

石雪梅, 蒲荣春, 郑江梅子, 等. 小体积水样中鼠伤寒沙门菌氨基磁珠富集的 LAMP 可视化检测方法[J]. 净水技术, 2023, 42(3): 189–197.
SHI X M, PU R C, ZHENG J M Z, et al. Visualized LAMP determination of *Salmonella typhimurium* in small volume water samples by amine-functionalized magnetic particle concentration[J]. Water Purification Technology, 2023, 42(3): 189–197.

小体积水样中鼠伤寒沙门菌氨基磁珠富集的 LAMP 可视化检测方法

石雪梅¹, 蒲荣春², 郑江梅子¹, 刘 恋¹, 阮 佳^{1,*}

(1. 成都医学院公共卫生学院, 四川成都 621000; 2. 南充市高坪区疾病预防控制中心, 四川南充 637100)

摘 要 研究建立了小体积(1 mL)水样中鼠伤寒沙门菌氨基磁珠富集-环介导等温扩增(LAMP)可视化检测方法。研究对氨基磁珠富集水中鼠伤寒沙门菌的 pH 和时间进行优化, 考察了氨基磁珠富集-LAMP 可视化检测方法的特异性、抗干扰能力和灵敏度, 并用所建立的方法对人工模拟水样和实际水样进行检测。在 pH 值=7.0 的条件下, 氨基磁珠与水样作用 60 min, 氨基磁珠对水中的鼠伤寒沙门菌的捕获效率接近 100%。氨基磁珠富集-LAMP 扩增体系特异性好, 抗干扰能力强, 对水中鼠伤寒沙门菌的检测灵敏度为 2.39 CFU/mL, 阳性结果可直接观察到反应管由橙黄色变成草绿色, 而阴性体系不变色。将所建立的方法用于人工模拟水样, 检测结果均为阳性, 对成都市新都区河流或景观湖等水样检测, 共检出 1 份鼠伤寒沙门菌阳性水样。本研究建立的氨基磁珠富集-LAMP 方法能够实现小体积水样中鼠伤寒沙门菌高效、准确的可视化检测。

关键词 水环境 鼠伤寒沙门菌 富集 氨基磁珠 环介导等温扩增(LAMP)

中图分类号: R123 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-0177(2023)03-0189-09

DOI: 10.15890/j.cnki.jsjs.2023.03.024

Visualized LAMP Determination of *Salmonella typhimurium* in Small Volume Water Samples by Amine-Functionalized Magnetic Particle Concentration

SHI Xuemei¹, PU Rongchun², ZHENG Jiangmeizi¹, LIU Lian¹, RUAN Jia^{1,*}

(1. School of Public Health, Chengdu Medical College, Chengdu 621000, China;

2. Nanchong Gaoping District Center for Disease Control and Prevention, Nanchong 637100, China)

Abstract A visualized determination method for the detection of *Salmonella typhimurium* in small volume water samples (1 mL) by amine-functionalized magnetic particle concentration-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was established in this study. In this research, the amine-functionalized magnetic particle concentration conditions, including the pH value and the enrichment time, were optimized. And the specificity, anti-interference performance and the sensitivity of the amine-functionalized magnetic particle concentration-LAMP method were investigated, respectively. What's more, the established method was used to detect the *Salmonella typhimurium* in artificially contaminated water samples and actual water samples, either. Under the optimized conditions (pH value of the enrichment solution was 7.0, and enrichment time was 60 min), the recovery rate of the *Salmonella typhimurium* in water samples was close to 100%. The amine-functionalized magnetic particle concentration-LAMP method showed a good specificity and anti-interference performance. And the sensitivity of the method for *Salmonella typhimurium* in water samples was 2.39 CFU/mL. The reaction tube could be changed from orange to green for positive result, but it was still orange for the negative result. The results were all positive for the artificial contaminated water samples by the amine-functionalized magnetic particle concentration-LAMP method. There was one *Salmonella typhimurium* positive water sample when the river and landscape lake samples in Xindu District, Chengdu City were detected by the established method. The amine-functionalized magnetic particle concentration-LAMP method established in

[收稿日期] 2022-09-04

[基金项目] 四川省自然科学基金项目(2022NSFSC0649); 成都医学院教育教学改革项目(JG202120); 四川省大学生创新创业训练计划项目(s201913705115)

[作者简介] 石雪梅(1998—), 女, 硕士, 主要从事心血管内科工作, E-mail: 2320262557@qq.com

[通信作者] 阮佳(1990—), 女, 博士, 主要从事卫生检验与检疫工作, E-mail: 1041819360@qq.com。

this research can visually detect the *Salmonella typhimurium* in small volume water samples effectively and accurately.

Keywords water environment *Salmonella typhimurium* concentration amine-functionalized magnetic particle loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

水环境是病原微生物的重要生存环境和传播介质。据世界卫生组织 (world health organization, WHO) 统计,每年约有 17 亿例儿童腹泻病病例产生,约 52.5 万名 5 岁以下儿童死于腹泻病,而受细菌、病毒和寄生虫污染的水源是造成儿童腹泻病的主要原因^[1]。由病原微生物引起的水污染是重要的公共卫生问题之一。建立水中致病菌高效、准确的可视化检测方法,有助于了解水环境中致病菌的污染情况,降低水源性疾病的发生。水中致病菌高效、准确的检测方法是确保水环境安全的重要技术支持。

水环境为低营养环境,且部分水样常常含有消毒剂成分,因此,水环境中微生物含量较低,超过 95% 的细菌以生物膜的形式存在,浮游形式存在的微生物不超过 5%^[2],直接对水样进行检测常常出现假阴性。因此,水样检测前需要对致病菌进行分离、富集。滤膜截留-洗脱、超滤、离心和磁珠分离等是目前常用的水中致病菌分离、富集方法^[3]。滤膜法需经过膜过滤、膜洗脱和洗脱液浓缩等步骤,且悬浮物会造成孔道堵塞,导致致病菌回收率下降。超滤法易操作,分离效率高,但需要专门的装置,且超滤膜成本较高^[4]。离心法一般适用于小体积水样,但方法成本高,处理时间较长。超顺磁氧化铁纳米颗粒(也称磁珠)通过表面修饰能有效地捕获水环境中的微生物,在磁场作用下定向移动,实现水环境中致病微生物的分离和捕获^[1,5-6]。根据磁珠表面修饰物的差异,可将其分为免疫磁珠和功能性磁珠。免疫磁珠是将特异性抗体修饰在磁珠表面,能特异、高效地富集目标细菌,但免疫磁珠成本较高^[5]。为拓展磁性材料的应用范围,除了在磁珠表面修饰特异性抗体,研究人员也将磁性颗粒与一些功能化或纳米材料结合用于捕获和富集水中的致病菌。刘晓晖^[5]比较了氨基磁珠、羧基磁珠和壳聚糖包被磁珠对水中大肠杆菌 O157:H7 的富集效率,结果表明在优化的条件下,氨基磁珠对水中大肠杆菌的吸附能力最高,吸附效率可达 100%。Huang 等^[6]用氨基修饰的硅包 Fe_3O_4 磁性纳米粒子分离了水和饮料中的大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等 8 种细菌,

分离效率可达 88.5%~99.1%。在一定 pH 条件下,带正电荷的氨基磁珠能够与带负电荷的细菌通过静电吸附作用富集水环境中的细菌^[7]。氨基磁珠富集方法无需对磁珠进行抗体标记,在磁珠表面修饰氨基基团成本较低且稳固,对水环境中的细菌吸附效率高,操作简单。

水环境中细菌富集后,需采用高效、灵敏、准确的方法对目标细菌进行检测。细菌分离培养是最早被广泛应用的检测方法^[8-9],随着人们对水质要求越来越高,培养法由于灵敏度低和操作耗时等缺点已不能满足高效、灵敏的检测需求。近年来,三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 检测方法^[10]、流式细胞术^[11]、基因测序^[12]、核酸扩增方法^[13-14]、生物传感器方法^[15]和微流控芯片^[16]等已被用于水中细菌的检测。ATP 检测方法灵敏度高,操作简单快速,但该方法比较适合检测营养物质丰富,且细菌处于对数期的水样,方法可靠性有待提高。流式细胞术常用于水中细菌总数的检测,若需区分细菌的种类只能依靠特异的荧光抗体,具有一定难度。高通量测序技术能一次性得到大量的基因组数据,提供丰富的遗传学信息,测量时间短,费用低,但该技术目前还不能实现现场快速检测。近年来,多种生物传感器和微流控方法也用于水中细菌的检测,这些方法比传统检测方法更加快速、灵敏、经济有效,但用于实际水样的检测稳定性还有待提高^[15]。聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 和环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 等核酸扩增技术也被广泛用于水中细菌的检测。PCR 技术检测目标细菌准确、灵敏,但 PCR 反应需要完成数十个变性、退火、延伸的循环,且 PCR 反应完成后,需采用电泳等方式检测扩增产物,不适合现场快速检测。LAMP 能够在恒温条件下高效、特异地扩增出目标基因。核酸电泳^[17]、观察焦磷酸镁白色沉淀、在反应液中加入荧光显色剂^[18](如 SYBR Green I)或金属离子指示剂(如钙黄绿素^[19]、羟基萘酚蓝^[20])等均可用于 LAMP 扩增产物的检测。核酸电泳、荧光强度测定需要专业的仪器设备,不适合现场快速检测;肉眼观察焦磷酸镁白

色沉淀会有主观性,对结果判断不准确。向 LAMP 扩增体系中加入钙黄绿素、羟基萘酚蓝等金属离子指示剂能够实现 LAMP 扩增产物的可视化检测。钙黄绿素作为显色指示剂常配合 Mn^{2+} 一起使用,反应前,向 LAMP 反应体系中加入 Mn^{2+} 淬灭的钙黄绿素,随着反应的进行,脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP)析出大量的焦磷酸根会与钙黄绿素竞争结合 Mn^{2+} ,游离的钙黄绿素恢复为黄绿色荧光,反应管从橙黄色变成草绿色,而阴性体系不变色^[19]。LAMP 反应无需热循环仪和昂贵的检测设备,选择合适的指示剂可实现现场可视化检测,非常适合基层应用和现场检测。

近年来,沙门菌已在多种不同水体中被检测到^[21],其是寄生于人和动物肠道内的革兰阴性杆菌。人类感染沙门菌后,一般会出现肠道疾病,对于年幼、年老及免疫力低下者,沙门菌的感染可能会扩散至血液,危及生命。据报道,每年沙门菌感染导致全世界 28 亿例腹泻^[22],造成全球 9 000 万例沙门菌病、15.5 万人死亡^[23],被污染的水和食物是主要的传染源。此外,沙门菌具有较强的抵抗力,能够在多种不同水环境中存活数月^[24],水环境也是其重要的传播途径。鼠伤寒沙门菌是最常见的沙门菌血清型之一,因此,本研究将以水环境中的鼠伤寒沙门菌为研究对象,建立小体积水样中鼠伤寒沙门菌氨基磁珠捕获富集-LAMP 可视化快速检测方法,以期在水环境中沙门菌的快速、准确、可视化检测提供一定技术支持。

1 试验仪器和材料

1.1 菌株

鼠伤寒沙门菌(SM2019XD019)、大肠杆菌(*E. coli* ATCC 25922)、产气荚膜梭菌(ATCC 13124)、空肠弯曲菌(KW2019ZY006)、铜绿假单胞菌(TL2019GY080)、奇异变形杆菌(ATCC 12453)、宋内志贺菌(ATCC 25931)、阪崎肠杆菌(ATCC 29544)、单增李斯特菌(PZ2018XPD02)、蜡样芽孢杆菌(CMCC63301),所有菌株均来自成都市新都区疾病预防控制中心。

1.2 主要试剂

氨基修饰磁珠(直径为 2 μm)购自海狸生物科技有限公司;Bst DNA Polymerase Large Fragment(带 10 $\times$ buffer 和 Mg^{2+})购自南京诺唯赞生物科技股份有

限公司;dNTP(10 $\mu mol/L$)购自宝日医生物技术(北京)有限公司; $MnCl_2$ 购自源叶生物科技有限公司;钙黄绿素购自 SIGMA-ALDRICH 公司; Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、HCl 和 NaOH 均购自福晨(天津)化学试剂有限公司;NaCl 购自天津博迪化工股份有限公司;营养肉汤和营养琼脂购自北京陆桥技术有限责任公司。

鼠伤寒沙门菌 LAMP 扩增引物参考李阳等^[25]的研究,序列如表 1 所示,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 鼠伤寒沙门菌 LAMP 引物序列
Tab. 1 LAMP Primer Sequence of *Salmonella typhimurium*

引物名称	序列(5'-3')
F3	ACCTTCCTCAGCCTTGAC
B3	ACTGACTTGCTATCTGCTATC
FIP	GGAGGACAAGATCCTTTATGTGCAAT-AAGCCTCCGCTAATTGTATG
BIP	TTACGTCGTGCGATGTCCGT-ACCGAAAGATAAAACCTCCAG

1.3 主要仪器

MyCycler TM Thermal Cycler(美国 BIO-RAD 公司);磁力架(Easyinno 创新实验室);VORTEX 3 旋涡混合器(德国 IKA 公司);离心机(Thermo Fisher 公司);高压蒸汽灭菌锅(致微仪器有限公司, G154DWS);电热恒温鼓风干燥箱(上海龙跃仪器设备有限公司, DHG-9146A);JY600E 电泳仪(北京君意华鑫科技有限公司, DHS-320 acid meter);PHS-320 智能多功能酸度计(成都世纪方舟科技有限公司);隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械有限公司, DHP-9082 型);振荡培养箱(常州国宇仪器有限公司, 2D-88)。

2 试验方法

2.1 细菌培养

将冻存的鼠伤寒沙门菌室温溶解,取 10 μL 菌液接种于无菌营养肉汤培养基中,37 $^{\circ}C$ 振荡培养 18 h 复苏细菌;再取 10 μL 菌液加至 25 mL 无菌营养肉汤培养基中,37 $^{\circ}C$ 振荡培养 24 h 后备用。

2.2 水中鼠伤寒沙门菌氨基磁珠富集

水样采集后,对于含有悬浮物的环境水样(如河流水、湖泊水等),采用无菌操作方法,用灭菌后的定性滤纸、漏斗和三角瓶等过滤水样,去除水中悬浮性杂质,而后向水样中加入 0.1 mol/L NaOH 或 0.1 mol/L HCl 溶液调节水样 pH 值至 7.0。对于没

有悬浮物的水样(如末梢水、纯净水等),可直接以无菌操作方法向水中加入 NaOH 或 HCl 调节水样 pH 值至 7.0。

水样 pH 调节后,以无菌操作向 1 mL 水样中加入 10 μ L 经无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)(后文中未经特别说明, PBS 质量浓度均为 50 mmol/L, pH 值为 7.0)洗涤后的氨基磁珠(10 mg/mL),置于 25 $^{\circ}$ C 振荡培养箱中孵育 60 min。而后磁性分离并弃上清液,用无菌 PBS 洗涤捕获有细菌的磁珠 1 次,磁性分离后弃上清液并加入 100 μ L 去离子水重悬,用于提取细菌核酸。

2.3 鼠伤寒沙门菌 LAMP 可视化检测

2.3.1 提取细菌 DNA

将 100 μ L 捕获有沙门菌的磁珠悬液置于沸水浴中加热 15 min,得到鼠伤寒沙门菌 DNA 模板,直接使用或-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.3.2 LAMP 可视化检测

LAMP 扩增体系:10 $\times$ Buffer 2.5 μ L, Mg²⁺(100 mmol/L) 1.5 μ L, dNTP(10 mmol/L) 3.5 μ L, MnCl₂(12.5 mmol/L) 1 μ L, 引物 F3/B3(5 μ mol/L) 1 $\times$ 2 μ L, 引物 FIP/BIP(40 μ mol/L) 1 $\times$ 2 μ L, 钙黄绿素(2.5 mmol/L) 1 μ L, DNA 模板 4 μ L, BstDNA 聚合酶 1 μ L, 用灭菌纯水补足总体积至 24 μ L。LAMP 扩增条件:95 $^{\circ}$ C 解链 10 min,立即取出反应管冰浴,加入 1 μ L Bst DNA 聚合酶,60 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,80 $^{\circ}$ C 保持 5 min 终止反应。每次扩增同时使用灭菌纯水替代 DNA 模板作为阴性对照。

2.4 氨基磁珠捕获水中鼠伤寒沙门菌条件优化

水样 pH、捕获时间影响氨基磁珠对水中鼠伤寒沙门菌的富集效果,本研究将对捕获 pH 和时间进行条件优化。

2.4.1 菌落计数

本研究采用平皿菌落计数法对样液中的鼠伤寒沙门菌进行计数。以无菌操作方法用灭菌吸管吸取 1 mL 或 200 μ L 充分混匀的样液,注入灭菌平皿中,倾注约 15 mL 已融化并冷却到 45 $^{\circ}$ C 左右的营养琼脂培养基,并立即旋摇平皿,使样液与培养基充分混匀。每次检测时,用另一个平皿只倾注营养琼脂培养基作为空白对照。37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后,选择菌落数在 30~300 个的平皿进行计数。

2.4.2 pH 优化

分别配制不同酸碱度的 50 mmol/L 磷酸盐溶液

(50 mmol/L Na₂HPO₄ 和 50 mmol/L KH₂PO₄),用 HCl 和 NaOH 将该溶液 pH 值分别调至 3.0、5.0、7.0、9.0 和 11.0。

将 2.1 小节中的鼠伤寒沙门菌菌液分别用不同 pH 磷酸盐溶液 10 倍倍比稀释,取 200 μ L 不同 pH、不同稀释度的菌液用平皿菌落计数法计数。同时,另取 200 μ L 不同 pH、不同稀释度的菌液,并向其中加入 10 μ L 用相应 pH 磷酸盐溶液(50 mmol/L)洗涤后的氨基磁珠(10 mg/mL),置于 25 $^{\circ}$ C 振荡孵育 1 h,孵育后磁性分离弃上清液,用相应 pH 磷酸盐溶液洗涤 1 次,弃上清液,加入 1 mL 相应 pH 的磷酸盐溶液重悬后,用平皿菌落计数法计数。考察氨基磁珠在不同 pH 条件下对水中鼠伤寒沙门菌的富集效果。

2.4.3 时间优化

将 2.1 小节中的鼠伤寒沙门菌菌液用 PBS 10 倍倍比稀释。分别取 200 μ L 不同稀释度的菌液,并加入 10 μ L 用 PBS 洗涤后的氨基磁珠(10 mg/mL),置于 25 $^{\circ}$ C 振荡培养箱中分别孵育 5、30、60 min 和 180 min,同时取 200 μ L 菌液在 25 $^{\circ}$ C 振荡培养箱中孵育相同时间作为对照。孵育后磁性分离弃上清液,用 PBS 洗涤 1 次,加入 1 mL PBS 重悬后,用平皿菌落计数法计数。对照孵育后直接倒入平皿培养后计数。考察孵育时间对富集效果的影响。

2.5 方法性能考察

2.5.1 干扰试验

将大肠杆菌、志贺菌、空肠弯曲菌和鼠伤寒沙门菌肉汤培养液分别用 PBS 10 倍倍比稀释,取 1 mL 不同稀释度的菌液采用平皿菌落计数法计数。

根据计数结果分别配制含有 4 种细菌、4 个不同浓度梯度的混合菌液(即每种菌浓度分别是 10⁵、10⁴、10³、10² CFU/mL),以及含有大肠杆菌、志贺菌和空肠弯曲菌的混合菌液(每种菌浓度为 10⁵ CFU/mL),向含有或不含沙门菌的不同浓度的混合菌液(1 mL)中分别加入 10 μ L 用 PBS 洗涤的氨基磁珠(10 mg/mL),按照 2.2、2.3 小节完成细菌的富集和可视化检测。

2.5.2 灵敏度

(1) LAMP 扩增灵敏度考察

将鼠伤寒沙门菌肉汤培养液用 PBS 10 倍倍比稀释,同时用平皿菌落计数法计数;提取不同浓度细菌的 DNA,按照 2.3 小节进行 LAMP 扩增和检测。

(2)氨基磁珠富集-LAMP 扩增灵敏度考察

将鼠伤寒沙门菌肉汤培养液用 PBS 10 倍倍比稀释,用平皿菌落计数法计数;不同浓度菌液取 1 mL,采用 2.2、2.3 小节进行细菌的富集和检测。

2.5.3 特异性

分别向 PBS 中加入 *E. coli*、产气荚膜梭菌、空肠弯曲菌、铜绿假单胞菌、奇异变形杆菌、宋内志贺菌、阪崎肠杆菌、单增李斯特菌和蜡样芽孢杆菌的肉汤培养液,制成非目标细菌菌液。采用 2.2、2.3 小节中所述细菌富集和检测方法,对非目标细菌进行检测。

2.6 水样检测

2.6.1 人工模拟水样

以超市购买的矿泉水或市售直饮水为样品,采用氨基磁珠捕获-LAMP 可视化检测方法检测,确定为阴性结果后,向水中加入不同浓度鼠伤寒沙门菌菌液,制备成鼠伤寒沙门菌浓度不同的人工模拟水样。采用 2.2、2.3 小节中细菌的富集和检测方法对水样进行检测。

2.6.2 实际水样

采集成都市新都区某河流或景观湖共 6 份水样,每份水样采样量为 500 mL。采用 2.2、2.3 小节中细菌的富集和检测方法对水样进行检测。

3 结果与讨论

3.1 富集条件优化

3.1.1 pH 优化

pH 影响氨基磁珠对水中鼠伤寒沙门菌的富集效果。在不同 pH 条件下,氨基磁珠对水中鼠伤寒沙门菌的捕获情况如表 2 所示。当 pH 值为 3.0、5.0、9.0 和 11.0 时,不论水样中细菌数量的多少,氨基磁珠对鼠伤寒沙门菌的捕获效率均较低,当 pH 值为 7.0 时,捕获效率最高。鼠伤寒沙门菌的等电点为 4.14^[26],氨基修饰磁珠的等电点为 9.6^[19],当 pH 值>4.14 时细菌带负电荷,当 pH 值<9.6 时氨基磁珠带正电荷,因此,当 4.14<pH 值<9.6 时,带正电的氨基磁珠可以通过静电吸附捕获带负电荷的鼠伤寒沙门菌,在此条件下捕获效率最高,与试验结果一致。pH 值为 5.0 时,捕获效率最高为 10.76%,pH 值为 7.0 时,捕获效率最高可达 100%,当 pH 值继续升至 9.0 时,捕获效率下降至 22.73%。试验结果证明,pH 值为 7.0 时,氨基磁珠对鼠伤寒沙门菌的捕获效率最佳,接近 100%。

表 2 不同 pH 值条件下氨基磁珠捕获水中鼠伤寒沙门菌的回收率

Tab. 2 Recovery Rate of *Salmonella typhimurium* in Water Samples Captured by Amine-Functionalized Magnetic Particles under Different pH Value Conditions

优化 pH 值	菌落总数/ (CFU·mL ⁻¹)	富集菌落数/ (CFU·mL ⁻¹)	回收率
3.0	>1 000	291	—
	754	28	3.71%
	103	10	9.71%
5.0	>1 000	426	—
	381	41	10.76%
	52	1	1.92%
7.0	>1 000	851	—
	318	299	94.03%
	37	38	100%
9.0	>1 000	217	—
	94	10	10.64%
	22	5	22.73%
11.0	328	0	—
	127	0	—
	26	0	—

3.1.2 时间优化

孵育时间也会影响氨基磁珠对鼠伤寒沙门菌的富集效率。本研究分别考察了不同孵育时间(5、30、60、180 min)下,氨基磁珠对水中不同浓度鼠伤寒沙门菌的富集效率。结果如表 3 所示。

表 3 不同富集时间氨基磁珠对水中鼠伤寒沙门菌的回收率
Tab. 3 Recovery Rate of *Salmonella typhimurium* in Water Samples Captured by Amine-Functionalized Magnetic Particles under Different Concentration Time

富集时间/ min	菌落总数/ (CFU·mL ⁻¹)	富集菌落数/ (CFU·mL ⁻¹)	回收率
5	363	77	21.21%
	60	15	25.00%
	7	1	14.29%
30	250	83	33.20%
	16	8	50.00%
	7	5	71.40%
60	505	499	98.81%
	34	29	85.29%
	8	7	87.50%
180	521	418	80.23%
	66	43	65.15%
	7	4	57.14%

由表 3 可知,当孵育时间为 5 min 时,3 个稀释倍数的细菌富集效率均最低。60 min 时 3 种稀释倍数的细菌捕获率最高,尤其是当水样中细菌浓度为 505 CFU/mL 时,达到了 98.81%,其余两个稀释倍数均已超过 85%。随着富集时间的延长,鼠伤寒沙门菌的富集效率没有提高,因此,最终选择的富集时间为 60 min。

3.2 方法性能考察

3.2.1 干扰试验

本研究考察了当水样中同时存在其他非目标细菌时,是否对鼠伤寒沙门菌的检测产生干扰。分别选择大肠杆菌、志贺菌、空肠弯曲菌作为干扰菌,考察不同浓度的干扰细菌存在时,是否影响鼠伤寒沙门菌的可视化检测。

根据大肠杆菌、志贺菌、空肠弯曲菌和鼠伤寒沙门菌平皿菌落计数法结果,将不同浓度的细菌稀释、混合,制成浓度分别为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 CFU/mL 的混合菌液,用于干扰试验的考察。干扰试验的结果如图 1 所示,当混合菌液中存在鼠伤寒沙门菌时,不论细菌浓度高低(菌浓度为 $10^2 \sim 10^5$ CFU/mL),LAMP 检测结果均为阳性(图 1 中 1~4 号),当混合菌液中不存在鼠伤寒沙门菌时,检测结果为阴性(图 1 中 5 号)。以上结果说明,氨基磁珠富集-LAMP 可视化检测方法对水中鼠伤寒沙门菌的检测在有不同浓度非目标细菌存在时是稳定可靠的,检测结果不受非目标细菌的影响。



注:1~4 号为 3 种干扰菌和 1 种目标菌的混合菌液,每种菌浓度依次为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 CFU/mL;5 号为 3 种干扰菌的混合菌液,每种细菌浓度为 10^5 CFU/mL;6 号为阴性对照。

图 1 干扰试验结果

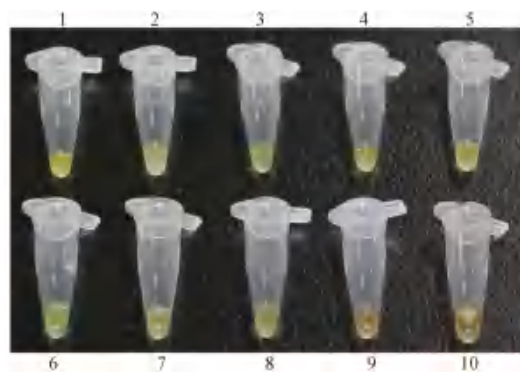
Fig. 1 Result of Interference Experiment

3.2.2 灵敏度

(1) LAMP 扩增灵敏度

将鼠伤寒沙门菌菌液 10 倍倍比稀释后,选择菌落数为 30~300 的平皿进行计数,结果显示第 7 管菌落数为 170 CFU/mL。提取不同浓度细菌的 DNA, LAMP 扩增结果如图 2 所示,当细菌浓度不低

于 17 CFU/mL 时(图 2 中 1~8 号),LAMP 扩增后反应液均变为草绿色,结果为阳性;细菌浓度为 1.7 CFU/mL 时(图 2 中 9 号),结果为阴性。该 LAMP 体系对鼠伤寒沙门菌的灵敏度为 17 CFU/mL。



注:1~9 号 LAMP 扩增的鼠伤寒沙门菌浓度依次 1.7×10^8 、 1.7×10^7 、 1.7×10^6 、 1.7×10^5 、 1.7×10^4 、 1.7×10^3 、 1.7×10^2 、17、1.7 CFU/mL;10 号为阴性对照。

图 2 LAMP 灵敏度结果

Fig. 2 Sensitivity Result of LAMP

(2) 氨基磁珠富集-LAMP 扩增灵敏度

将鼠伤寒沙门菌菌液 10 倍倍比稀释,对不同稀释度的菌液进行氨基磁珠富集-LAMP 可视化检测,考察氨基磁珠富集-LAMP 扩增对水中鼠伤寒沙门菌的检测灵敏度。菌落计数结果表明菌液第 7 个稀释度细菌的菌落数为 239 CFU/mL。不同浓度细菌经氨基磁珠富集-LAMP 扩增检测的结果如图 3 所示,当模板浓度不低于 2.39 CFU/mL 时(图 3 中 1~9 号),LAMP 扩增后反应液均变为草绿色,说明本



注:1~9 号 LAMP 扩增的氨基磁珠捕获后的鼠伤寒沙门菌浓度依次为 2.39×10^8 、 2.39×10^7 、 2.39×10^6 、 2.39×10^5 、 2.39×10^4 、 2.39×10^3 、 2.39×10^2 、23.9、2.39 CFU/mL;10 号为阴性对照。

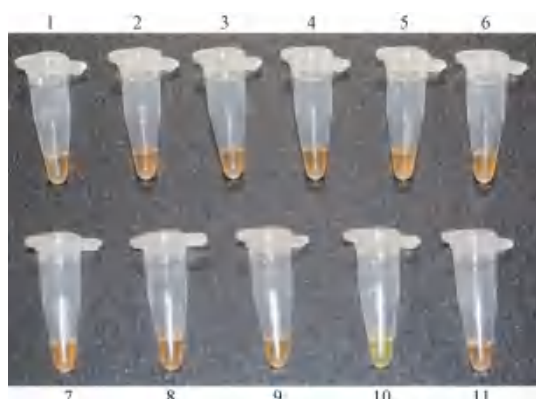
图 3 氨基磁珠富集-LAMP 灵敏度结果

Fig. 3 Sensitivity Result of Amine-Functionalized Magnetic Particle Concentration-LAMP Reaction

试验条件下对鼠伤寒沙门菌的检出限为 2.39 CFU/mL。氨基磁珠捕获-LAMP 扩增方法对水中鼠伤寒沙门菌检测的灵敏度为 2.39 CFU/mL。

3.2.3 特异性试验

利用所建立的氨基磁珠富集-LAMP 扩增方法分别对含有 9 种非目标菌株和鼠伤寒沙门菌的水样进行检测,结果如图 4 所示。只有被鼠伤寒沙门菌污染的水样经氨基磁珠富集-LAMP 扩增后体系变为草绿色(图 4 中 10 号),含有其他细菌的水样检测结果均为阴性。本研究建立的方法对水中鼠伤寒沙门菌的检测具有良好的特异性。



注:1~10 号依次为大肠杆菌(*E. coli* ATCC25922)、产气荚膜梭菌(ATCC13124)、空肠弯曲菌(KW2019ZY006)、铜绿假单胞菌(TL2019GY080)、奇异变形杆菌(ATCC12453)、宋内志贺菌(ATCC25931)、阪崎肠杆菌(ATCC29544)、单增李斯特菌(PZ2018XPD02)、蜡样芽孢杆菌(CMCC63301)、鼠伤寒沙门菌;11 号为阴性对照。

图 4 氨基磁珠富集-LAMP 特异性结果

Fig. 4 Specificity Result of Amine-Functionalized Magnetic Particle Concentration-LAMP Reaction

3.3 水样检测

3.3.1 人工模拟水样

用所建立的氨基磁珠富集-LAMP 扩增方法对人工污染矿泉水和直饮水模拟水样进行检测,含有不同浓度鼠伤寒沙门菌的水样检测结果均为阳性。

3.3.2 实际水样

用本研究所建立的氨基磁珠富集-LAMP 可视化检测方法分别检测成都市新都区河流或景观湖共计 6 份水样中的鼠伤寒沙门菌,结果如图 5 所示,1 份景观湖水样中鼠伤寒沙门菌检测结果为阳性,其余均为阴性。

以上结果表明,所建立氨基磁珠富集-LAMP 可视化检测方法能够用于实际水样中鼠伤寒沙门菌的



注:1~6 号分别为河流水样 1、河流水样 2、景观湖水样 1、景观湖水样 2、景观湖水样 3、景观湖水样 4。

图 5 实际水样检测结果

Fig. 5 Testing Results of Actual Water Samples

富集和检测。

4 结论

本研究建立了小体积水样中鼠伤寒沙门菌氨基磁珠富集-LAMP 可视化检测方法。对氨基磁珠富集水中鼠伤寒沙门菌的 pH 和富集时间进行优化,同时考察了氨基磁珠富集-LAMP 可视化检测方法的特异性、灵敏度和抗干扰能力,并将所建立的方法用于人工模拟水样和实际水样的检测。在优化后的富集条件下,氨基磁珠对水中鼠伤寒沙门菌的富集效率接近 100%;氨基磁珠富集-LAMP 可视化检测方法特异性好,灵敏度高,能够被用于实际水样的检测,检测结果可直接用肉眼观察,方便迅速。本研究建立的氨基磁珠富集-LAMP 可视化检测方法能够在 3 h 内完成水中鼠伤寒沙门菌高效、准确的可视化检测,有助于了解水环境中致病菌的污染情况,降低水源性传染病的发生,确保水环境的安全。

在本研究中,氨基磁珠富集-LAMP 可视化检测仅用于小体积水样(1 mL)的检测,取样量过少,可能出现假阴性,为了能够更加准确地检测出水样中是否含有目标细菌,建议先对大体积水样进行过滤-洗脱,再用氨基磁珠富集-LAMP 方法对洗脱液中的目标细菌进行检测。建立大体积水样中多种目标细菌的高效、准确、可视化检测方法是下一步研究的重点。

参考文献

- [1] 胡孔新, 张琪, 陈雪, 等. 洁净环境样本低浓度微生物高效富集检测及应用[J]. 中国环境科学, 2020, 40(11): 4893-4899.
HU K X, ZHANG Q, CHEN X, et al. Study on the convenient and efficient enrichment effect of new modified magnetic beads on low level microorganisms in the environment [J]. China Environment Science, 2020, 40(11): 4893-4899.
- [2] World Health Organization. Diarrhoeal disease [EB/OL].

- (2017-05-02) [2022-08-01]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.
- [3] 阮佳, 张薇薇, 朱家佑, 等. 水环境中病毒浓缩方法研究进展[J]. 中国测试, 2020, 46(4): 47-57.
- RUAN J, ZHANG W W, ZHU J Y, et al. A review on approaches of virus concentration from aquatic environment[J]. China Measurement & Test, 2020, 46(4): 47-57.
- [4] 李宏伟. 超滤膜技术在环境工程水处理中的应用分析[J]. 资源节约与环保, 2022(1): 104-107.
- LI H W. The application of the ultrafiltration membrane technology in environmental engineering water treatment[J]. Resources Economization & Environmental Protection, 2022(1): 104-107.
- [5] 刘晓晖. 水体中大肠杆菌富集新方法的建立[D]. 大连: 大连理工大学, 2016.
- LIU X H. Development of a new method for enrichment of *E. coli* in water[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2016.
- [6] HUANG Y F, WANG Y F, YAN X P. Amine-functionalized magnetic nanoparticles for rapid capture and removal of bacterial pathogens[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(20): 7908-7913. DOI: 10.1021/es102285n.
- [7] YOU J, WANG L, ZHAO Y, et al. A review of amino-functionalized magnetic nanoparticles for water treatment: Features and prospects[J]. Journal of Cleaner Production, 2020(281): 124668. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.124668.
- [8] 国家环境保护总局, 国家质量监督检验检疫总局. 地表水环境质量标准: GB 3838—2002[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- State Environmental Protection Administration, General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Environmental quality standards for surface water: GB 3838—2002[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002.
- [9] 中华人民共和国卫生部, 国家标准化管理委员会. 生活饮用水卫生标准: GB 5749—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- Ministry of Health of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Standards for drinking water quality: GB 5749—2006[S]. Beijing: Standards Press of China, 2006.
- [10] DEININGER R A, LEE J, CLARK R M. Rapid detection of bacteria in drinking water and water contamination case studies[J]. Frontiers of Earth Science, 2011, 5(4): 378-389. DOI: 10.1007/s11707-011-0206-x.
- [11] 刘晓露. 利用流式细胞仪对饮用水中细菌的快速检测[D]. 北京: 北京林业大学, 2014.
- LIU X L. A rapid detection method of microbes in drinking water by flow cytometry[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2014.
- [12] 王敏, 张雨桐, 黄晨, 等. 西安市景观湖泊水体细菌群落结构分析与代谢功能预测[J]. 环境科学, 2023, 44(2): 847-856.
- WANG M, ZHANG Y T, HUANG C, et al. Bacterial community structure and the prediction of metabolic function in landscape lake water in Xi'an[J]. Environmental Science, 2023, 44(2): 847-856.
- [13] 沈初盛, 刘柳影. PCR 技术在水体微生物检测中的应用[J]. 中国社区医师, 2021(29): 109-110.
- SHEN C S, LIU L Y. Application of PCR technology in water microorganism detection[J]. Chinese Community Doctors, 2021(29): 109-110.
- [14] 吴效晋, 刘刚, 胡洪营, 等. 环介导等温扩增(LAMP)技术检测水源病原菌[J]. 环境工程, 2021, 39(12): 10-17.
- WU X J, LIU G, HU H Y, et al. Detection of waterborne pathogens by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Environmental Engineering, 2021, 39(12): 10-17.
- [15] CANCIU A, TERTIS M, HOSU O, et al. Modern analytical techniques for detection of bacteria in surface and wastewaters[J]. Sustainability, 2021, 13: 1-25. DOI: 10.3390/su13137229.
- [16] PETRUCCI S, COSTA C, BROYLES D, et al. On-site detection of food and waterborne bacteria-current technologies, challenges, and future directions[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021(115): 409-421. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.06.054.
- [17] 许会会. 基于免疫磁珠与环介导等温扩增的牛奶中金黄色葡萄球菌检测方法的建立[D]. 长春: 吉林大学, 2011.
- XU H H. Development of detection for *Staphylococcus aureus* in milk based on immunomagnetic beads and loop-mediated isothermal amplification method[D]. Changchun: Jilin University, 2011.
- [18] 李若琳, 曹月, 梁宇晨, 等. 利用环介导等温扩增技术快速检测沙眼衣原体方法的建立[J]. 中国测试, 2020, 46(4): 65-69.
- LI R L, CAO Y, LIANG Y C, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Chlamydia trachomatis*[J]. China Measurement & Test, 2020, 46(4): 65-69.
- [19] 王雪. EHEC O157:H7 和空肠弯曲菌氨基磁珠-LAMP 检测方法的建立[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- WANG X. Development of ASMNPs-LAMP method for detection of EHEC O157:H7 and *Campylobacter jejuni*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015.
- [20] 黄梦诗, 杨倩倩, 张艳, 等. 海水中副溶血弧菌的可视化 LAMP 快速检测方法[J]. 中国渔业质量与标准, 2017, 7(6): 58-65.
- HUANG M S, YANG Q Q, ZHANG Y, et al. Rapid detection method of *Vibrio parahaemolyticus* in seawater based on visual LAMP[J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2017, 7

- (6): 58-65.
- [21] LIU H, WHITEHOUSE C A, LI B. Presence and persistence of *Salmonella* in water: The impact on microbial quality of water and food safety[J]. *Frontiers in Public Health*, 2018, 6: 159-171. DOI:10.3389/fpubh.2018.00159.
- [22] GUT A M, VASILJEVIC T, YEAGER T, et al. *Salmonella* infection-prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: A review [J]. *Microbiology-SGM*, 2019, 164 (11): 1327-1344. DOI: 10.1099/mic.0.000709.
- [23] BULA-RUDAS F J, RATHORE M H, MARAQA N F. *Salmonella* infections in childhood [J]. *Advances in Pediatrics*, 2015, 62(1): 29-58. DOI: 10.1016/j.yapd.2015.04.005.
- [24] TOPALCENGİZ Z, MCEGAN R, DANYLUK M D. Fate of *Salmonella* in central florida surface waters and evaluation of EPA worst case water as a standard medium [J]. *Journal of Food Protection*, 2019, 82 (6): 916-925. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-18-331.
- [25] 李阳, 陈立功, 张虎, 等. 沙门菌 LAMP 检测方法的建立 [J]. *中国家禽*, 2019, 41(4): 17-21.
- LI Y, CHEN L G, ZHANG H, et al. Establishment of a loop-mediated isothermal amplification technique to detect *Salmonella* [J]. *China Poultry*, 2019, 41(4): 17-21.
- [26] SAH P P, BHATTACHARYA S, BANERJEE A, et al. Identification of novel therapeutic target and epitopes through proteome mining from essential hypothetical proteins in *Salmonella* strains: An in silico approach towards antivirulence therapy and vaccine development [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2020, 83: 1-50. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104315.
-
- (上接第 180 页)
- WANG S, WANG T. "Quasi-category IV" water discharge standard—Engineering design of Dongying Wuliugan wastewater treatment plant [J]. *Tianjin Construction Science and Technology*, 2019, 29(7): 113-115.
- [20] 励梁栋, 朱强. 深床反硝化滤池+外压式超滤在城镇污水处理厂地表准 IV 类出水标准的应用实践研究 [J]. *环境科学与管理*, 2018, 43(10): 113-115.
- LI L D, ZHU Q. Application of deep-bed denitrification bio-filter and external pressure ultrafiltration in surface quasi IV effluent sewage treatment [J]. *Environmental Science and Management*, 2018, 43(10): 113-115.
- [21] 蒋晓松, 许灿. 反硝化滤池+浸没式超滤膜工艺在高标准污水处理厂提质改造中的设计应用 [J]. *低碳世界*, 2019, 9(9): 38-39.
- JIANG X S, XU C. Design and application of denitrifying filter+submerged ultrafiltration membrane process in upgrading of high standard sewage treatment plant [J]. *Low Carbon World*, 2019, 9(9): 38-39.
- [22] 王雪, 戴仲怡, 张晓临, 等. A²/O+MBR 工艺用于集约化高排放标准半地下式污水厂 [J]. *中国给水排水*, 2020, 36(4): 53-56.
- WANG X, DAI Z Y, ZHANG X L, et al. Application of A²/O+MBR process in intensive high discharge standard semi-underground wastewater treatment plant [J]. *China Water & Wastewater*, 2020, 36(4): 53-56.
- [23] 杜蓉, 李海龙, 刘壮, 等. A²/O-MBR-O₃ 工艺应用于城镇污水高标准处理工程 [J]. *工业用水与废水*, 2017, 48(4): 64-67.
- DU R, LI H L, LIU M, et al. Application of A²/O-MBR-O₃ process in high standard project of municipal sewage treatment [J]. *Industrial Water & Wastewater*, 2017, 48(4): 64-67.
- [24] 赵健. 北京垡头污水处理厂提标改造集约化设计方案 [J]. *净水技术*, 2019, 38(8): 32-46.
- ZHAO J. Proposal of integrated design for upgrading and reconstruction project of Beijing Fatou WWTP [J]. *Water Purification Technology*, 2019, 38(8): 32-46.
- [25] 何伟. 延庆某京标 A 出水标准污水处理厂工程案例 [J]. *江西化工*, 2020(2): 57-59.
- HE W. Project application of Beijing local standards A sewage treatment plant in Yanqing [J]. *Jiangxi Chemical Industry*, 2020(2): 57-59.
- [26] 李伟, 卢东昱, 陈永玲, 等. 北京市某污水厂基于准地表Ⅲ类水体出水标准的工程实践 [J]. *中国给水排水*, 2017, 33(2): 56-60.
- LI W, LU D Y, CHEN Y L. Engineering practice of a WWTP in Beijing City based on quasi-class Ⅲ criteria of surface water [J]. *China Water & Wastewater*, 2017, 33(2): 56-60.
- [27] 解东, 胡天媛, 段琦琦, 等. 某高标准出水乡镇污水处理厂工程设计与应用 [J]. *工业用水与废水*, 2019, 50(4): 77-80.
- XIE D, HU T Y, DUAN Q Q, et al. Project design and application of stringent specification town and village sewage treatment plant [J]. *Industrial Water & Wastewater*, 2019, 50(4): 77-80.