

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(4):538-546; 4 April 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

智舌快速检测副溶血弧菌簇类独立软模式识别的建立

黄建锋, 赵广英*, 窦文超

浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江省食品安全重点实验室, 杭州 310035

摘要:【目的】为探索一种新型食品致病菌的快速检测方法。【方法】用基于多频大幅脉冲伏安法为基元模式的智舌, 结合簇类的独立软模式识别方法, 检测样本培养物的综合信息并进行类别分析, 建立智舌结合主成分分析的副溶血弧菌簇类独立软模式的判别模型。【结果】经过对6个工作电极3个频率段检测分析模型比较, 得到最佳电极及频率段组合: 钨电极 1 Hz、钨电极 100 Hz 和银电极 100 Hz。用这3个模型判别10种致病性弧菌, 得到钨电极 1 Hz 频率段的模型判别海鱼弧菌、梅氏弧菌、溶藻弧菌、辛辛那提弧菌、麦氏弧菌和O型霍乱弧菌的检验集, 钨电极 100 Hz 频率段的模型判别拟态弧菌和创伤弧菌检验集, 银电极 100 Hz 频率段的模型判别鲨鱼弧菌和非O型霍乱弧菌检验集的判别准确率都达100%。【结论】智舌结合簇类的独立软模式识别方法能够有效的判别副溶血弧菌和其他致病性弧菌, 有望成为一种新的快速检测副溶血弧菌的新检测方法。

关键词: 快速检测方法, 智舌, 主成分分析, 簇类的独立软模式, 副溶血弧菌

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)04-0538-09

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)^[1-2] 是一种嗜盐性弧菌, 革兰阴性呈弧状, 无荚膜, 无芽胞, 菌体一端长有鞭毛, 运动活跃。主要存在于近海岸的海水、海底沉积物和鱼类、虾类、贝类、牡蛎等海产品中。人多因食用被本菌污染且未煮熟的海产品而引起中毒, 在细菌性食物中毒中, 比例高、危害大, 特别在夏、秋季沿海地区, 是海产品食物中毒和急性腹泻的主要病原菌。快速、简便、经济、可靠的副溶血弧菌的检测技术, 是监测、监管、预防、质控和及时诊断等多方面有效实施的保障, 是多级检验检疫部门的迫切需求。因此, 探求更好的快速检测技术是有关研究人员的长期关注焦点和研究热点。

电子舌是一类具有低选择性、非特异性和交互敏感性为特点的化学传感器, 结合合适的模式识别

方式或多元统计方法, 检测溶液整体品质特征, 是现代的分析检测仪器。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、信息量丰富、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。

细菌种类不同, 所含酶系统及其代谢途径亦不同, 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, 使液体培养物的整体性状具有菌种的特征性。电子舌能够很好鉴别被测液体样品的整体综合信息。将电子舌应用

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重点学科开放课题(Z05-178)

* 通信作者。Tel: +86-10-88071024 ext 8595; E-mail: zhaogy-user@163.com

作者简介: 黄建锋(1982-), 男, 浙江金华人, 现主要从事食品卫生微生物的检测与科研工作。

收稿日期: 2009-10-19; **修回日期:** 2011-01-18

到食源性致病菌的分析与检测中,国外科学家已经做了有关方面的初步研究,也有几篇相关的报道^[4-7]。本试验用智舌(一种智能电子舌)检测 11 种不同的致病性弧菌,并通过基于主成分分析的簇类独立软模式(SIMCA)识别方法,得到副溶血弧菌 SIMCA 模型,并用此模型对其他致病性弧菌进行判别,得到判别结果,建立副溶血性弧菌的快速检测方法,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

1.1.1 弧菌:本研究用到 11 种致病性弧菌,即拟态弧菌(*V. mimicus*) ZJGSMC Vm0709、鲨鱼弧菌(*V. carcariae*) ZJGSMC Va0804、溶藻弧菌(*V. algalyticus*) ZJGSMC Va0806、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*) ZJGSMC Vp0806、辛辛那提弧菌(*V. cincinnatiensis*) ZJGSMC Vi08712、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、麦氏弧菌(*V. metschnikovii*) ZJGSMC Vm0803、梅氏弧菌(*V. metschnikovii*)、海鱼弧菌(*V. damsela*) ZJGSMC Vd0801,霍乱弧菌非 O1 型 ZJGSMC Vc0705 和 O1 型 ZJGSMC Vc0707 (*V. cholerae* non-O1 and O1 serogroup),均由本研究室提供。

1.1.2 主要试剂和仪器:碱性胨水购自杭州微生物试剂有限公司。该培养基置于 115℃ 高压 15min 灭菌。智舌,浙江工商大学邓少平教授课题组研制;数显恒温水浴锅 HH-6,购自国华电器有限公司,隔水式恒温培养箱 GRP 9080 型购自上海森信实验仪器有限公司,170-SX 型傅立叶红外光谱仪购自 Thermo Nicolet 公司,电子分析天平购自奥豪斯国际贸易有限公司,PHS-3E pH 计购自上海雷磁精密仪器有限公司,手提式压力蒸汽灭菌锅购自上海博迅实业有限公司医疗设备厂,超净工作台 SW-CJ-ZFD 型双人单面净化工作台购自苏州净化设备有限公司。菌悬液制备^[8]:本研究选取各菌种指数期阶段的培养物作为检测样本,副溶血弧菌培养 10 个样本作为判别集,其他 10 种弧菌各培养 6 个样本,作为检验集。

1.2 智舌

本研究所用智舌^[9-11]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的计算机。

1.3 检测方法

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(图 1),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 Hz 3 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 2 个不同的频率段之间插入 5 s 时间间隔,以消除各个频率段间响应迟滞的干扰。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在液体培养基里的综合信息。

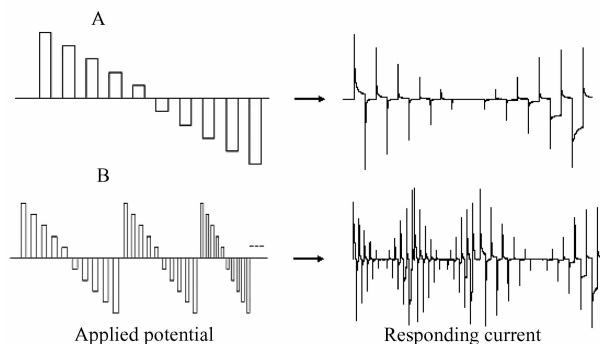


图 1 脉冲伏安法电势激发和电流响应信号

Fig. 1 The applied potential and response current of pulse voltammetry. A: conventional large amplitude pulse voltammetry; B: Multifrequency large amplitude pulse voltammetry

在伏安法检测过程中,智舌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 6 份菌悬液(副溶血性弧菌制作 10 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 × 3 个频率段 × 35 个有用数据

× 3 次重复 × 6 份菌悬液 = 11340 个有用数据

1.4 数据处理

1.4.1 SIMCA 模式识别方法:方法^[12-14]是一种建立在主成分分析^[15-16](principal component analysis, PCA)基础上的模式识别方法,其基本思路是先利用主成分分析的显示结果得到 1 个样本分类基本印象,然后分别对各类样本建立相应的类模型,继用这些类模型来对未知类进行判别分析,以确定其属于哪一类,或不属于哪一类。其实, SIMCA 是在循环地使用主成分分析方法,先是对整个样本进行主成分分类,然后通过建立各类样本的主成分模型,来检验未知样本属于哪个类。SIMCA 算法用于模式识别分类的基本思路是对培训集集中每一类样本测量数据矩阵分别进行主成分分析,建立每一个类的数学模型,然后在此基础上对未知样本进行判别分类,即分别试探将该未知样本与各类样本数学模型进行

拟合,以确定其属于哪一类或不属于任何一类。

1.4.2 SIMCA 判别模型的建立: SIMCA 定性分析主要分 2 步:(1)对智舌采集的数据进行 PCA 分析,建立一个基于 PCA 的 SIMCA 模型;(2)用 SIMCA 模型对采集样本进行检验,以 SIMCA 模型检验的判别准确率为依据。

数据处理软件:Unscrambler V 9.1。

2 结果和讨论

2.1 基于 PCA 分析的副溶血弧菌 SIMCA 模型的建立

首先,对分别 6 个工作电极的分别在 3 个不同频率段,各取 10 个样本的副溶血弧菌的培养物进行检测,然后建立基于 PCA 的 SIMCA 判别模型。每个工作电极与频率段的组合共建立 18 个 SIMCA 判别模型。而后用另外 10 种弧菌的检验集对这 18 个模型进行逐一筛选,得到钯电极 1 Hz 频率段、钨电极 100 Hz 频率段、银电极 100 Hz 频率段的判别模型为最佳组合,均能将 10 种弧菌检验集准确判别且

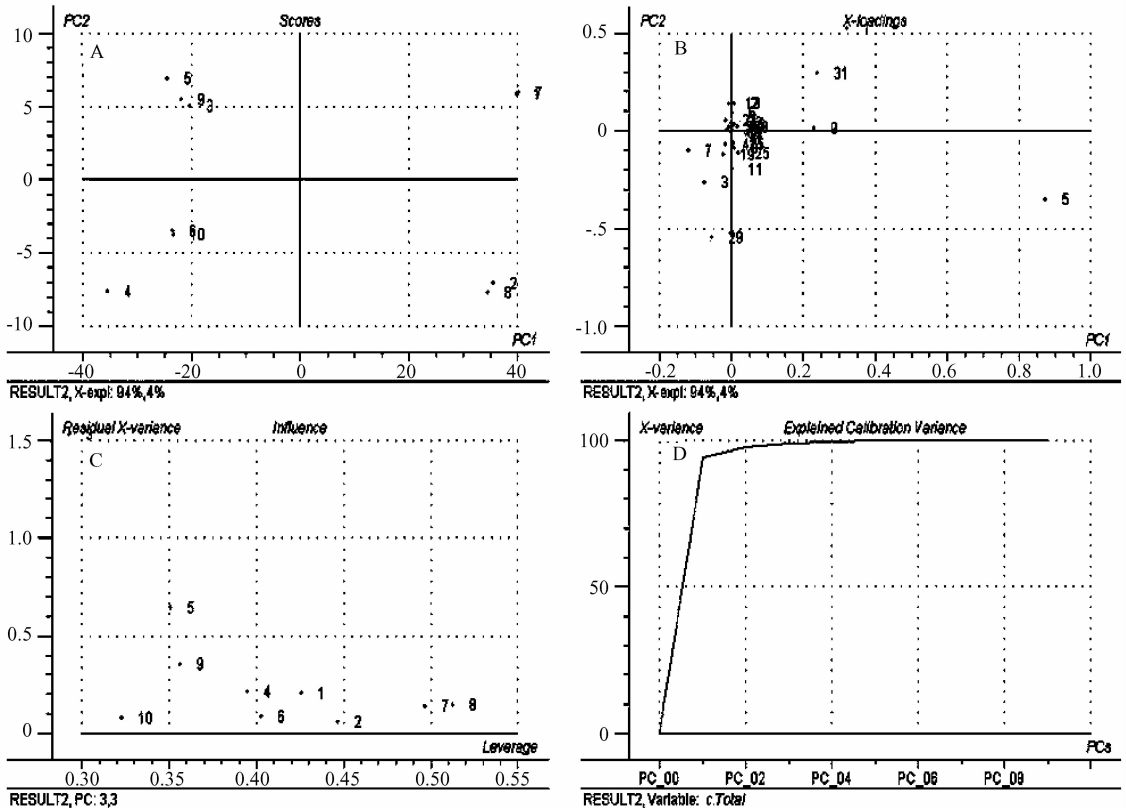


图 2 副溶血弧菌样本在钯电极 1 Hz 频率段的 SIMCA 判别模型

Fig. 2 The SIMCA model of *V. parahaemolyticus* samples in palladium electrode 1 Hz frequency segment.

判别准确率均达 100%，如图 2、图 3、图 4。

量的观察值与拟合值之差，表示模型未能解释的样

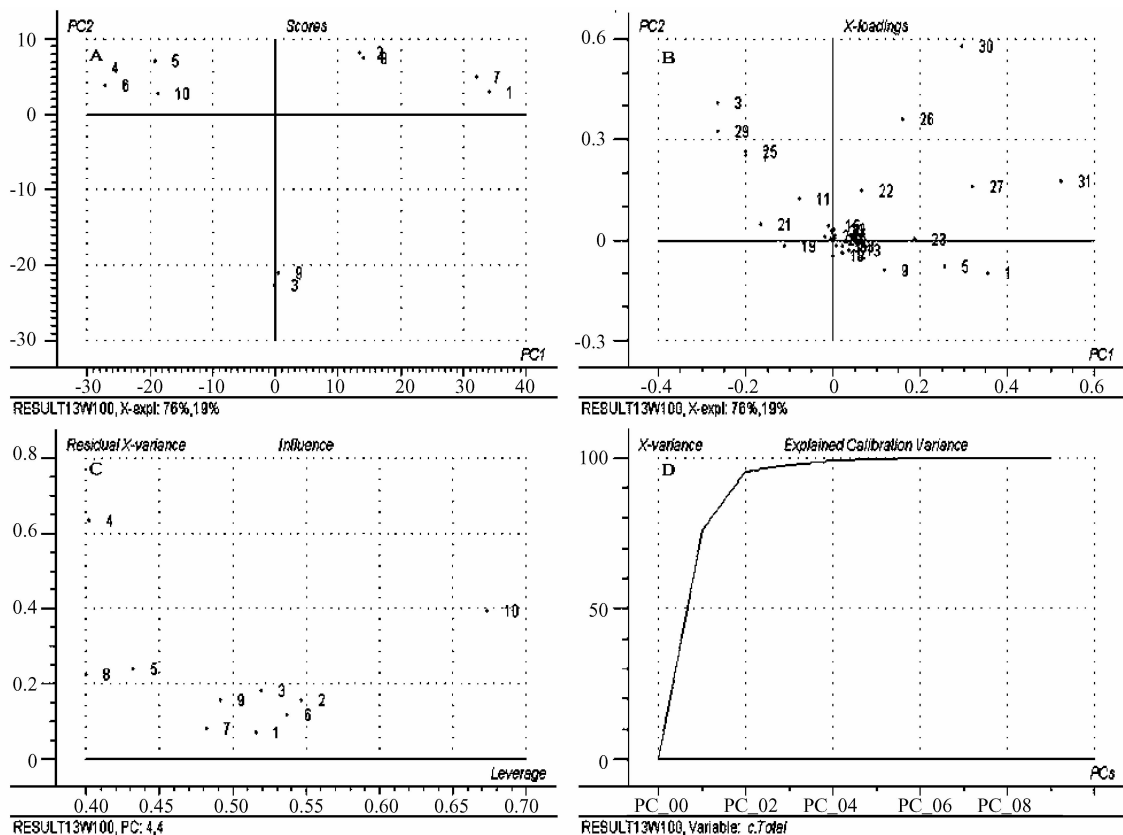


图 3 副溶血弧菌样本在钨电极 100 Hz 频率段的 SIMCA 判别模型

Fig. 3 The SIMCA model of *V. parahaemolyticus* samples in tungsten electrode 100 Hz frequency segment.

图 2、图 3、图 4 中的 A 图是 (Scores) 得分图，它提示了样本点分散和差异，具有相同或相近性质的样本聚集在一起，而相互远离则表明样本的差异较明显。各图中的 B 图是变量载荷图 (X-loading)，代表变量的贡献度，智舌一个工作电极在一个频率段下检测一个样本均有 35 个变量，利用数据分析软件系统自动去除各个样本所对应的相同变量得到 31 个变量来确定这个模型，图中有一横线和一纵线，离两条线交叉点越远的变量说明对模型的贡献越大；而各图中的 C 图是影响因子图 (Influence)，表示各样本点对相应 PCA 模型的影响程度，由样本点的杠杆值 (Leverage) 和残差 (Residual) 来决定，杠杆值和高残差值的样本点被认为是异常值 (Outlier)。杠杆值是样本点或变量在模型中投影点距模型中心的距离，表示单个样本或变量与模型中其他样本或变量的区别，和样本点或变量对建立模型的影响程度，值越大表示对模型的影响越大。残差是样本点或变

本点或变量特征的量，其值越小，模型拟合越好。D 图，为各主份的对模型的影响。从各图可知，模型的样本在主成分排序图中散开，且样本点的残差值和杠杆值都较小，表明模型中训练集选取的样本具有相应的代表性，且模型的拟合性较好。

2.2 10 种弧菌的检验集检验副溶血弧菌的 SIMCA 判别模型

SIMCA 方法是一种二值判别法。在 2.1 中建立了 3 个智舌鉴别副溶血弧菌的 SIMCA 判别模型，其中各模型拟合度均较好。在此，用其它 10 种弧菌，每种弧菌准备 6 个样本作为检验集，对副溶血弧菌的 SIMCA 模型作回判检验。图 5、图 6、图 7 中是检测集对副溶血弧菌 SIMCA 模型的判别结果。图中纵轴是样本距模型的距离，其值是样本的残差的平方根，值越小表示对应的分类模型能更好的描述样本，样本属于该类的可能性高；横轴为样本杠杆值 (Sample leverage)，表示在不考虑类对样本描述程

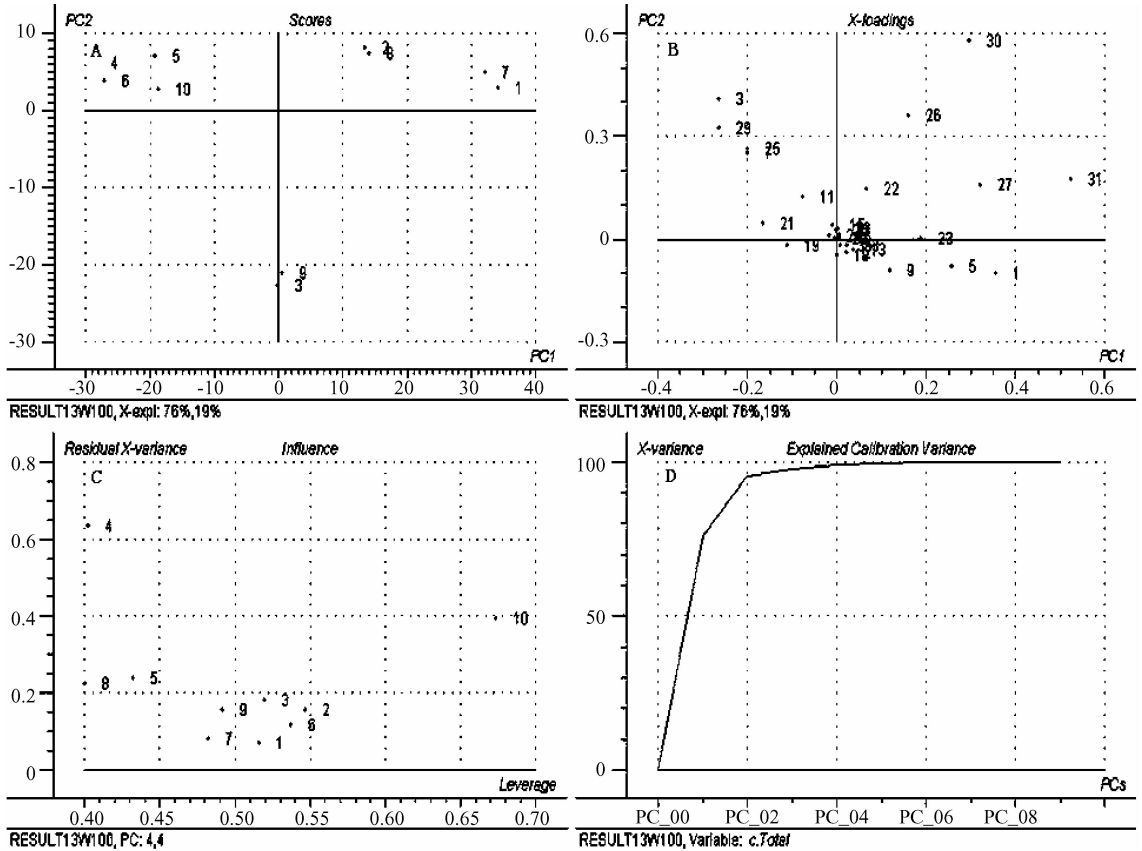


图 4 副溶血弧菌样本在银电极 100 Hz 频率段的 SIMCA 判别模型

Fig. 4 The SIMCA model of *V. parahaemolyticus* samples in silver electrode 100 Hz frequency segment.

度的前提下,较样本与类中其他样本点的不同,以及对模型的影响程度;图中分别用一条垂直线和一条水平直线给出样本到模型的距离和杠杆值在 $\alpha = 5\%$ 显著水平下的域值,两直线与坐标轴构成的区

域即为具有相应属性的有效区域。如果有检验集的样本落在这个区域内,也就是说判别准确率没有达到 100%,就说明这种弧菌不能被所建的模型判别检验。

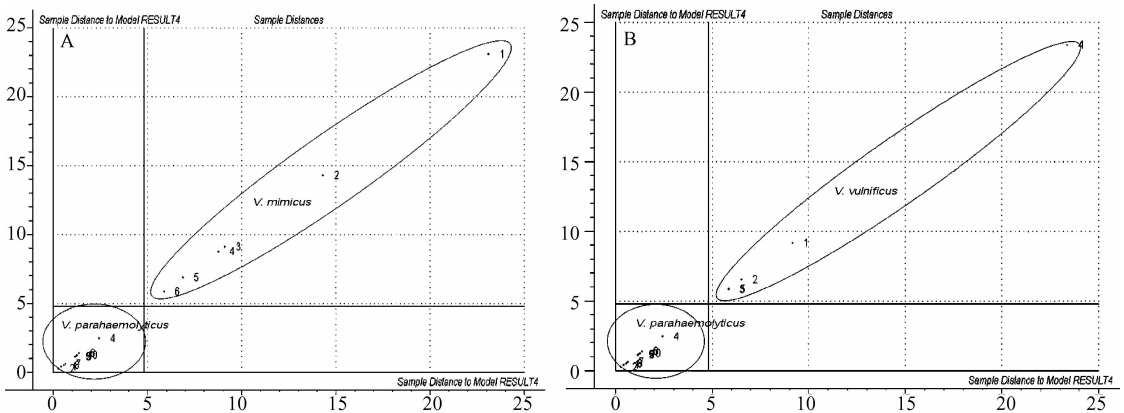


图 5 拟态弧菌 (A) 和创伤弧菌 (B) 检验集在副溶血弧菌钨电极 100 Hz 频率段的 SIMCA 判别模型下的判别结果

Fig. 5 The result of *V. mimicus* (A) and *V. vulnificus* (B) samples discriminated by the SIMCA model of *V. parahaemolyticus* in tungsten electrode 100 Hz frequency segment.

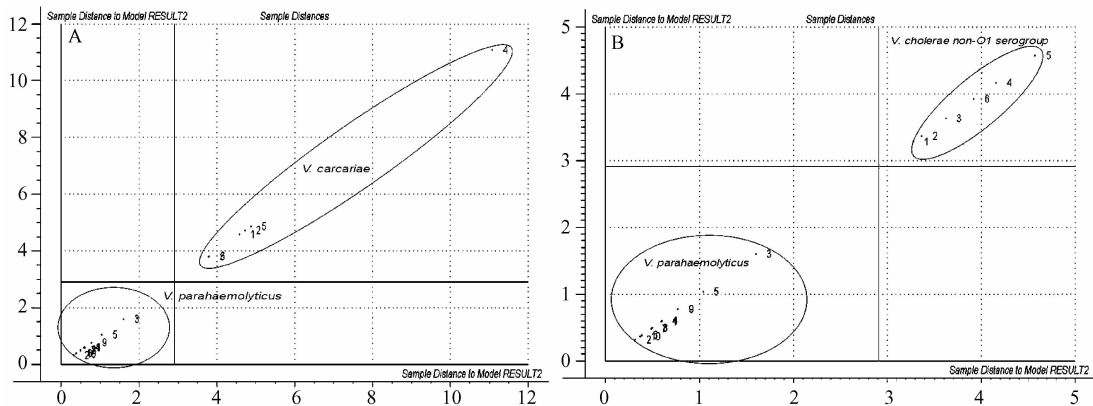


图 6 鲨鱼弧菌 (A) 和非 O 型霍乱弧菌 (B) 检验集在副溶血弧菌银电极 100 Hz 频率段的 SIMCA 判别模型下的判别结果

Fig. 6 The result of *V. carcariae*(A) and *V. cholerae* non-O1 serogroup(B) samples discriminated by the SIMCA model of *V. parahaemolyticus* in silver electrode 100 Hz frequency segment.

图 5 是各种弧菌的检验集对副溶血弧菌钨电极 100 Hz 频率段的 SIMCA 判别模型下的判别结果,这个模型只能对拟态弧菌和创伤弧菌的样本判别准确率达到 100%,它们的样本完全落在副溶血弧菌判别模型的有效区域外;而其他 8 种菌有 1 个或 1 个以上样本落在了这个有效区域内,判别准确率没能达到 100%,所以不能被判别。这可能是由于样本的数量不够或各种电极对液体培养物的敏感性不一样所致,或者菌本身代谢类型相似造成的。因此有必要进行更进一步的深入研究。

图 6 是各种弧菌的检验集对副溶血弧菌银电极 100 Hz 频率段的 SIMCA 判别模型下的判别结果。经过各菌的检验集对模型的检验判别,这个模型只能判别鲨鱼弧菌和非 O 型霍乱弧菌,对这

两种菌的判别准备率都能达到 100%。虽然非 O 型霍乱弧菌检验集样本的离散度较小,但也能很好被模型判别。

图 7 显示的是在副溶血弧菌钯电极 1 Hz 频率段的 SIMCA 判别模型下的判别结果。海鱼弧菌、梅氏弧菌、溶藻弧菌、辛辛那提弧菌、麦氏弧菌和 O 型霍乱弧菌的检验集样本判别准确率均达 100%。相比较其他 5 个工作电极来说,钯电极在 1 Hz 频率段下,建立副溶血弧菌的 SIMCA 判别模型,它的判别能力最强。

综上所述,智舌 6 个工作电极 3 个不同频率段检测副溶血弧菌,基于 PCA 的 SIMCA 判别模型有能力判别区分其他 10 种致病性弧菌,并且模型的判别准备率都达 100%,如表 1。

表 1 10 种弧菌在 SIMCA 判别模型下的判别准确率

Table 1 The discrimination accuracy of ten species of *Vibrio* samples in the SIMCA model

pathogenic <i>Vibrio</i>	electrode frequency segment	Discriminant probability ($\alpha = 5\%$)
<i>V. cholerae</i> O1 serogroup	Pd 1 Hz	100%
<i>V. damsela</i>	Pd 1 Hz	100%
<i>V. metschnikovii</i>	Pd 1 Hz	100%
<i>V. alginolyticus</i>	Pd 1 Hz	100%
<i>V. cincinnatiensis</i>	Pd 1 Hz	100%
<i>V. metschnikovii</i>	Pd 1 Hz	100%
<i>V. carcariae</i>	Ag 100 Hz	100%
<i>V. cholerae</i> non-O1 serogroup	Ag 100 Hz	100%
<i>V. mimicus</i>	W 100 Hz	100%
<i>V. vulnificus</i>	W 100 Hz	100%

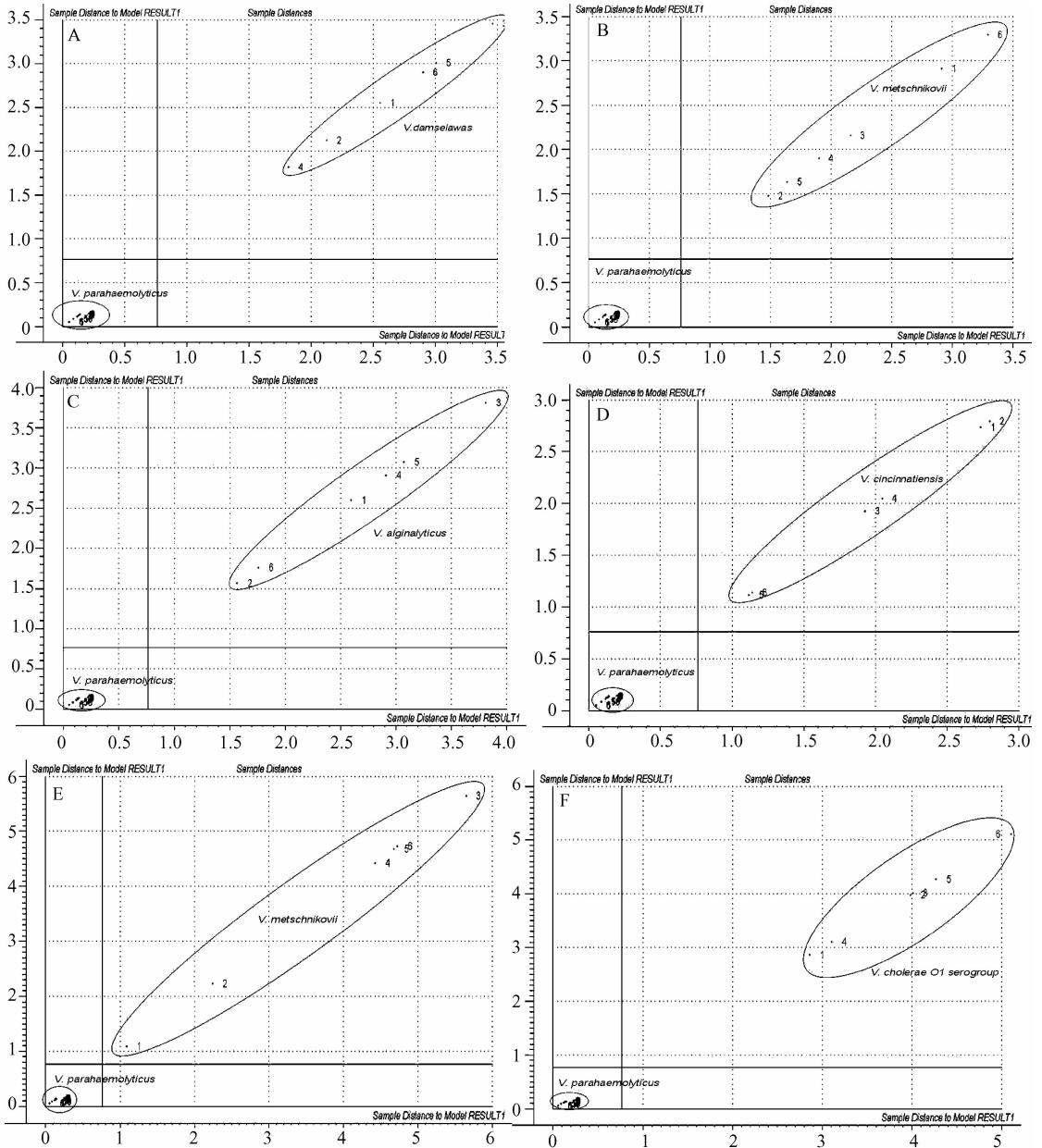


图7 海鱼弧菌(A)、梅氏弧菌(B)、溶藻弧菌(C)、辛辛那提弧菌(D)、麦氏弧菌(E)和O型霍乱弧(F)菌检验集在副溶血弧菌钯电极1 Hz频率段的SIMCA判别模型下的判别结果。

Fig. 7 The result of *V. damsela*(A), *V. metschnikovii*(B), *V. alginolyticus*(C), *V. cincinnatiensis*(D), *V. metschnikovii*(E) and *V. cholerae* O1 serogroup(F) samples discriminated by the SIMCA model of *V. parahaemolyticus* in palladium electrode 1 Hz frequency segment.

3 结论

智舌结合模式识别的SIMCA法建立副溶血弧菌的判别模型,对拟态弧菌、鲨鱼弧菌、溶藻弧菌、辛

辛那提弧菌、创伤弧菌、麦氏弧菌、梅氏弧菌、海鱼弧菌、霍乱弧菌非O1型和O1型等致病性弧菌的检验集进行判别,结果表明智舌能很好的判别区分副溶血弧菌和这些弧菌并具有信息量丰富、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,可以弥补现有检测方法的一些不足。通过本研究可以发现,智舌检测食源性致病微生物方面将有很大持续研究价值和广泛的应用前景。

参考文献

- [1] 张保强,董力群,王逊. 致病性弧菌的研究概况. 职业与健康 (*Occupation and Health*), 2006, 22 (24): 2170-2173.
- [2] 谭翰清,万成松. 副溶血性弧菌快速检测研究进展. 华南预防医学 (*South China Journal of Preventive Medicine*), 2004, 30(1):21-24.
- [3] 杨正时,房海. 人及动物病原细菌学. 第一版. 河北:河北科学技术出版社,2003:54-56.
- [4] Legin A, Kirsanov D, Rdnitskaya A, Iversen J. J. L, Seleznev B, Esbensen K. H, Mortensen J, Houmøller L. P and Vlasov Yu. Multicomponent analysis of fermentation growth media using the electronic tongue. *Talanta*, 2004, 64:766-722.
- [5] Soderstrom C, Rudnitskaya A, Legin A. Differentiation of four *Aspergillus* species and one *Zygosaccharomyces* with two electronic tongues based on different measurement techniques. *Journal of Biotechnology*, 2005, 119: 300-308.
- [6] Soderstrom C, Boren H, Winquist F. Use of an electronic tongue to analyze mold growth in liquid media. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 83: 253-261.
- [7] Soderstrom C, Winquist F, Krantz-Rulecker C. Recognition of six microbial species with an electronic tongue. *Sensors and Actuaors*, 2003, 89:248-255.
- [8] 牛天贵,张宝芹. 食品微生物检验. 北京:中国计量出版社,2004:375-378.
- [9] 赵广英,黄建锋. 多频大幅脉冲传感系统监测食源性致病菌生长趋势的研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008,48(12):1616-1622.
- [10] Tian S Y, Deng S P, Chen Z X. Multifrequency large amplitude pulse voltammetry: A novel electrochemical method for electronic tongue. *Sensors and Actuators B*, 2007, 123:1049-1056.
- [11] Tian S Y, Deng S P, Ding C H. Discrimination of Red Wines Age by a Voltammetric Electronic Tongue Based on Multifrequency Large Amplitude Voltammetry and Pattern Recognition Method. *Sensors and Materials*, 2007, 19: 287-298.
- [12] 王家俊,汪帆,马玲. SIMCA 分类法与 PLS 算法结合近红外光谱应用于卷烟纸的质量控制. 光谱学与光谱分析 (*Spectroscopy and Spectral Analysis*), 2006, 26 (10):1858-1862.
- [13] 陈全胜,赵杰文,张海东. SIMCA 模式识别方法在近红外光谱识别茶叶中的应用. 食品科学 (*Food Science*), 2006, 27(4):186-189.
- [14] 杨忠,江泽慧,费本华,覃道春. SIMCA 法判别分析木材生物腐朽的研究. 光谱学与光谱分析 (*Spectroscopy and Spectral Analysis*), 2007, 27 (4): 686-690.
- [15] Wold S, Esbensen K, Geladi P. Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2, 1987:37-52.
- [16] 薛薇. SPSS 统计分析方法及应用. 北京:电子工业出版社,2004:326-349.

Development of the soft independent modelling of class analogies model to discrimination *Vibrio parahaemolyticus* by Smartongue

Jianfeng Huang, Guangying Zhao^{*}, Wenchao Dou

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

Abstract: [**Objective**] To explore a new rapid detection method for detecting of Food pathogens. [**Method**] We used the Smartongue, to determine the composition informations of the liquid culture samples and combined with soft independent modelling of class analogies (SIMCA) to analyze their respective species, then set up a Smartongue -SIMCA model to discriminate the *V. parahaemolyticus*. [**Results**] The Smartongue has 6 working electrodes and three frequency segments, we can built 18 discrimination models in one detection. After comparing all the 18 discrimination models, the optimal working electrodes and frequency segments were selected out, they were: palladium electrode in 1 Hz frequency segment, tungsten electrode in 100 Hz and silver electrode in 100 Hz. Then 10 species of pathogenic *Vibrio* were discriminated by the 3 models. The *V. damsela*, *V. metschnikovii*, *V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis*, *V. metschnikovii* and *V. cholerae* O serogroup samples could be discriminated by the SIMCA model of *V. parahaemolyticus* with palladium electrode 1 Hz frequency segment; *V. mimicus* and *V. vulnificus* samples could be discriminated by the SIMCA model of *V. parahaemolyticus* with tungsten electrode 100 Hz frequency segment; *V. carcariae* and *V. cholerae* non-O serogroup samples could be discriminated with the SIMCA model of *V. parahaemolyticus* in silver electrode 100 Hz frequency segment. The accurate discrimination of ten species of *Vibrio* samples is 100%. [**Conclusion**] The Smartongue combined with SIMCA can discriminate *V. parahaemolyticus* with other pathogenic *Vibrio* effectively. It has a promising future as a new rapid detection method for *V. parahaemolyticus*.

Keywords: rapid detection method, smartongue, principal component analysis, SIMCA, *Vibrio parahaemolyticus*

(本文责编: 张晓丽)