

傅里叶近红外光谱法快速检测 5 种常见的食源性致病菌

刘斌^{1*}, 王珺¹, 李可², 方莹², 岳田利¹

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌 712100; 2. 浙江省检验检疫科学技术研究院, 杭州 310016)

摘要: **目的** 建立傅里叶近红外光谱法快速检测 5 种常见的食源性致病菌。**方法** 将 5 种常见致病菌的标准菌株和分离株分别富集培养, 再经冷冻干燥制备成菌粉, 利用傅里叶近红外光谱仪全波长扫描, 得其原始特征光谱, 由仪器自带 OPUS 软件进行光谱图预处理, 再用软件进行主成分分析和偏最小二乘法判别分析, 最后建立起快速鉴别菌种的模型。**结果** 最终显示偏最小二乘法模型优于主成分分析模型。偏最小二乘法模型提取的特征波段为 7506.1~6098.1 cm^{-1} , 选择的预处理方式是一阶求导和扣除一条直线, 其决定系数的平方 (R^2) 为 93.14% 较为接近 1, 交叉验证均方根的值 0.361 较为接近零, 预测偏差大于 3.82, 正确率达到 90%, 模型拟合良好。**结论** 该方法分析速度快, 产出多, 不用试剂, 不污染环境, 不破坏样品, 适合在线实时检测。

关键词: 傅里叶近红外光谱法; 食源性致病菌; 快速检测; 主成分分析; 偏最小二乘法判别分析

Rapid detection of 5 common foodborne pathogens by Fourier near infrared spectroscopy

LIU Bin^{1*}, WANG Jun¹, LI Ke², FANG Ying², YUE Tian-Li¹

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling 712100, China;
2. Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection & Quarantine, Hangzhou 310016, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid detection method for 5 common food-borne pathogens by Fourier near-infrared spectroscopy. **Methods** The standard strains and isolates of 5 common pathogens were enriched and cultured respectively, and then their cell powders were collected by freeze-dry. Their original characteristic spectra were obtained by full-wavelength scanning with Fourier near infrared spectrometer. The spectrogram was pretreated by OPUS software, and the processed data were subdivided into principal components. With partial least squares discriminant analysis, a rapid identification model finally establish for these 5 pathogens. **Results** The results showed that the partial least-square model was superior to the principal components analysis model. The characteristic band was extracted by the partial least-square model from 7506.1 to 6098.1 cm^{-1} . The prefabrication method adopted first derivation and deduction of a straight line. The square of the coefficient of determination (R^2)

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1602201)、国家自然科学基金项目(31471638)、浙江省公益性技术应用研究(分析测试)项目(2018C37015)、质检总局科技计划项目(2017IK206)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Project of China (2018YFC1602201), the National Natural Science Foundation of China (31471638), Zhejiang Public Welfare Technology Application Research (Analysis and Testing) Project (2018C37015), and the General Administration of Quality Supervision and Inspection Science and Technology Project (2017IK206)

***通讯作者:** 刘斌, 副教授, 主要研究方向为食品安全。E-mail: liubin7723@163.com

***Corresponding author:** LIU Bin, Associate Professor, College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, 22 Xinong Rd, Yangling 712100, China. E-mail: liubin7723@163.com

was 93.14%, which was close to 1. The root mean square error cross validation value was close to zero, residual predictive deviation was greater than 3.82, and the accuracy was 90%, which suggested that the model fitted well.

Conclusion This method has the advantages of fast analysis speed, high output, no reagent, no pollution to the environment, no damage to samples, and is suitable for on-line and real-time detection.

KEY WORDS: Fourier near-infrared spectroscopy; food-borne pathogens; rapid detection; principal components analysis; partial least-square method

1 引言

目前食品安全问题频发, 食源性致病菌对人们的健康和生命安全造成了巨大威胁, 其中沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、副溶血性弧菌、单核增生李斯特菌是我们日常生活中 5 种常见的食源性致病菌。

在食源性致病菌检测方面, 传统的微生物检验方法需要经过细菌培养、分离与鉴别、生化分析和血清学鉴定等过程, 检测结果虽较为准确, 但操作繁琐且耗时长, 特异性较差。近年来发展起来的各种新方法也各有优劣, 例如: 免疫学方法^[1-3]快速简便但灵敏度不高; 分子生物学方法^[4,5]灵敏度高, 但是需要专业人员及仪器; 生物传感器检测技术^[6-9]可用于检测致病菌及其产生的毒素, 样品不需要预增菌, 但传感器制备复杂等等, 这些都不适合现场的快速检测和大力推广^[10]。

基于傅里叶近红外光谱技术的食源性致病菌快速检测方法分析速度快, 产出多^[11], 且不破坏样品, 不用试剂也不污染环境, 适合在线实时检测。当前寻求一种快速灵敏简便可靠的检测方法迫在眉睫, 且对整个食源性致病菌检测也有很大意义。目前将傅里叶近红外光谱技术应用于沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、副溶血性弧菌、单核增生李斯特菌这 5 种常见的食源性致病菌的同时快速检测的研究相对较少。

本实验以这 5 种常见食源性致病菌标准菌光谱特征信息做基础, 建立基于里叶近红外光谱技术(fourier near-infrared spectroscopy, FT-NIR)的快速分析模型, 并对其建模结果进行分析, 得到具有信息完善、代表性的鉴定模型。利用主成分分析法(principal components analysis, PCA)先行建模增强模型预测性能, 结合偏小二乘法(partial least-square method, PLS), 为近红外快速检测几种常见食源性致病菌提供新方法。

2 材料与amp;方法

2.1 仪器与试剂

MPA 傅里叶变换近红外光谱仪(德国布鲁克公司); DGX-9143BC 电热恒温鼓风干燥箱(上海福玛试验设备有限公司); HC-3018R 高速冷冻离心机(安徽中科中佳仪

器有限公司); ES-315 高压蒸汽灭菌锅(日本 TOMY 公司); MCFD 真空冷冻干燥机(美国 SIM 公司)

胰蛋白胨、酵母浸粉、蛋白胨、脱水小牛脑浸粉、脱水牛心浸粉(北京陆桥技术股份有限公司); 无水乙醇、氯化钠、生理盐水、葡萄糖、磷酸氢二钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

标准菌株: ATCC13076 沙门氏菌(*Salmonella*)、ATCC25923 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、ATCC17802 副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、ATCC10890 单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)(美国典型菌株保藏中心); CMCCB76330 蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)(中国医学细菌保藏管理中心)。

2.2 实验与方法

2.2.1 溶液配制

LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母浸粉 5 g/L, 氯化钠 10 g/L。

BHI 液体培养基: 蛋白胨 10.0 g/L、脱水小牛脑浸粉 12.5 g/L、脱水牛心浸粉 5.0 g/L、氯化钠 5.0 g/L、葡萄糖 2.0 g/L、磷酸氢二钠 2.5 g/L。

2.2.2 样品前处理

选取沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、副溶血弧菌, 单核增生李斯特菌的标准株和分离株各一株接种于 5 mL 培养基中, 在 37 °C 恒温培养箱培养 12 h。后取出 1 mL 接种于 200 mL 培养基中, 扩大培养 24 h。将富集培养后的菌液以离心力 6000×g 离心 10 min, 去上清收集菌体。再用 0.9% 的生理盐水洗涤 3 次, 置于 -80 °C 冰箱预冷 12 h。用真空冷冻干燥机干燥 48 h 后, 用玛瑙研钵研磨成粒度均一的菌粉备用。

2.2.3 样品检测

将制备好的菌粉置于近红外光谱仪自带的细管中进行全波长光谱扫描, 模式设定为积分球漫反射模块, 由于 Rodriguez-saona 等^[12]已经比较了脱氧核糖核酸, 卵磷脂, 糖原, N-乙酰胞壁酸标准品的近红外光谱和全细胞扫描近红外光谱, 并且对全细胞扫描光谱的主要谱峰进行了归属分析, 发现微生物细胞近红外原始光谱主要吸收峰为: 5776、5154、4866、4606、4334、4259 和 4048 cm^{-1} , 故本次实验的全细胞光谱扫描范围设定为 10000~4000 cm^{-1} , 扫描 64 次。

3 结果与分析

3.1 5 种常见致病菌的近红外光谱图

本实验收集了 5 种常见致病菌的近红外光谱 60 个, 图 1 是 5 种菌在 7000~4000 cm^{-1} 波数范围内得平均光谱。

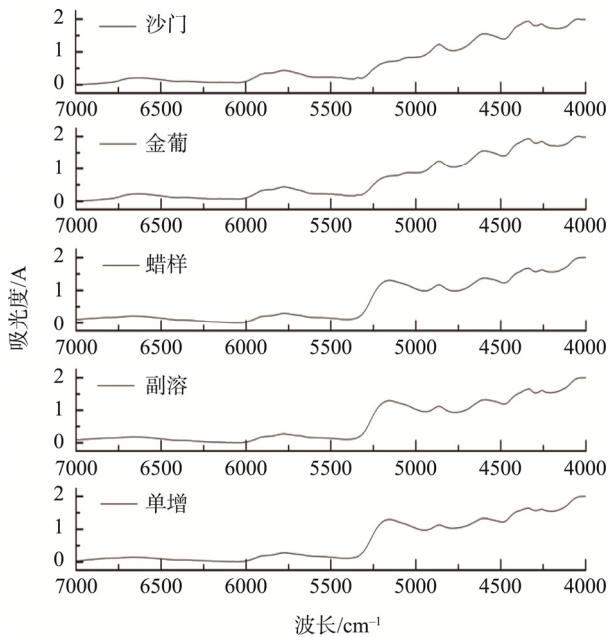


图 1 5 种常见致病菌的近红外光谱

Fig.1 FT-NIR spectra of 5 common pathogens

3.2 主成分分析模型建立

由图 1 可知, 几种菌的光谱信息相似, 肉眼不可辨其差别, 根据相关文献^[13]选用 4000~7000 cm^{-1} 波段的光谱信息进行分析, 在预处理数据阶段选用了基线校准, 平滑, 最大最小归一化, 一阶求导这几种预处理方法。将一阶求导后的结果导入到 SPSS 软件中进行主成分分析, 提取出的第一主成分的特征值是 8.991, 占总体变异的 81.740%; 同理, 第二主成分的特征值为 1.005, 占总体变异的 13.369%; 虽然第三主成分的累计贡献率没有达到 99%, 但是因为其值小于 1, 其并不是我们要提取的主成分。故最后用本次实验提取的 2 个主成分进行 PCA 二维处理^[14]。发现 5 种菌大部分都聚集在一起, 不能很好的进行聚类分析。

3.3 偏最小二乘法模型建立

本研究运用 OPUS 软件, 选择 Setup Quant 2 method 进行 PLS 模型建立。此种模型通过留一法交叉验证法来评价所建立的 PLS 模型质量的好坏, 其中决定系数的平方(R^2)越接近于 1, 交叉验证均方根的值(root mean square error cross validation, RMSECV)越接近零, 预测偏差(residual predictive deviation, RPD)的值越大, 说明该模型越准确^[15]。

光谱数据通过初步建模, 判断此种模型的可行性, 并依据 RMSECV 的值作为各模型的精度衡量标准^[15], 自动为数据选择不同的预处理方式, 进行建模优化。最终, 提取波段 7506.1~6098.1 cm^{-1} 为特征波段, 选择的预处理方式为一阶求导和扣除一条直线进行正式建模, 决定系数的平方(R^2)增大, 为 93.14% 较为接近 1, 交叉验证均方根的值变小, 为 0.361 较为接近零, RPD > 3.82, 相比较预处理前的模型更为精确。

最后对模型进行验证, 按照训练集和验证集 2:1 的比例, 随机选择 20 条光谱作为训练集, 10 条光谱作为验证集对模型的准确性进行考察。可以看出由于选择的样品量减少, 模型的准确度逐渐增加。模型的正确率达到 90%, 在设置置信区间是 95% 的情况下, $P=0.343 > 0.05$, 说明近红外光谱的预测值和真值无显著性差异(如表 1)。其中真值为 3 的菌是沙门氏菌, 被误判为单核增生李斯特菌。综合考虑, 这次误判可能是因为光谱的采集环境, 或是由于随机误差, 系统误差等等的影响造成。

表 1 PLS 模型验证
Table 1 Results of PLS model

编号	样品名	真值	预测值
1	CMCCB76330-1	1	1
2	ATCC10890-2	4	3
3	774-2	2	2
4	ATCC17802	2	2
5	201000293-3	1	1
6	11101-2	3	3
7	ATCC17802	3	3
8	CMCC54002-1	4	4
9	CNF00001	5	5
10	ATCC19118	4	4

$P=0.343 > 0.05$

4 结论

本实验利用傅里叶近红外光谱仪对五种常见食源性致病菌全细胞扫描, 结合化学计量法, 运用主成分分析和偏最小二乘法判别分析分别建模, 结果显示 PLS 模型优于 PCA 模型。在此基础上我们可以探究更多食源性致病菌的无损快速检测。目前由食源性致病菌引起的食品安全问题频发, 类似的研究对于寻求更方便快捷的现场检测方法具有重要作用。

参考文献

- [1] 宋丽萍, 姜洁, 李玮, 等. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. 食

- 品安全质量检测学报, 2015, 6(9): 3441–3446.
- Song LP, Jiang J, Li W, *et al.* Advances in rapid detection of food-borne pathogens [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(9): 3441–3446.
- [2] Brignon RL, Zam SG, Wilson. Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs and chicken with enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Poult Sci*, 1995, 74(7): 1232–1236.
- [3] 李建科, 王峰, 夏凯. 苹果浓缩汁中耐热菌的间接 ELISA 快速检测方法[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(22): 4669–4677.
- Li JK, Wang F, Xia K. Rapid indirect ELISA detection of thermostable bacteria in apple juice concentrate [J]. *Agric Sci China*, 2011, 44(22): 4669–4677.
- [4] Cheng CM. Rapid detection of *Salmonella* in foods using real-time PCR [J]. *J Food Prot*, 2009, 71(12): 2436–2441.
- [5] De-Medici D, Croci L, Delibato E, *et al.* Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green i real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype enteritidis in poultry [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(6): 3456–3461.
- [6] 苏粉良, 李冰燕, 陈雨欣, 等. 食源性致病菌的检测技术研究进展[J]. *农产品加工*, 2018, 4: 58–61.
- Su FL, Li BY, Chen YX, *et al.* Progress in detection technology of foodborne pathogens [J]. *Farm Prod Process*, 2018, 4: 58–61.
- [7] Luo J, Liu X, Tian Q, *et al.* Disposable bioluminescence-based biosensor for detection of bacterial count in food [J]. *Anal Biochem*, 2009, 394(1): 1–6.
- [8] Zhang ZJ, Wang CX, Zhang LR. Fast detection of *Escherichia coli* in food using nanoprobe and ATP bioluminescence technology [J]. *Anal Methods*, 2017, 9(36): 5378–5387.
- [9] 肖芳斌, 刘瑞, 占忠旭, 等. 生物传感器在食源性致病菌检测中应用的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2019, 6(2): 1–9.
- Xiao FB, Liu R, Zhan ZX, *et al.* Progress in the application of biosensors in the detection of foodborne pathogens [J]. *Chin J Biotech*, 2019, 6(2): 1–9.
- [10] 陈秀琴, 黄梅清, 郑敏, 等. 食源性致病菌快速检测技术及其应用研究进展[J]. *福建农业学报*, 2018, 33(4): 438–446.
- Chen XQ, Huang MQ, Zheng M, *et al.* Advances in rapid detection technology and application of foodborne pathogens [J]. *Fujian J Agric Sci*, 2018, 33(4): 438–446.
- [11] 王建明, 王武, 李祥辉, 等. 基于傅里叶近红外特征光谱的血流感染致病菌鉴别研究[J]. *福州大学学报(自然科学版)*, 2017, 45(5): 713–718.
- Wang JM, Wang W, Li XH, *et al.* Identification of pathogenic bacteria of blood influenza based on Fourier near infrared characteristic spectroscopy [J]. *J Fuzhou Univ (Nat Sci Ed)*, 2017, 45(5): 713–718.
- [12] Rodriguez-Saona LE, Khambaty FM, Fry FS. Rapid detection and identification of bacterial strains by Fourier transform near-infrared spectroscopy [J]. *J Agric food Chem*, 2001, (49): 574–579.
- [13] 王若男, 岳田利, 袁亚宏, 等. 基于傅里叶变换近红外光谱的脂环酸芽孢杆菌种间分类鉴定[J]. *光谱学与光谱分析*, 2015, 35(11): 3073–3077.
- Wang RN, Yue TL, Yuan YH, *et al.* Interspecific taxonomy and identification of *Bacillus alicyclicum* based on Fourier transform near infrared spectroscopy [J]. *Spectrosc Spect Anal*, 2015, 35(11): 3073–3077.
- [14] 岳田利, 王军, 袁亚宏, 等. 基于 FT-NIR 的微生物快速鉴定方法研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(11): 2945–2949.
- Yue TL, Wang J, Yuan YH, *et al.* Rapid identification of microorganisms based on FT-NIR [J]. *Spectrosc Spect Anal*, 2010, 30 (11): 2945–2949.
- [15] 洛曲, 于修焯, 张建新, 等. 基于近红外光谱的藏区酥油脂肪和蛋白质含量快速检测分析[J]. *中国油脂*, 2018, 43(3):136–140.
- Luo Q, Yu XZ, Zhang JX, *et al.* Rapid detection and analysis of butter fat and protein content in Tibetan region based on near infrared spectroscopy [J]. *China Oils Fats*, 2018, 43(3): 136–140.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



刘 斌, 副教授, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: liubin7723@163.com