

智舌快速鉴定水产品多种致病性弧菌

赵广英¹, 黄建锋², 田师一¹, 邓少平¹

(¹浙江工商大学食品生物与环境工程学院,浙江省食品安全重点实验室,杭州 310035)

(²浙江省质量技术监督检测研究院食品检测部,杭州 310013)

摘要:【目的】探索研究能很好显示被检测液态食品样品综合信息的电子舌是否也能很好的显示致病性弧菌液体培养物的综合信息,籍此探讨一类致病性弧菌的快速鉴定鉴别新技术。【方法】基于多频脉冲伏安法的智舌,结合主成分分析,对源自水产品的 11 种致病性弧菌进行区分鉴定研究,得到最佳电极阵列和频率段组合。【结果】结果显示,区分致病性弧菌效果好的电极和频率段分别是:钛电极的 100 Hz、银电极的 100 Hz 和钨电极的 1 Hz、10 Hz。钨电极的 1 Hz 频率段能够独立的把 11 种致病性弧菌在同一张主成分得分图上区分开;钛电极的 100 Hz、银电极的 100 Hz 和钨电极的 10 Hz 两两组合也能把 11 种致病性弧菌主成分得分图上区分开。【结论】研究结果表明,智舌伏安法结合主成分分析法区分致病性弧菌是可行的,具有很大的持续研究价值,有望发展成一类很有发展优势的快速鉴定致病性弧菌乃至延伸至其他致病菌的新技术。

关键词:智舌;水产品;致病性弧菌;伏安法;主成分分析

中图分类号: Q93-3 文献标识码:A 文章编号:0001-6209 (2010) 01-0113-06

水产食品因其高蛋白、低脂肪、营养丰富、美味可口而备受人们青睐,是餐桌上食品的重要组成部分。目前,水产品在膳食组成中所占的比例,不但在沿海地区较大,就是在内陆,也是在不断增大的。人们在享受营养和美味的同时,有害因素诸如致病性弧菌、贝类毒素、甲肝病毒等对水产品的污染,导致发生的食物中毒和肠道传染病所造成危害也是非常大的。弧菌属 (*Vibrio*) 中的细菌种类很多,其中对人具有致病性的弧菌多达 12 种(《美国临床微生物手册》第六版,1995 年),是污染水产品最重要的致病菌,广泛存在于海水、淡水及其水生动物中,主要通过污染水产品而严重危害人类的健康,它们的感染途径和致病性不尽相同,主要通过消化道和创伤感染,引起食物中毒、肠道传染病、伤口感染、其它组织炎症和败血症等,还可引起水生生物的多

种弧菌病 (*Vibriosis*),特别是在炎热夏秋季节的沿海地区,是引起食物中毒事件发生的最主要食源性致病菌^[1-2]。在 12 种致病性弧菌中,危害最大、最常见的是副溶血性弧菌、霍乱弧菌和创伤弧菌^[3-4],O1 型霍乱弧菌被 WHO 定为检疫菌,副溶血性弧菌是水产品国际检测菌种。对同一种水产品通常同时存在多种致病性弧菌,而以往的检测方法,无论是用国内、国际上的标准检测方法、还是快速检测方法^[4-6],都是一个程序下来仅能鉴定一种弧菌,无论鉴定结果如何,所显示的就只能是这种弧菌的存在状况,而其他致病性弧菌的存在状况如何,不得而知,都不能全面显示被检水产品的弧菌存在的安全状况。基因芯片技术虽然能够达到检测的高通量,但其费用较高,广泛应用受到一定限制。而针对水产品致病性弧菌污染的检测,国内外要求越

基金项目:国家自然科学基金(30571623);浙江省食品科学与工程重中之重之重点学科开放课题(Z05-178)

作者简介:赵广英(1960-),女,黑龙江人,教授,现主要从事食品质量安全快速检测、人畜共患病和食品卫生微生物学检测的教学与科研工作。Tel: +86-571-88071024 转 8595; E-mail: zhaogy-user@163.com

收稿日期:2009-06-07;修回日期:2009-07-27

越来越严格,规定需要检测的种类也在不断增多。因此,研究一种能够同时检测和鉴别多种致病性弧菌的先进检测技术是很有必要的。另外,已有的无论是标准的还是快速的鉴定方法和技术,都各自有其优点,同时又各有其不足。只有更好,没有最好。因此,探求更好的致病性弧菌快速鉴定技术是有关研究人员的长期关注焦点和研究热点,是多级检验检疫部门准确、及时监测、监管、预防、质控和及时诊断等多方面有效实施的迫切需求。

电子舌是一种以具有低选择性、非特异性和交互敏感性的化学传感器阵列,结合合适的模式识别方式或多元统计方法构成的,检测溶液整体质量品质特征的现代化分析检测仪器。电子舌能够很好的显示液态样品的综合信息而成为液体食品诸如酒类、饮料等的品种区别、真假鉴别和示踪货架期品质变化的一种新型检测技术,因其具有无损样品、息量丰富、易智能化、使用寿命长、成本低廉、快速简便等优点而成为当前国内外有关领域关注的焦点和研究的热点,已经在液体食品的品质检测中有比较多的研究和应用^[7-9]。

不同种类的细菌菌体所含的酶系统不同,在同样的培养基中培养一定时间后,对营养基质的利用情况和所产生的产物就会不同。电子舌区别于其他检测系统的最大特点就是能够很好显示被测液体样品的综合信息。基于上述两方面的原因,设计将电子舌引入食品重要致病菌的快速检测领域,研究电子舌是否也能很好的显示致病性弧菌液体培养物的综合信息和鉴别不同种弧菌间的差异。试验用智舌^[10](Smartongue)鉴定11种常见的致病性弧菌,通过测试微生物生长过程中导致液体培养基成分的改变对该技术的可行性进行评价。基于伏安法原理的智舌,主要针对溶液中的还原、氧化活性物质进行响应,通过它得到关于微生物在一定的液体培养基中和确定的培养时间后的综合信息^[11-15],并结合主成分分析方法,得到智舌电极阵列中各电极对致病性弧菌的区分效果。本研究的目的在于,通过用电子舌对致病性弧菌的快速鉴定研究,为是否能够开拓一种具有多种优势、多学科交叉的新型食品微生物快速检测技术做重要的基础研究工作。研究结果展现了很好的可持续研究的前景。

1 材料和方法

1.1 材料 中国科学院微生物研究所期刊联合编委会

1.1.1 微生物:本研究用到11种致病性弧菌:副溶

血弧菌(*V. parahaemolyticus*)ZJGSMC-Vp0806、溶藻弧菌(*V. alginalyticus*)ZJGSMC-Va0806、创伤弧菌(*V. vulnificus*)ZJGSMC-Vv0712、拟态弧菌(*V. mimicus*)ZJGSMC-Vm0709、海鱼弧菌(*V. damsela*was)ZJGSMC-Vd0801、鲨鱼弧菌(*V. arcari*ae)ZJGSMC-Va0804、辛辛那提弧菌(*V. incinnatiensis*)ZJGSMC-Vi0712、麦氏弧菌(*V. metschnikovii*)ZJGSMC-Vm0803、霍乱弧菌非O1型ZJGSMC-Vc0705和O1型ZJGSMC-Vc0707(*V. cholerae* non-O1 and O1 serogroup)、梅氏弧菌(*V. metschnikovii*)ZJGSMC-Vm0710,均由本研究室经近6年时间从五十多份水产品中分离所得,并通过国标方法、微量生化管(弧菌鉴别)和API20E系统进行鉴定菌株。

1.1.2 主要试剂和仪器:碱性蛋白胨水(Akaline Peptone Water),购于杭州微生物试剂有限公司。该培养基置于115°C高压15 min灭菌。仪器:智舌(详见1.2节);电极阵列及参比电极,由天津艾达科技发展有限公司提供。

1.2 智舌

本研究所用智舌由浙江工商大学食品与生物工程学院邓少平教授的食品感官科学研究团队研制提供,是我国第一台具有自主知识产权和诸多优点的电子舌^[17-18]。电子舌的构成包括由钯(Pd)、金(Au)、铂(Pt)、银(Ag)、钛(Ti)、和钨(W)6种贵金属组成的工作电极阵列、Ag/AgCl参比电极及铂辅助电极三电极系统,一台多频脉冲扫描仪和一台用于处理测量和存储数据计算机。智舌采用了金属裸电极作为传感器组成传感器阵列,伏安法作为检测方法。伏安法解决了电位型传感器信噪比低的问题,金属裸电极传感器也解决了修饰电极制作困难和使用寿命的问题。

1.3 检测方法

1.3.1 菌悬液制备:每个菌种先于盛有7 mL碱性蛋白胨水的试管中培养18 h,由于菌生长的每个时期变化都很大,本研究选则确定了在各菌种活化后,转接于盛有50 mL碱性蛋白胨水的三角瓶培养7 h,作为样本每个菌种做4个样本,75°C水浴30 min,每个样本测3次求平均值。

1.3.2 检测:选用多频脉冲伏安法进行检测。其原理是以常规脉冲伏安法作为基元模式,增加了不同脉冲频率段上的阶段性变化,减短了常规脉冲伏安法的脉冲时间间隔。多频脉冲激发电位共有1 Hz、10 Hz和100 Hz3个脉冲频率段组成,分别相当于

脉冲时间间隔为 1 s, 0.1 s, 0.01 s 的脉冲伏安法。每个脉冲频率段的脉冲幅度均采用相同脉冲幅度变化, 从 1.0 V 开始, 然后每次变化 0.2 V 一直到 1.0 V。在两个不同的频率段之间插入 5 s 时间间隔, 以消除各个频率间响应迟滞的干扰。同时这种方法使智舌大大的增加了采集的信息量, 具有特异性和非特异性体系均适用, 响应速度快, 响应谱信息量大, 适宜智能化的特点, 能够更好的反映微生物及其代谢特点在液体培养基里的综合信息。

在伏安法检测过程中, 多频大幅脉冲传感系统通过传感器阵列对溶液连续测试 3 次。电极阵列有 6 种不同的电极, 每种电极又有 3 个频率段, 1 个电极的 1 个频率段的 1 次检测就有 35 个有用的数据, 然后分别对各电极频率段的数据求平均值, 即为 1 个时段被测液体的最终数据结果。每检测完一个被测液体后, 都要对电极阵列进行打磨, 蒸馏水冲洗; 参比电极用蒸馏水清洗, 然后用滤纸吸干。对于每个样品, 分别用同样的方法制作 4 份菌悬液进行检测, 每份菌悬液检测 3 次, 求平均值, 作为这一样品的检测结果。

研究检测 1 种细菌获得的实验数据量如下:

6 种电极 \times 3 个频率段 \times 35 个有用数据 \times 3 次重复 \times 4 份菌悬液 = 7560 个有用数据

本试验进行检测研究的 11 种细菌的数据量是:

7560 个有用数据 \times 11 种细菌 = 83160 个有用数据

1.4 数据处理

1.4.1 主成分分析: 对于获得的如此多的数据结果, 借助主成分分析方法的数据处理, 经过选择确定, 得到适宜反映各自被测物质本质特性的电极和频率段。主成分分析(principal component analysis, PCA)^[19-24]是一种多元统计分析技术。其中心目的

是将数据降维, 以排除众多化学信息共存中互相重叠的信息, 将原变量转换为成线性组合的少数几个新变量。同时, 新变量要尽可能多地表征原变量的数据结构特征而不丢失信息。并且, 新变量互不相关, 即正交。假设矩阵 X 为原始采集数据, 由 n 行(样品)和 P 列(特征值)构成, 通过主成分分析, 可以把矩阵 X 分解为:

$$X = TL' \quad (1-1)$$

式(1-1)中 T 为得分矩阵, 由 n 行和 d 列(主成分数目)构成; L 为载荷矩阵, 由 P 行 d 列构成, $T^T T$ 的对角线元素即为特征值。最后, 可以根据得分矩阵 T 作图, 给出样品之间的区分归类效果, 定性判断样品之间的整体品质差异性。根据载荷矩阵得到载荷图, 找出样品之间性质差异与各个变量之间的关系。

数据处理软件: SPSS13. 0。

1.4.2 区分辨识效果判别依据: 根据多频脉冲伏安法最初的设计, 按照 1.4.1 所述的数据处理方法, 比较传感器阵列中不同工作电极不同频率段在 11 种细菌的主成分得分图上的区分辨识效果, 确定不同工作电极在肠道细菌区分辨识上最适合的频率段, 通常主成分分析是依靠得分图区分效果的好坏, 依据统计学原理, 在此引入一个定量值 d 来表征不同类样品间的差异度, d 值表示两类样本之间的距离^[25], 如图 1 所示。其计算公式如式(1-2), 其中 d_{ab} 表示 a 组样品和 b 组样品之间的距离, σ_a 和 σ_b 分别为 a 组样品和 b 组样品的方差, $|Vmv|$ 为主成分得分图中得分点投影到新轴上的距离。根据本课题组长期实验经验得出, d 的最小值 $d_{min} > 2$ 时, 即可判别得分图区分效果好。

$$d_{ab} = \frac{2 + |Vmv|}{(\sigma_a^2 + \sigma_b^2)^{1/2}} \quad (1-2)$$

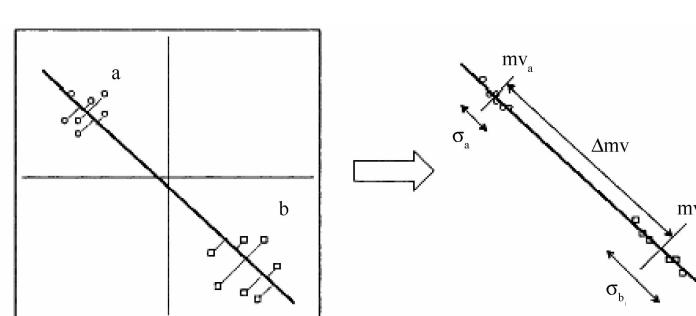


图 1 两个样本之间的距离 d 值的算法

Fig.1 The principle of caculating a separation term, d_{ab} between two cluster, a and b, in a score plot of obtained with PCA according to Eq. (1-2).

2 结果和讨论

在上述中,智舌分别测定了 11 种弧菌生长指数期的培养液,目的在于探讨智舌能否对不同物种进行分类。从生物学分类来看它们都属于同一个弧菌属,并且其中非 O 型霍乱和 O 型霍乱是属于同一个种。

智舌每个电极每次采集 35 组数据,并以这 35 组数据为变量进行主成分分析,得到主成分得分图。通过对 6 个电极 3 个不同频率段的主成分得分图进行比较,得到最佳的电极以及频率段组合。图

2-A 是钨电极 1 Hz 频率段的主成分得分图。它能很好的区分开 11 种致病性弧菌,并且任两种弧菌没有又叠加, d_{\min} 为 2.4。图 2-B 是钨电极的 10 Hz 频率段的主成分得分图。它只能区分其中 9 种致病性弧菌。其中智舌的钨电极的 10 Hz 频率段可能在测定溶藻弧菌和梅氏弧菌在这种培养基里的生长的敏感性很强,导致它们与其它几种菌有叠加。但图中 9 种致病性弧菌能很好的区分开,并且任两种弧菌没有又叠加, d_{\min} 为 2.6。在图中可以看出,拟态弧菌不同样本间的离散度相对较大,说明在这个时间段对培养影响相对活跃。图 2-C 是钛电极的

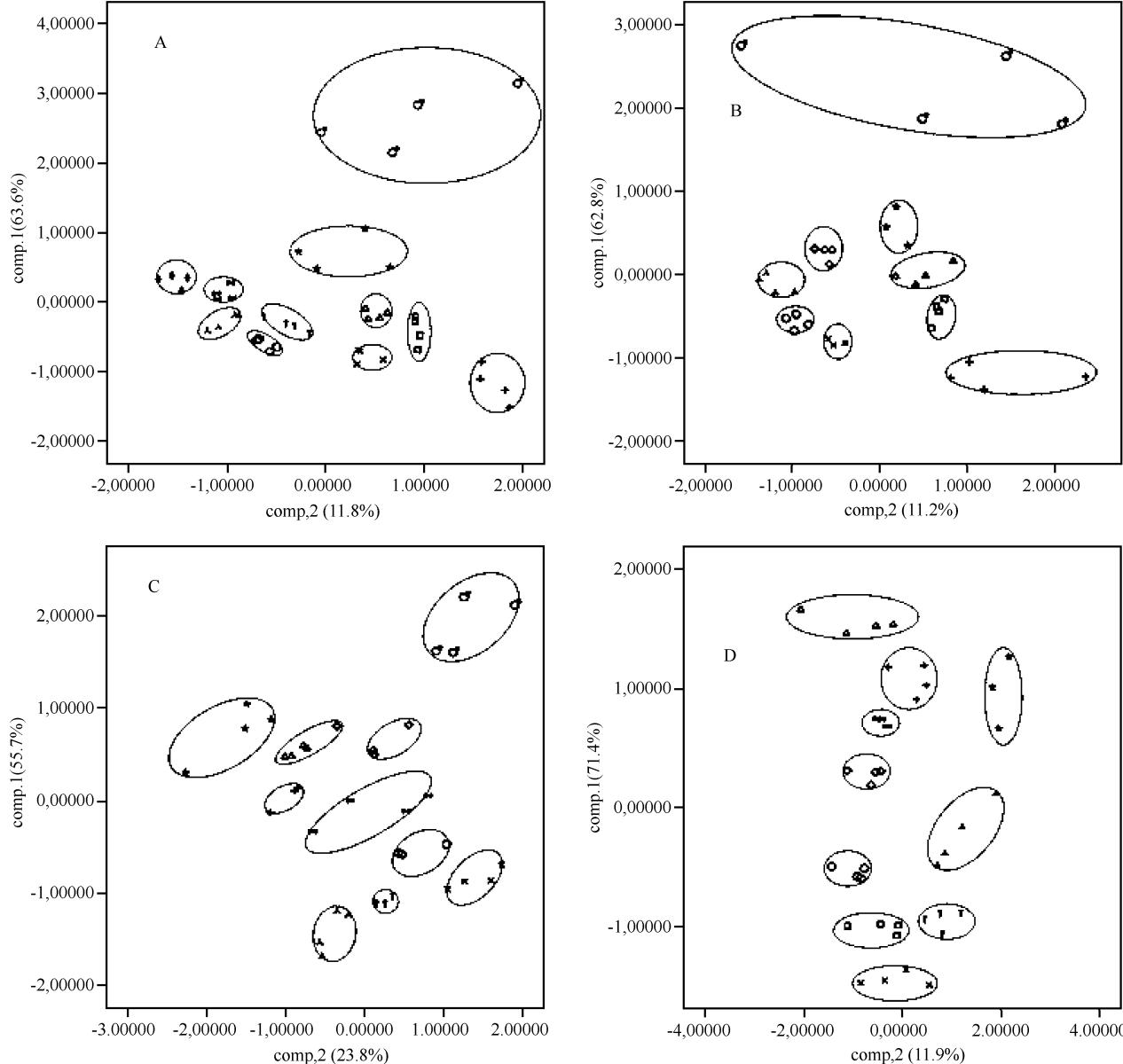


图 2 各种电极在不同频率段的主成分得分区分离效果图

Fig. 2 The classification property of the score plot of values of W electrodes in 1 Hz frequency segment (A), W electrodes in 10 Hz (B), Ti electrodes in 100 Hz (C) and Ag electrodes in 100 Hz (D). Symbols: \times V. cholerae non-O1; \square V. cholerae O1; \triangle V. parahaemolyticus; \diamond V. damselaensis; \diamond V. metschnikovii; \uparrow V. metschnikovii; \bowtie V. alginolyticus; $*$ arciae; \blacksquare incinnatensis.

100 Hz 频率段的主成分得分图。它能区分除海鱼弧菌外的其他 10 种弧菌, d_{min} 为 2.9。同样的拟态弧菌在这张得分图上有较大的离散度, 再一次说明了拟态弧菌的在培养基里生长代谢很活跃。图 2-D 是银电极在 100 Hz 频率段。它能区分除拟态弧菌以外的其他 10 种弧菌, d_{min} 为 2.7。通过研究表明, 钨电极在区分这 11 种致病性弧菌的表现是最好的, 特别是钨电极的 1 Hz 单独就能把 11 种致病性弧菌在一张主成分得分图上区分出来, 只是离散度相对小。而钛电极的 100 Hz 频率段、银电极的 100 Hz 频率段和钨电极的 10 Hz 频率段其中三者分别两两组合也能把 11 种致病性弧菌区分开。通过这些主成分得分图, 还可以发现, 智舌还可以把同种不同血清型的霍乱弧菌区分开。

综上所述, 6 个金属工作电极对 11 种致病性经菌区分辨识能力情况如表 1, 其中钨电极的 1 Hz 频率段和 10 Hz 频率段、钛电极的 100 Hz 频率段以及银电极的 100 Hz 频率段的主成分得分图的区分效果好。因此, 用智舌区分致病性弧菌是可能的。

表 1 不同工作电极对三类细菌主成分得分图区分效果比较结果

Table 1 The classification property of the score plots of the data from different working electrode for three kinds of bacteria frequency segment

Working electrode	Frequency segment(the Classification property of the score plots of PCA)		
	1 Hz	10 Hz	100 Hz
palladium electrode	bad	bad	bad
platinum electrode	bad	bad	bad
gold electrode	bad	bad	bad
silver electrode	bad	bad	well
titanium electrode	bad	bad	well
tungsten electrode	well	well	bad

well: $d_{min} > 2$ in the score plots of PCA, the classification property is good. Bad: $d_{min} < 2$ in the score plots of PCA, the classification property is bad.

3 结论

用智舌以伏安法进行测定, 通过不同的电极阵列组合以及结合主成分分析, 对 11 种主要的致病性弧菌的区分研究, 结果显示智舌的钨电极的 1 Hz 频率段能单分这 11 种致病性弧菌, 而银电极的 100 Hz 和钨电极的 10 Hz 三者两两组合也能把 11 种致病性弧菌主成分得分图上区分开, 可以看出, 智舌能够区分不同种的致病性弧菌。所以说, 经过进一步的研究和验证, 有望实现智舌检测系统成为检测和鉴别致病(性弧)菌的一种新型快速检测技术。频

脉冲电子舌它具有信息量丰富、易智能化、使用寿命长、成本低廉、快速简便等独有特点。这些优点可以弥补现有鉴定方法的一些不足。通过本研究可以发现, 智舌在快速鉴别鉴定致病微生物方面将会有很大持续研究价值和广泛的潜在应用前景。

参考文献

- [1] 何镜承, 吴仲采. 细菌学分析手册. 北京: 食品安全与营养生物中心出版, 1987: 494.
- [2] 吴后波, 潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病. 中国水产科学 (*Journal of Fishery Sciences of China*), 2001, 8(1): 90.
- [3] 王军, 于玺华, 白文林, 等. 霍乱弧菌及其他致病弧菌 DNA 多态性的研究. 中华医学杂志 (*National Medical Journal of China*), 1999, 12(79): 938-940.
- [4] 王斌, 李岩, 李霞, 等. 虾夷马粪海胆“红斑病”病原弧菌特性及致病性. 水产学报 (*Journal of Fisheries of China*), 2006, 30(3): 371-377.
- [5] 李宁求, 白俊杰, 吴淑勤, 等. 带石斑鱼 3 种致病性弧菌的分子生物学鉴定. 水产学报 (*Journal of Fisheries of China*), 2005, 29(3): 256-361.
- [6] 杨文鸽, 孙翠玲, 潘云娣, 等. 水产品中致病微生物的快速检测方法. 中国食品学报 (*Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*), 2006, 6(1): 402-406.
- [7] 丁茂文, 赵志刚, 李国雄. API 20E 和 20NT 对弧菌属细菌的鉴定分析. 临床检验杂志 (*Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*). 2003, 21(6): 384-388.
- [8] 黄秋婷. 电子舌技术及其在食品工业中的应用. 食品与发酵工业 (*Food and Fermentation Industry*), 2004, 30(7): 98-102.
- [9] 程秀娟, 朱虹, 郑丽敏, 等. 电子舌技术在饮料识别中的应用. 食品科技 (*Chinese Institute of Food Science and Technology*) 2006, 8: 163-168.
- [10] 田师一, 邓少平. 多频脉冲传感系统对酒类品种区分与辨识. 酿酒科技 (*Liquor-Making Science & Technology*), 2006 (11).
- [11] Deng SP, Tian SY, Chen ZX, et al. A novel electronic tongue based on multifrequency large amplitude pulse voltammetry. *International Symposium on Olfaction and Electronic Nose*, 2007, 5.
- [12] Soderstrom C, Rudnitskaya A, Legin A, et al. Differentiation of four *Aspergillus* species and one *Zygosaccharomyces* with two electronic tongues based on different measurement techniques. *Journal of Biotechnology*, 2005, 119: 300-308.
- [13] Turner C, Rudnitskaya A, Legin A, et al. Monitoring batch fermentations with an electronic tongue. *Journal of Biotechnology*, 2003, 103: 87-91.

- [14] Soderstrom C, Boren H, Winquist F, et al. Use of an electronic tongue to analyze mold growth in liquid media. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 83: 253-261.
- [15] Soderstrom C, Winquist F, Krantz-Rulcker C. Recognition of six microbial species with an electronic tongue. *Sensors and Actuators*, 2003, 89: 248-255.
- [16] Legin A, Kirsanov D, Rdnitskaya A, et al. Multicomponent analysis of fermentation growth media using the electronic tongue. *Talanta*, 2004, 64: 766-722.
- [17] 田师一. 多频脉冲传感系统系统的构建及应用. 浙江工商大学毕业论文, 2006.
- [18] 牛海霞. 农药残留多频脉冲传感系统快速检测方法学研究. 浙江工商大学毕业论文, 2007.
- [19] 何晓群. 多元统计分析. 北京: 中国人民大学出版社, 2004.
- [20] 梁逸曾, 俞汝勤, 化学计量学. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [21] 刘大龙, 方昉, 门洪, 等. 用于环境检测的电子舌研究. *传感器技术学报 (Chinese Journal of Sensors and Actuators)*, 2004 (1): 1-6.
- [22] 史永刚, 冯新沪, 李子存. 化学计量学. 北京: 中国石化出版社, 2002.
- [23] Wold S, Esbensen K. Principal component analysis. *Chemom Intell Lab Syst*, 1987; 37-52.
- [24] 薛薇. SPSS 统计分析方法及应用. 北京: 电子工业出版社, 2004.
- [25] Ivarsson P, Holmin S, Winquist F, et al. Discrimination of tea by means of a voltammetric electronic tongue and different applied waveforms. *Sensors and Actuators*, 2001, 76: 449-454.

Detection of pathogenic Vibrio by Smartongue

Guangying Zhao^{1*}, Jianfeng Huang², Shiyi Tian¹, Shaoping Deng¹

(¹ College Food Science and Biotechnology Engineering, Zhejiang Gongshang University, Food Safety Key Lab of Zhejiang Province, Hangzhou 310035, China)

(² Zhejiang Test Academy of Quality and Technical Supervision, Hangzhou 310013, China)

Abstract: [Objective] Electronic tongue is a modern analysis instrument and can detect very well the comprehensive information of liquid samples. Based on this, we employed the electronic tongue to detect the bacteria liquid culture, with the purpose of developing a new rapid method for the detection and identification of food-borne pathogens. [Methods] A novel voltammetric electronic tongue, smart tongue, was used to detect and differentiate 11 species of pathogenic *Vibrio*. Principal component analysis (PCA) was used to extract the relevant information obtained by the smart tongue. From the data evaluation, the score plots of PCA were obtained. [Results] According to the plots, we chose the most feasible working electrodes at the most favorable frequency segments were determined for our purpose. The results showed that the best electrode arrays and frequency segments to differentiate pathogenic *Vibrio* were titanium electrode in 100 Hz, silver electrode in 100 Hz and tungsten electrode in 1 Hz and 10 Hz, respectively. We differentiated 11 species of pathogenic *Vibrio* independently in the score plot of tungsten electrode in 1 Hz. We also distinguished all the *Vibrio* with the combination of two of other three electrodes and frequencies. [Conclusion] Smartongue could differentiate well 11 species of pathogenic *Vibrio* from the results analysed by PCA. It has a promising future as a novel modern rapid analytical technology for detecting and distinguishing the pathogenic *Vibrio*. The method and results could be a good stencil-plate to the research of detecting the other food-borne pathogens with smartongue, and good reference information for the further study.

Keywords: Smartongue; aquatic products; pathogenic *Vibrio*; principal component analysis; voltammetry

(本文责编:王晋芳)