微生物浓度定量反演的准确性。结果表明:以水体细菌平均光密度作为归一化参照,利用多波长透射光谱反演的细菌浓度准确性和稳定性均较优,与平板菌落计数法

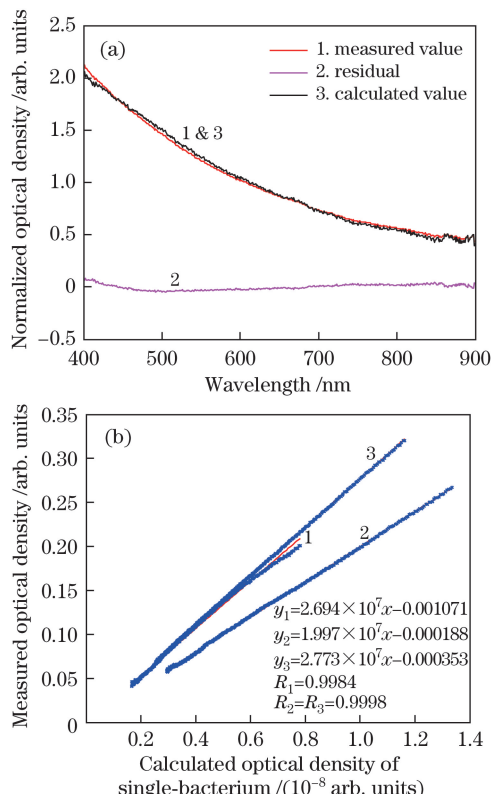


图 5 (a)光谱 1 平均归一化后光密度的测量值与计算值;
(b) 3 条透射光谱的浓度拟合线

Fig. 5 (a) Measured and calculated optical density of spectrum 1 after average normalization; (b) concentration fitting curves of three different transmission spectra

颗粒浓度归一化和最大值归一化反演结果的误差较大;积分归一化和平均归一化反演结果的误差相近,平均归一化的误差最小。

相比,平均归一化光谱反演细菌浓度的平均相对误差和最大相对误差均小于 1%,实现了水体细菌微生物浓度的准确定量反演。研究结果为快速、准确地监测水体中细菌微生物含量提供了参考。

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 W, Armstrong D, Atteberry S, *et al.* Usefulness of the paralensTM fluorescent microscope adaptor for the identification of mycobacteria in both field and laboratory settings[J]. The Open Microbiology Journal, 2010, 4(1): 30-33.
- [3] Garrity G M, Bell J A, Lilburn T G. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. 2nd Ed. New York: Springer, 2003: 382-385.
- [4] Mattley Y D, Garcia-Rubio L H. Multiwavelength spectroscopy for the detection, identification and quantification of cells[C]. Proceedings of SPIE International Society for Optical Engineering, 2000, 4206: 45-51.
- [5] Mourant J R, Campolat M, Brocke C, *et al.* 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.
- [6] Wang L J, Huang C Z. Polarized synchronous light scattering used for differentiating microorganisms[J]. Journal of Southwest University, 2007, 29(7): 28-31. 王立娟, 黄承志. 偏振同步光散射用于微生物区分的研究[J]. 西南大学学报, 2007, 29(7): 28-31.
- [7] Wang Y W, Lei H N, Bu M, *et al.* Distribution characteristics and identification of several typical blood cells under optical phase models[J]. Chinese Journal of Lasers, 2009, 36(10): 2629-2635. 王亚伟, 雷海娜, 卜敏, 等. 几种典型血细胞的光学相位模型及其分布特征与识别方法[J]. 中国激光, 2009, 36(10): 2629-2635.
- [8] Tao Z H, Ke K, Shi D Q, *et al.* Effect of environmental factors on staphyloxanthin biosynthesis based on laser tweezers Raman spectroscopy[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2017, 54(12): 123001. 陶站华, 柯珂, 师德强, 等. 利用光镊拉曼光谱研究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.
- [9] Wu Z J, Huang Y X, Wang C, *et al.* Normalization methods for ethanol Raman spectra quantitative analysis[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2010, 30(4): 971-974. 吴正洁, 黄耀熊, 王成, 等. 多种拉曼光谱归一化法对乙醇定量分析的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(4): 971-974.
- [10] Sun D J, Hu Y H, Gu Y L, *et al.* Determination and model construction of microbes' complex refractive index in far infrared band[J]. Acta Physica Sinica, 2013, 62(9): 094218. 孙杜娟, 胡以华, 顾有林, 等. 微生物远红外波段复折射率测定及模型构建[J]. 物理学报, 2013, 62(9): 094218.
- [11] Wang J S, Qiao D P, Lu Y Z, *et al.* Quantitative analysis of laser-induced breakdown spectroscopy in rock by using intensity normalization method[J]. Chinese Journal of Lasers, 2010, 37(1): 225-230. 汪家升, 乔东坡, 陆运章, 等. 强度归一化法定量分析岩石激光诱导击穿光谱[J]. 中国激光, 2010, 37(1): 225-230.
- [12] Zhai Y H, Lin Y P, Bai Y H, *et al.* Determination of oxygen content in chlorine by area normalization method[J]. Chlor-Alkali Industry, 2015, 51(2): 36-38. 翟英花, 林云鹏, 白贤红, 等. 采用面积归一化法测定氯气中氧的含量[J]. 氯碱工业, 2015, 51(2): 36-38.
- [13] Wang L, Hu X Q, Zheng Z J, *et al.* Radiometric calibration tracking for FY-3A/MERSI by joint use of polar stable snow targets[J]. Acta Optica Sinica, 2018, 38(2): 0212003. 王玲, 胡秀清, 郑照军, 等. 联合南北极冰雪目标的FY-3A/MERSI辐射定标跟踪监测[J]. 光学学报, 2018, 38(2): 0212003.
- [14] Wang J Y, Zhao N J, Duan J B, *et al.* Study of rapid species identification of bacteria in water[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2015, 35(9): 2634-2638. 王久悦, 赵南京, 段静波, 等. 水体细菌微生物种类快速鉴别方法研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(9): 2634-2638.
- [15] Bohren C F, Huffman D R. Absorption and scattering of light by small particles[M]. New York: John Wiley & Sons, 1983: 228-338.
- [16] 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.
- [17] Mourant J R, Campolat M, Brocke C, *et al.* 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.
- [18] 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): 933-945.
- [19] Fei Y T. Error theory and data processing[M]. Beijing: China Machine Press, 2015: 78-81. 费业泰. 误差理论与数据处理[M]. 北京: 机械工业出版社, 2015: 78-81.
- [20] Hoffmann L D, Bradley G L. Calculus for business, economics, and the social and life science[M]. 6th ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 1996.