

## 多频大幅脉冲传感系统监测 3 种食源性致病菌的生长趋势

赵广英, 黄建锋

(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)

**摘要:**【目的】探究智能电子舌伏安法结合特定的统计分析系统是否适用于示踪食品致病性细菌生长情况的快速监测。【方法】利用智能电子舌——多频大幅脉冲传感系统的伏安法, 监测液体培养基中 3 种食源性致病菌的 16 个时段生长情况所致液体基质变化过程的综合信息; 结合主成分分析法对获得的复杂综合信息数据进行统计学分析, 按获得的主成分得分图分析检测样品。【结果】监测能力强的电极、频率段分别是: 金黄色葡萄球菌的为钨电极的 100 Hz、铂电极的 1 Hz、银电极的 10 Hz 和钛电极的 10 Hz 频率段; 大肠杆菌 O157:H7 的为金电极的 100 Hz、铂电极的 1 Hz、钛电极的 1 Hz 和钨电极的 100 Hz 频率段; 枯草芽孢杆菌的为钨电极的 1、10 和 100 Hz 3 个频率段。【结论】本试验首次用多频大幅脉冲传感系统伏安法结合主成分分析法, 能够有效的监测样品细菌的生长情况, 有望成为一种具有多种优点的新型检测细菌生长情况的快速监测系统。

**关键词:** 多频大幅脉冲传感系统; 伏安法; 食源性致病菌; 主成分分析; 电极阵列

**中图分类号:** PT212.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 12-1616-07

不同种类菌体, 对同一种培养基的影响是不同的。这是因其自身具有的酶系统不同, 代谢方式和代谢途径不相同, 对营养物质的分解利用和产生的产物亦不相同。即使是同一种菌体, 乃至同株甚至克隆菌体的不同生长时期, 在同一个限定的环境中, 对基质的利用程度和代谢产物也是不尽相同的。上述这些差异是多种多样的复杂体系, 而且是动态变化着但又有一定规律和特点的, 无论是致病菌、污染的杂菌, 还是生产用菌, 全面而实时的监测/检测这种变化和差异是非常有用的<sup>[1]</sup>。

免疫传感器、石英晶体压电传感器等其他生物传感器监测食微生物的研究报道有一些, 但也有些关键技术问题桎梏其发展和实际应用<sup>[2]</sup>。目前, 高灵敏度的电子舌<sup>[3]</sup> (electronic tongue, ET) 是检验酒、饮料等液体食品品质的最先进的检测技术<sup>[4-6]</sup>。探索用 ET 快速评价食品质量安全性是国内外研究的前沿, 目前

世界范围仅有用 ET 检测食品和农产品中重金属污染、农药残留和分析液体培养基中霉菌生长情况等少量报道<sup>[7-12]</sup>。对于能否用多频大幅脉冲传感系统从多因素全面示踪液体培养基中不同细菌生长情况及其特点的综合信息而非某一种或某几种信息进行研究, 以探求一种能够更加准确反映菌体特点和生长情况的检测技术。本研究用多频大幅脉冲传感系统实时检测金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157:H7 和枯草芽孢杆菌三种主要食品致病菌生长过程中同种液体培养基内变化的复杂成分的多项综合指标的响应信息, 对采集到的复杂信息, 结合多元统计分析中的主成分分析方法 (principal component analysis, PCA) 进行相关信息分析, 研究选出了适于监测金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157:H7 和枯草芽孢杆菌生长情况的适宜传感器和适宜频率段。综合多个适宜传感系统的监测和分析结果, 能够大大增强分析结果的准确性。

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); 国家“863 计划”(2007AA091806)

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: 2008-05-13; 修回日期: 2008-08-22

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种：**金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) gsI 株、大肠杆菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) sI 株，均来自本研究室。

**前增菌和培养与采样：**按国标方法分别对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157:H7 和枯草芽孢杆菌进行培养<sup>[13]</sup> 每种菌培养 16 个样品，根据它们的生长曲线<sup>[14-18]</sup>，前期每隔 1 h 进行灭活，保存，待测；最后两个样品分别培养 24 和 30 h 以上再进行灭活，保存，待测。

以同样的方法培养目标菌种，用浊度法测其生长曲线，用 721 型分光光度计，波长 560 nm 测其 OD 值。以 OD<sub>560</sub> 为纵坐标，时间为横坐标作曲线。以此国标方法的测定结果作为本研究的对照。

**1.1.2 培养基：**1%葡萄糖肉汤培养基，杭州微生物试剂有限公司。

**1.1.3 主要仪器：**检测仪器为多频大幅脉冲传感器 (multi-frequency large amplitude pulse sensor, MFLAPS)，是一种新型智能电子舌 (由浙江工商大学食品与生物工程学院邓少平教授等提供)，它以多频大幅脉冲 (1、10 和 100 Hz 三个脉冲频率段) 为激发电位，用钯 (Pd) 铂 (Pt) 金 (Au) 银 (Ag) 钨 (W) 和钛 (Ti) 6 种不同的非修饰金属电极作为工作电极组成传感器阵列，铂电极作为辅助电极，Ag/AgCl 作为参比电极 (电极均由天津艾达科技发展有限公司提供)，组成多个标准的三电极系统。它除了具有其他电子舌所具有的多项优点外，还具有多项新的改进<sup>[7]</sup>。721 型分光光度计 (上海光谱仪器有限公司制造)。

### 1.2 检测方法

用伏安法检测过程中，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，对电极阵列打磨，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 3 份菌悬液进行检测，然后计算 3 份菌悬液测定数据的平均值，作为这一样品的检测结果。

研究检测 1 种菌获得的实验数据量如下：16 时

段×6 种电极×3 个频率段×35 个有用数据×3 次重复 = 30240 个有用数据，本研究进行检测研究的 3 种细菌的数据量是：30240 个有用数据×3 种细菌 = 90720 个有用数据。对于获得的如此多的数据结果，经过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。

### 1.3 数据处理方法

采用多元统计分析中比较常用的统计方法，即主成分分析方法<sup>[19,20]</sup>对多频大幅脉冲传感系统采集的数据进行处理。提取电流采集信号的顶点和拐点值作为检测样品的变量，通过主成分分析方法获得的得分图，对不同的检测样品进行区分、识别。首先，以行向量代表样品，纵向量代表变量把不同电极不同频率段的数据分别保存成数据表格，进行主成分分析。然后，比较不同电极的主成分得分图，在二维和三维平面上比较各个电极在不同频率下对样品的区分效果，把主成分得分图具有互补作用的电极数据横向叠加，重新组成以行向量代表样品，纵向量代表变量的数据阵列，最终寻找具有最好区分效果的主成分得分图和电极数据叠加方式，寻找区分这类样品最适合的电极阵列组合方式以及电极最适合的多频脉冲频率段，最终确定适宜的 2~3 个电极及其脉冲频率段作为监测目的菌生长状况的监测系统。

## 2 结果讨论

### 2.1 浊度法测定金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157:H7 和枯草芽孢杆菌的生长曲线

图 1 是用浊度法测定的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157:H7 和枯草芽孢杆菌的在 1%葡萄糖肉汤培养基中的生长曲线。由图中曲线可见培养金黄色葡萄球菌到 2 h 左右是延滞期与对数期的一个过渡阶段；而后进入对数期直到 7 h 左右；7 h 后，逐渐进入稳定期。

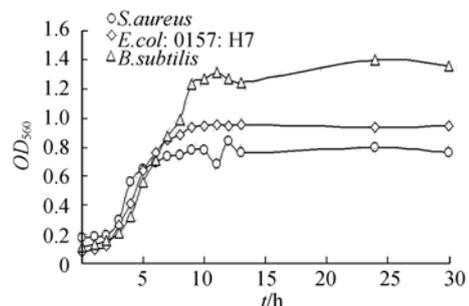


图 1 浊度法测定 3 种菌的生长曲线

Fig.1 The growth curves of three microbes detected by turbidimetry.

大肠杆菌 O157:H7 也差不多, 2 h 是延滞期与对数期的一个过渡阶段; 3 h 到 7 h 是对数期; 而后逐渐进入稳定期, 如图 1。枯草芽孢杆菌的延滞期与对数期的一个过渡阶段是在 3~4 h; 4~11 h 是它的对数期; 11 h 后逐渐进入稳定期。

**2.2 多频大幅脉冲传感系统监测、分析各菌的生长趋势**  
金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157:H7 和枯草芽孢杆菌生长的不同时期 (延滞期到稳定期) 对培养基的影响不同。

本研究通过多频大幅脉冲传感系统的识别差异的能力, 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157:H7 和枯草芽孢杆菌的在 1%葡萄糖肉汤培养基里的生长进行监控分析。用主成分分析确定多频大幅脉冲传感系统

监测上述 3 种菌生长分析的能力。

**2.2.1 金黄色葡萄球菌生长情况分析:** 对 6 个工作电极 3 个频率段的检测结果进行比较, 得到对金黄色葡萄球菌生长分析的能力较强的电极以及对应的频率, 得到: W 电极的 100 Hz 频率段、Pt 电极的 1 Hz 频率段、Ag 电极的 10 Hz 频率段、Ti 电极的 10 Hz 频率段等。

从图 2 中(A), 可以看出 W 电极在 100 Hz 频率段主要是在成分二上体现出来的一个生长趋势。还有 (D) 中显示 Ti 电极的 10 Hz 频率段在成分二上有明显的生长趋势; (B) 和 (C), 表明 Pt 电极的 1 Hz 频率段和 Ag 电极的 10 Hz 频率段在成分一上有显著的生长趋势。0 h 时的样品是刚接种未培养就灭活的, 它与其它生长时期的样品有较大的离散度, 这表明了金黄色

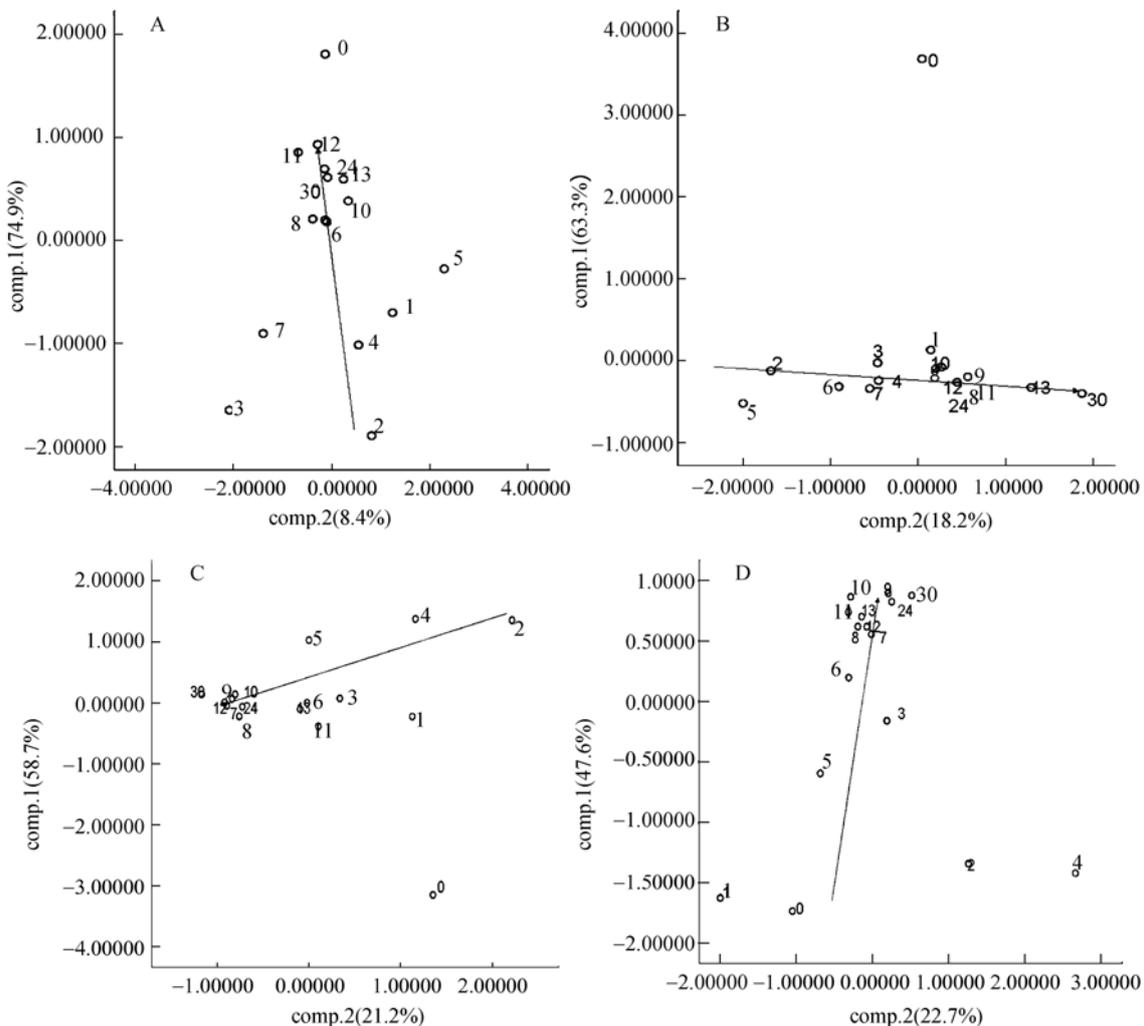


图 2 金黄色葡萄球菌在不同电极和频率段的主成分图

Fig.2 Score plots of PCA values of *S.aureus* in W electrodes in 100 Hz frequency segment (A); Pt electrodes in 1 Hz(B); Ag electrodes in 10 Hz(C); Ti electrodes in 10 Hz(D). (Comp.1: principal component 1; comp.2: principal component 2).

葡萄球菌的生长代谢对培养基产生了很大的影响;从 1 h 到 8 h 左右,样品的离散度也很大,这主要是因为金黄色葡萄球菌在培养 2 h 后逐渐进入了对数期,生长代谢特别旺盛所造成的;9 h 后金黄色葡萄球菌生长进入了稳定期,生长与衰亡基本保持平衡,所以后面到 30 h 时的样品的离散度较小。在这些主成分得分图中很容易看到金黄色葡萄球菌的生长。并且在与浊度法测得的生长曲线的结果进行比较,基本是吻合,在 8~9 h 逐渐进入稳定期,而且都可以表明之前的生长及代谢很旺盛。因此多频大幅脉冲传感系统在监测液体培养基里的金黄色葡萄球菌生长情况是可行的。

**2.2.2 大肠杆菌 O157:H7 生长情况分析:** 大肠杆菌 O157:H7 生长曲线和金黄色葡萄球菌的生长曲线是很相似的,一般也在 2 h 左右就进入了指数期,9 h 后进入生长稳定期。从多频大幅脉冲传感系统对大肠杆菌 O157:H7 生长的 6 个工作电极中找出了对大肠杆

菌 O157:H7 生长监测分析效果相对较好的几个电极及工作频率,如图 3: Au 电极的 100 Hz 频率段、Pt 电极的 1 Hz 频率段、Ti 电极的 1 Hz 频率段、W 电极的 100 Hz 频率段。可以看出,相对于其他 6 个电极来说, Au 电极对大肠杆菌 O157:H7 的生长监测分析能力是比较强的。

在图 3 中(A)、(D), Pt 电极的 1 Hz 频率段、Au 电极的 100 Hz 频率段的主成分得分图是比较相似的。基本都在前 6 h 的时候在主成分得分图上的离散度是较大的,而在 6 h 和 7 h 有一个拐点,且 7 h 后它们的离散度较小。这说明了大肠杆菌 O157:H7 的生长在前 5 h 对培养的影响特别大,也就是说大肠杆菌 O157:H7 的生长在这个阶段特别活跃;而 7 h 后它的生长逐渐进入稳定期。另两个电极的主成分得分图能更好的说明这一点。在 Ti 电极的 1 Hz 频率段、W 电极的 100 Hz 频率段的主成分得分图中可以明显的看到它在 6~7 h

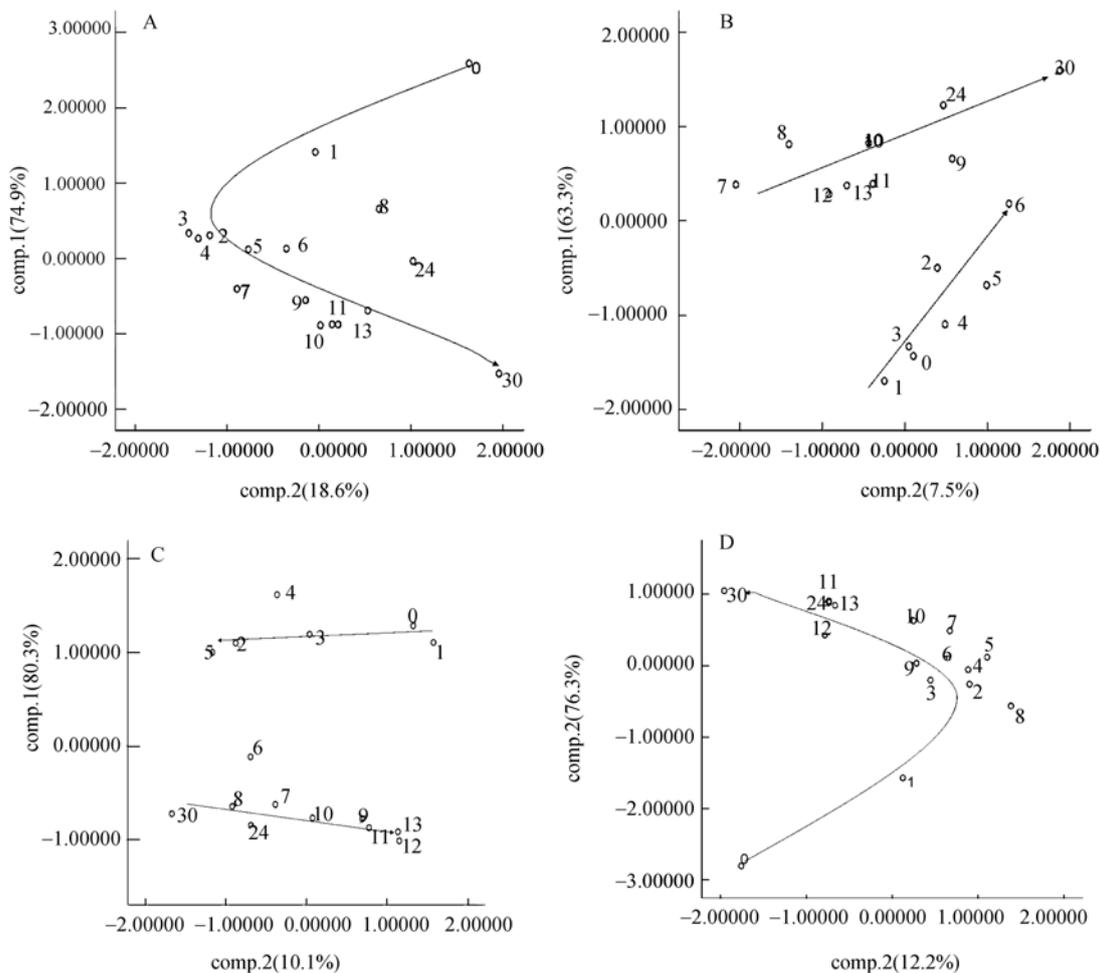


图 3 *E. coli*.O157:H7 在不同电极和频率段的主成分图

Fig.3 Score plots of PCA values of *E. coli*.O157:H7 Pt electrodes in 1 Hz(A); Ti electrodes in 1 Hz(B); W electrodes in 100 Hz(C); Au electrodes in 100 Hz(D). (Comp.1: principal component 1; comp.2: principal component 2).

时有一个跃迁。通过这 4 张得分图,可以了解到大肠杆菌 O157:H7 的生长一般在培养 6~7 h 左右达到了顶峰,培养基里的菌体繁殖最快,代谢最旺盛。大肠杆菌 O157:H7 的生长,在主成分得分图中可以很清楚的看出。这与浊度法测得的大肠杆菌 O157:H7 的生长结果是基本吻合的,因此多频大幅脉冲传感系统在监测液体培养基里的大肠杆菌 O157:H7 生长情况也是可行的。

**2.2.3 枯草芽孢杆菌生长情况分析:**枯草芽孢杆菌的毒性相对较小,之所以选它作为研究对象,是想选一种带芽孢的菌种,而枯草芽孢杆菌是最常见的一种带芽孢的菌种。通过电极及频率段的比较,得到了 Pd 电极的 3 个频率段(1、10、100 Hz)对枯草芽孢杆菌的生长监测分析能力较强,如图 4。这 3 张主成分

得分图与金黄色葡萄球菌的生长趋势得分图有几分相似。由于 0 h 时的样品是未经培养的,所以它与其他样品的离散度相对较大。Pd 电极的 10 Hz 频率段和 100 Hz 的主成分得分图显示枯草芽孢杆菌在 1%葡萄糖肉汤培养基中培养到 4 h 左右进入生长对数期。在 3 张主成分得分图中,我们可以看出 11 h 前的样品离散度都挺大的,也就是说在这个时间段里枯草芽孢杆菌的生长对培养基的影响活跃。而后面时间段的样品的离散度相对较小,说明枯草芽孢杆菌逐渐进入了稳定期。而浊度法测得的枯草芽孢杆菌的生长曲线的结果也是在 10~11 h 时进入稳定期的。两种方法的结果基本吻合,所以说多频大幅脉冲传感系统在监测液体培养基里的枯草芽孢杆菌生长情况同样也是可行的。本研究之所以选取

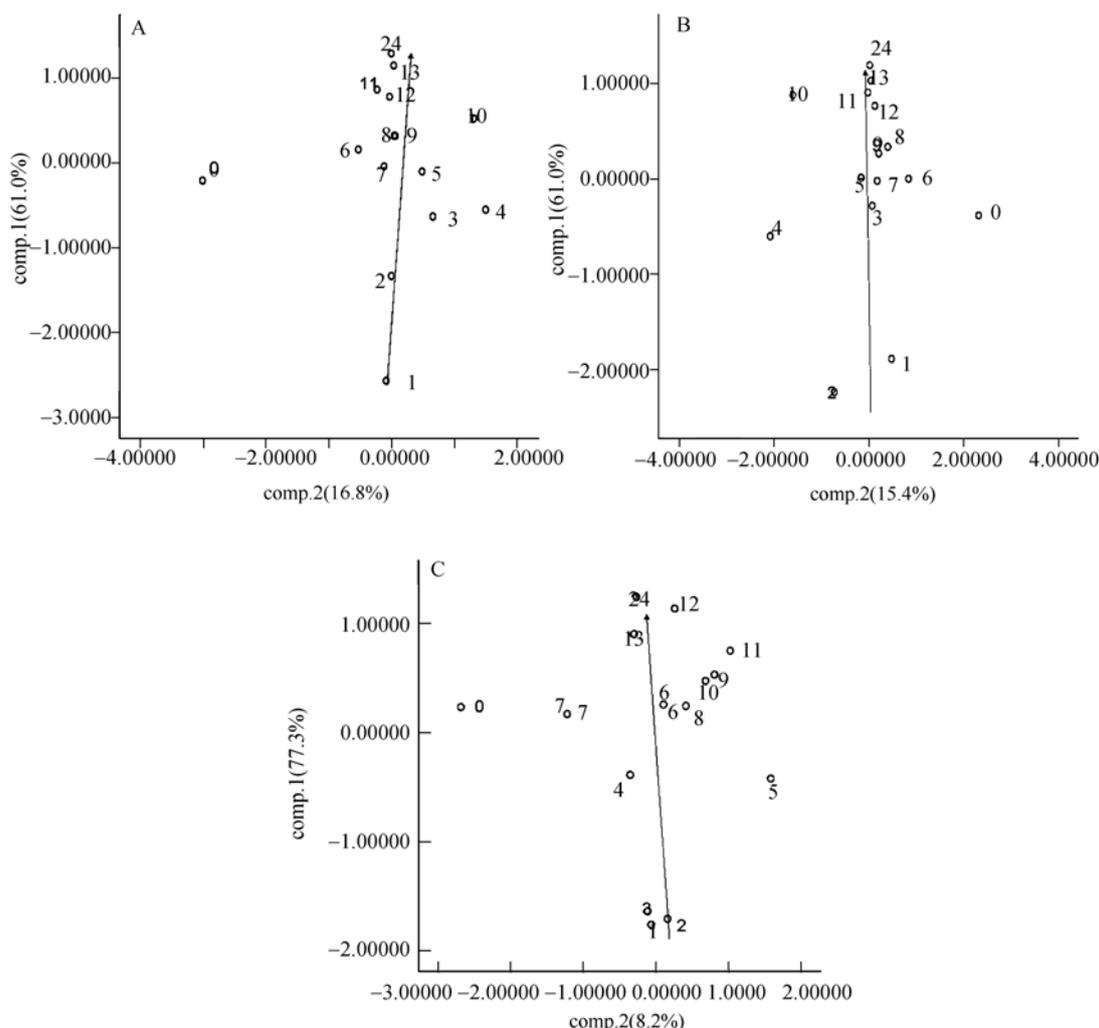


图 4 枯草芽孢杆菌在 Pd 电极不同频率段上的主成分得分图

Fig.4 The score plots of *B. subtilis* PCA values of Pd electrodes in 1 Hz(a), 10 Hz(b), 100 Hz(c) frequency segments. (Comp.1: principal component 1; comp.2: principal component 2).

这3种菌为研究对象,是因为它们分别代表了球菌、杆菌以及带芽孢的杆菌,以让本研究更具代表性。而在生物统计学中主成分分析只要成分一和成分二之和超过总信息量的70%就可以说明它是有效的,也就是说多频大幅脉冲传感系统监测液体培养基里的食源性致病菌的生长情况的研究是完全可行的。

### 3 结论

用多频大幅脉冲传感系统伏安法进行检测,结合主成分分析方法作为复杂检测数据的处理手段,分析食源性致病菌的生长情况。研究结果显示,对下列3种食品致病菌生长情况分析能力较强的电极和频率段分别是:对金黄色葡萄球菌的为W电极的100 Hz频率段、Pt电极的1 Hz频率段、Ag电极的10 Hz频率段和Ti电极的10 Hz频率段;对枯草芽孢杆菌的为Pd电极的3个频率段(1 Hz、10 Hz、100 Hz);对大肠杆菌O157:H7最好的为Au电极的100 Hz频率段,其次为Pt电极的1 Hz频率段、Ti电极的1 Hz频率段和W电极的100 Hz频率段。所获得的研究结果与国标方法基本一致。和其它致病菌分析检测方法比较,多频大幅脉冲传感系统伏安法结合主成分分析方法具有信息量丰富、反应样品本质特点全面、结构简单、易智能化、使用寿命长、无试剂经济环保、快速简便等独有的特点。从对3种不同类型食品致病菌生长情况分析研究,呈现出了与国标方法相吻合的较理想的结果,有望探索建立一类病原微生物生长和确定的快速分析、鉴别和鉴定技术,有很大的持续研究价值和广泛的应用前景。

### 参 考 文 献

- [1] 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, pp54-56.
- [2] 李杜鹃, 王剑平. 检测食源性致病菌的生物传感器. 中国生物化学与分子生物学报(*China Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2007, 23(3): 194-199.
- [3] Kiyoshi Toko. Electronic tongue. *Biosensors & Bioelectronics*, 1998, 13: 701-709.
- [4] 黄星奕, 张浩玉, 赵杰文. 电子舌技术在食品领域应用研究进展. 食品科技(*Food Science and Technology*), 2007, 7: 20-24.
- [5] 程秀娟, 朱虹, 贾宗艳. 电子舌技术在饮料识别中的应用. 食品科技(*Food Science and Technology*), 2006, 8: 163-166.
- [6] 田师一, 邓少平. 多频脉冲电子舌对酒类品种区分与辨识. 酿酒科技(*Liquor - making Science & Technology*), 2006, 149 (11): 24-26.
- [7] Winquist F, Bjorklund R. An electronic tongue in dairy industry. *Sensors and Actuators*, 2005, 111-112: 299-304.
- [8] Legin A, Kirsanov D, Rdnitskaya A, et al. Multicomponent analysis of fermentation growth media using the electronic tongue. *Talanta*, 2004, 64: 766-722.
- [9] Turner C, Rudnitskaya A, Legin A, et al. Monitoring batch fermentations with an electronic tongue. *Journal of Biotechnology*, 2003, 103: 87-91.
- [10] 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.
- [11] Soderstrom C, Winquist F, Krantz-Rulcker C. Recognition of six microbial species with an electronic tongue. *Sensors and Actuators*, 2003, 89: 248-255.
- [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] 牛天贵, 张宝芹. 食品微生物检验. 第一版. 北京, 中国计量出版社, 2004, pp375-378.
- [14] 陈昭华, 刘树滔. 对数期金黄色葡萄球菌的离子交换色谱行为及表征. 色谱(*Chinese Journal of Chromatography*), 2004, 22(3): 234-236.
- [15] 李向阳, 于静涛, 丁吉宗. 温度对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌代谢过程的规律研究. 中国卫生检验杂志(*Chinese Journal of Health Laboratory Technology*), 2001, 11(5): 559.
- [16] 李英莲, 李远钊, 等. 温度生长预测模型在大肠杆菌O157:H7控制中的应用. 食品科学(*Food Science*), 2007, 28(03): 183-186.
- [17] 丁红雷, 毛旭虎. 肠出血性大肠杆菌O157的实验室分离与鉴定方法. 卫生研究(*Journal of Hygiene Research*), 2007, 36(2): 242-244.
- [18] 高学文, 齐放军. 枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌的共培养及其对生物活性物质产生的影响. 南京农业大学学报(*Journal of Nanjing Agricultural University*), 2003, 26(3): 32-35.
- [19] Wold S, Esbensen K. Principal component analysis. *Chemom. Intell Lab Syst.* 2, 1987: 37-52.
- [20] 薛薇. SPSS 统计分析方法及应用. 第一版. 北京: 电子工业出版社, 2004, pp326-349.

## A multi-frequency large amplitude pulse sensor system to monitor the growth of food-borne pathogens

Guangying Zhao<sup>\*</sup>, Jianfeng Huang

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

**Abstract:** [Objective] We explored whether a smart electronic tongue as a rapid technique, combining with specifically statistics analyze system, could monitor the growth of the three food-borne pathogens. [Methods] The smart electronic tongue, multi-frequency large amplitude pulse was based on voltammetry. We used it to detect the comprehensive information about a sample and the change process of the medium in 16 periods of time. We analyzed the complex data information in statistics with principal component analysis. According to principal component scores plot, we analyzed the sample. [Results] The growth of *Staphylococcus aureus* in liquid medium could be monitored by tungsten electrode in 100 Hz frequency segment of multi-frequency large amplitude pulse voltammetry, platinum electrode in 1 Hz, and both silver electrode and titanium electrode in 10 Hz. The growth of *Escherichia coli O157:H7* could be measured by gold electrode in 100 Hz frequency segment, while platinum electrode in 1Hz, titanium electrode in 1Hz and tungsten electrode in 100 Hz. Then, palladium electrode was efficient to *Bacillus subtilis* in 1 Hz, 10 Hz, 100 Hz. [Conclusion] We used the multi-frequency large amplitude pulse sensor system combining with principal component analysis for the first time. It has a promising future as a modern rapid analytical technology for detecting the growth of microbe.

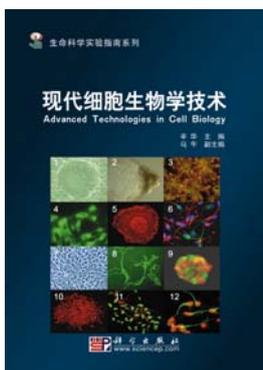
**Keywords:** multi-frequency large amplitude pulse sensor system; voltammetry; food-borne pathogens; principal component analysis; electrode array

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30571623), the Zhejiang Provincial Top Key Discipline(Z05-178) and the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA091806)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-571-88071024-8595; E-mail : zhaogy-user@163.com

Received: 13 May 2008/Revised: 22 August 2008

### 科学出版社新书推介 (2008-10)



细胞生物学现代技术

辛华 主编 马午 副主编

978-7-03-021690-8 ¥55.00 2008年10月出版

内容简介

本书为高等院校研究生学习细胞生物学技术用书,全书共12章,涵盖了细胞生物学经典实验方法和当今细胞生物学的一些新技术、新方法,既可用于研究生细胞生物学技术教学,又可作为细胞生物学技术工具书使用。本书编入实验共119个,内容涉及研究显微镜与显微图像分析技术、电子显微镜技术、细胞化学技术(细胞化学、酶、免疫、荧光细胞化学)细胞培养技术、培养细胞凋亡检测技术、细胞融合技术、细胞与细胞器的分离技术、细胞的原位杂交技术、流式细胞术、真核细胞基因转染与表达技术、哺乳动物基因敲除技术和干细胞与组织工程技术等内容。本书对每个实验项目的

原理、技术方法及注意事项都有充分的阐述,并附有大量彩色显微照片,以加深感性认识。

本书注重体现理论意义和实际应用价值,适用于生物学、医学、农学、师范院校的教师、研究生以及科研人员使用。者参考使用。