

doi: 10.12452/j.fxcxb.24031302

不同形状纳米银溶胶基底的增强特性比较及其对 食源性芽孢的识别和定量研究

屠前程¹, 田家齐¹, 朱瑶迪^{1,2*}, 李苗云¹, 赵莉君¹, 刘世杰¹, 梁栋^{1,2}

(1. 河南农业大学 食品科学技术学院, 河南 郑州 450000; 2. 河南九豫全食品有限公司, 河南 新乡 453000)

摘要: 该文制备并考察了3种不同形貌纳米银溶胶基底对枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌和产气荚膜梭菌的增强效应, 并选择增强效果最优的花状纳米银(AgNF)进行表面增强拉曼散射(SERS)分析。结果显示, 吡啶二羧酸钙(Ca^{2+} -DPA)在3种芽孢拉曼光谱中的出峰强度差异明显, 是区别3种食源性芽孢的主要特征峰。基于SERS数据对上述3种芽孢的结构进行解析, 并结合聚类分析法和K近邻算法实现了3种芽孢的快速识别。最后, 通过构建枯草芽孢杆菌不同浓度对数与其 $1\ 537\ \text{cm}^{-1}$ 处SERS峰强度之间线性关系的数字化定量方程, 实现了食源性芽孢的快速定量。

关键词: 表面增强拉曼散射; 食源性芽孢; 不同形状的银纳米颗粒; 快速识别; 数字化定量

中图分类号: O657.3; TS201.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2024)12-1919-08

Comparison of Enhancement Properties of Different Shapes of Nanosilver Sol Substrates and Its Application in Identification and Quantification of Food-borne Spores

TU Qian-cheng¹, TIAN Jia-qi¹, ZHU Yao-di^{1,2*}, LI Miao-yun¹, ZHAO Li-jun¹, LIU Shi-jie¹,
LIANG Dong^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450000, China;

2. Henan Jiuyuquan Food Co., LTD., Xinxiang 453000, China)

Abstract: In this paper, the enhancement effects of three kinds of nano-silver sol substrates with different morphologies on *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* were prepared and investigated, and the flower-shaped nano-silver (AgNF) with the best enhancement effect was selected for surface enhanced Raman scattering (SERS) analysis. The results showed that the peak intensity of calcium pyridine dicarboxylate (Ca^{2+} -DPA) in Raman spectra of three kinds of spores was obviously different, which was the main characteristic peak to distinguish three kinds of food-borne spores. Based on SERS data, the structures of the above three kinds of spores were analyzed, and the rapid identification of the three kinds of spores was realized by combining cluster analysis and K nearest neighbor algorithm. Finally, by constructing the digital quantitative equation of the linear relationship between the logarithm of different concentrations of *Bacillus subtilis* and the SERS peak intensity at $1\ 537\ \text{cm}^{-1}$, the rapid quantification of food-borne spores was realized.

Key words: surface enhanced Raman scattering; food-borne spores; different shapes AgNPs; rapid identification; digital quantification

食源性芽孢是广泛存在于各种食品中的细菌休眠体, 抗逆性极强, 常规手段很难杀死。在适宜环境下芽孢一旦萌发, 即可产毒和代谢, 其致病性强, 甚至可致死, 每年因食品胀袋或腐败造成的损失高达亿元, 不但给食品产业带来极大的经济损失, 对人类的健康和企业的发展也存在极大的威胁^[1]。因此, 如何快速识别芽孢并对其进行数字化定量是目前食品安全领域亟待解决的重要难题之一。

收稿日期: 2024-03-13; **修回日期:** 2024-05-20

基金项目: 国家现代农业(肉牛牦牛)产业技术体系专项(CARS-37); 国家自然科学基金(32001727); 国家“十三五”重点研发计划项目(2019YF1605700); 河南省重大科技专项(221100110500); 河南省自然科学基金(212300410008); 河南省科技攻关(232102110136); 河南省高校科技创新团队支持计划(22IRTSTHN021); 河南省教育厅重点研发项目(22A550009); 河南省科技研发计划联合基金(232103810023)

* **通讯作者:** 朱瑶迪, 博士, 副教授, 研究方向: 肉品加工与安全控制, 食品微生物快速检测技术, 食品、农产品无损检测技术研究, E-mail: zhu_yaodi@163.com

利用平板培养法结合多种诱导手段促使芽孢从休眠状态转变为营养细胞,随后通过分子生物学技术(16S rDNA 分析)进行检测是目前实现污染样本中芽孢检测的主要方法。该方法结果相对准确,但培养、分离和鉴定过程耗时且繁琐,不能实现及时检测^[2]。近年来,随着光学检测技术的进步,光谱检测技术成为食源性微生物检测领域中的新趋势。其中,荧光光谱技术^[3]和近红外光谱技术^[4]以其便捷、快速、无损且易操作的特点在该领域逐渐获得应用。然而,这些方法存在易受元素相互干扰、对水分含量较高的样本检测不适用以及灵敏度限制等局限性,难以满足对食源性芽孢进行快速定性识别和精确定量的需求。因此,亟需构建一种灵敏度强、重现性好且高效快速的检测方法,以满足当前食源性芽孢快速检测的需求。

表面增强拉曼光谱(SERS)是一种基于拉曼光谱的生物指纹识别技术,具有灵敏度高、光谱峰形窄、抗水分干扰及荧光背景低的特点,能够通过光谱图展示目标检测物的分子结构和组成信息^[5]。然而,SERS的信号强度较弱,现有研究通常采用贵金属纳米材料作为基底增强信号。纳米银由于其出色的电磁场增强能力、表面易于修饰、高稳定性以及较大的表面积,被广泛用于SERS基底制备^[6]。这些基底通过局部表面等离子体共振(LSPR)产生“热点”,极大地提高了拉曼光谱信号的强度。Chen等^[7]通过合成纳米银粒子(AgNPs)溶胶结合SERS技术,无标记识别了包括大肠杆菌在内的多种食源性致病菌,其中以单增李斯特菌为代表的目标物的检出限为 10^3 cfu/mL。此外,Zhao等^[8]开发了一种结合偏最小二乘法回归和人工神经网络的无标记SERS技术,实现了金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及沙门氏菌在混合样品中的定量分析。上述研究表明,SERS技术在食品微生物的快速定性识别和数字化定量检测领域具有巨大的潜力。有效制备具有大量分布均匀的“热点”的SERS基底,可实现SERS信号的有效提升^[9]。

本研究制备了球状纳米银(AgNS)、六边状纳米银(AgNH)以及花状纳米银(AgNF)3种不同形貌的银纳米材料,通过考察其对产气荚膜梭菌芽孢(*C. perfringens* spores)拉曼光谱的增强效果,优选出SERS增强效应最优越的基底材料。在此基础上,通过采集枯草杆菌芽孢(*B. subtilis* spores)、蜡样杆菌芽孢(*B. cereus* spores)和产气荚膜梭菌芽孢3种不同食源性芽孢的SERS图谱,并对这些光谱进行解析,结合聚类分析(HCA)和K近邻算法(KNN)等机器学习法对3种芽孢进行光谱分析和定性识别,构建了食源性芽孢数字化定量模型,以期快速、便捷的食源性芽孢检测提供技术支撑。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

枯草杆菌芽孢、蜡样杆菌芽孢和产气荚膜梭菌芽孢菌株分别来源于中国菌种保藏中心和广东环凯微生物技术有限公司,并在 -80 °C保存于瓷珠法菌种保存管中。

所使用的培养基胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)、胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂培养基(TSC)以及产芽孢肉汤均购自北京陆桥有限公司;硫乙醇酸盐流体培养基(FTG)、LB培养基、DSM培养基购自青岛海博有限公司。

无水乙醇、硼氢化钠(NaBH_4)、硫酸锰(MnSO_4)、浓盐酸(HCl)、浓硝酸(HNO_3)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)均为分析纯级。

1.2 主要实验仪器

LabRAM HR Evolution 激光共聚焦拉曼光谱仪(日本HORIBA株式会社);ECLIPSE 80i 相差显微镜(日本NIKON公司);UV-2600 紫外分光光度计(岛津企业管理(中国)有限公司);Beckmancoulter 高速冷冻离心机(广州立诺自动化设备有限公司);MIR-254 低温培养箱(日本SANYO公司);BHC-1000IIA2 生物安全柜(上海川一实验仪器有限公司)。

1.3 食源性致病菌芽孢培养方法

将 -80 °C瓷珠法菌种保存管中的枯草杆菌芽孢、蜡样杆菌芽孢和产气荚膜梭菌芽孢瓷珠取出,分区划线接种在LB培养基和TSC培养基上进行活化。芽孢培养方法为实验室常用方法,详见文献^[10]。

1.4 不同形貌纳米材料的制备

AgNS的制备^[11]:称取4 mg AgNO_3 于25 mL蒸馏水中,称取5 mg NaBH_4 于75 mL蒸馏水中。在搅拌

条件下, 将上述 AgNO_3 溶液逐滴加入到含有 NaBH_4 的溶液中, 经 90 min 搅拌老化反应后, 得到亮黄色的溶胶。制得的胶体溶液置于 4°C 避光保存。

AgNH 的制备^[12]: 在避光条件下, 向锥形瓶中依次加入 21.74 mL 水、50 μL 0.05 mol/L AgNO_3 、500 μL 75 mmol/L 柠檬酸钠溶液和 2.5 mL 0.7 mmol/L PVP, 剧烈搅拌 1 min 后, 快速加入 60 μL 30% H_2O_2 , 静置 3 min, 最后加入 250 μL 0.1 mol/L NaBH_4 , 该过程中溶液颜色发生“无色-浅黄色-深黄色-红色-蓝色”的变化, 待变为蓝色时标志反应完成。保存方法同上。

AgNF 的制备^[13]: 在烧杯中依次加入 10 mL 去离子水、0.2 mL AgNO_3 溶液(1 mol/L)和 2 mL PVP(1%), 室温下匀速搅拌并加入 1 mL 抗坏血酸(0.1 mol/L), 持续搅拌 15 min 即得到反应物。将反应产物在 8 000 r/min 下离心 10 min, 洗涤 3 次后重悬于 10 mL 去离子水中, 得到花状纳米银溶液。保存方法同上。

1.5 纳米材料表征

将制备好的 3 种银纳米材料, 依次置于紫外可见分光光度计中进行光谱扫描。根据 UV-Vis 峰值位置判断是否有纳米银存在; 通过 ZEISS Gemini 300 扫描电镜(SEM)进行形貌特征表征, 并结合 Nano-measure 软件对 SEM 图进行随机统计分析, 计算平均粒径。

1.6 样品制备

等体积吸取所制备的 3 种胶体溶液, 离心, 收集沉淀并使用无水乙醇洗涤 3 次, 通过比浊法^[14]将 3 种胶体溶液的质量浓度调至 0.05 mg/mL。将浓度均为 10^5 cfu/mL 的食源性芽孢分别与 AgNS、AgNH 和 AgNF 按照体积比 1:1 混合, 超声振荡 5 min, 使纳米颗粒分别与芽孢均匀混合并充分吸附后, 将待测样品滴于载玻片上, 并在无菌操作台中自然晾干备用。分别滴取浓度为 10^7 cfu/mL 的 3 种芽孢样品于载玻片上作为空白对照, 晾干备用。实验所使用的玻璃仪器先在王水($V_{\text{HNO}_3}:V_{\text{HCl}}=1:3$)中浸泡清洗, 随后用去离子水冲洗多次, 以去除表面杂质, 氮气吹干备用。

1.7 拉曼光谱检测

以 532 nm 激光为激发光源, 样品检测前使用硅片(Si)对仪器进行校正。光谱采集范围为 $400 \sim 3\,200\text{ cm}^{-1}$, 设置强度为 15 mW, 100 倍物镜, 积分 30 s, 分辨率为 1 cm^{-1} 。对目标样品进行检测, 每个样品进行 15 次随机采集。

为量化纳米材料的 SERS 增强效应, 通过式(1)计算 SERS 增强因子(AEF):

$$\text{AEF} = \frac{I_{\text{SERS}}/c_{\text{SERS}}}{I_{\text{RS}}/c_{\text{RS}}} \quad (1)$$

式中, I_{SERS} 为芽孢在增强条件下的拉曼特征峰峰强度; I_{RS} 为芽孢在未增强条件下的拉曼特征峰峰强度; c_{SERS} 为芽孢在增强条件下的浓度(cfu/mL); c_{RS} 为芽孢在未增强条件下的浓度(cfu/mL)。

1.8 数据预处理与分析

使用 Excel 2010、Python 3.6、Origin 2021 以及 LabSpec 6 软件进行数据处理。

2 结果与讨论

2.1 3 种不同形貌银纳米材料的表征结果

将 3 种不同形貌的银纳米材料分别进行 UV-Vis 光谱和 SEM 表征, 结果如图 1 所示。从图 1A 的 UV-Vis 光谱表征结果可以看出, 球形 AgNS 只在 410 nm 处呈现 1 个最强的表面等离子体共振(SPR)峰, 即 AgNS 的特征吸收峰。AgNH 在 331、477、750 nm 处呈现 SPR 峰, 分别为面外四极、面内四极和面内偶极等离子体共振峰, 是多边状银纳米材料的典型特征。AgNF 在 275 nm 和 441 nm 处出现 SPR 峰, 与已有文献一致^[11]。3 种不同形貌的银纳米材料的 SEM 表征结果图 1B~D 所示, AgNS 呈现圆球形纳米结构, AgNH 呈现六边形结构, AgNF 呈现花状结构, 通过 Nano-measure 计算得到三者的平均尺寸分别约为 112.56、124.86、98.65 nm。

2.2 不同形貌纳米材料对芽孢的 SERS 增强效应对比

为了研究 AgNS、AgNH 和 AgNF 3 种不同形貌的银纳米材料的增强效果, 以产气荚膜梭菌芽孢为检测对象, 并以其拉曼光谱作为空白对照, 采用激光共聚焦拉曼光谱对“产气荚膜梭菌芽孢+ NPs”混合样品进行光谱采集。图 2 结果显示, 未与增强材料混合时, 产气荚膜梭菌芽孢的拉曼光谱信号弱, 未出现显著特征峰。随着不同形貌银纳米颗粒的添加, 产气荚膜梭菌芽孢的拉曼信号发生了不同程度的

增强, 并表现出极其明显的拉曼信号峰谱图。按照公式(1), 以产气荚膜梭菌芽孢 $1\ 024\ \text{cm}^{-1}$ 处的拉曼光谱强度计算不同形貌银纳米材料对食源性芽孢的SERS增强因子, 结果如表 1 所示。AgNF 的 AEF 远高于 AgNS 和 AgNH, 即花状 AgNPs 对食源性芽孢的SERS增强效果最优。

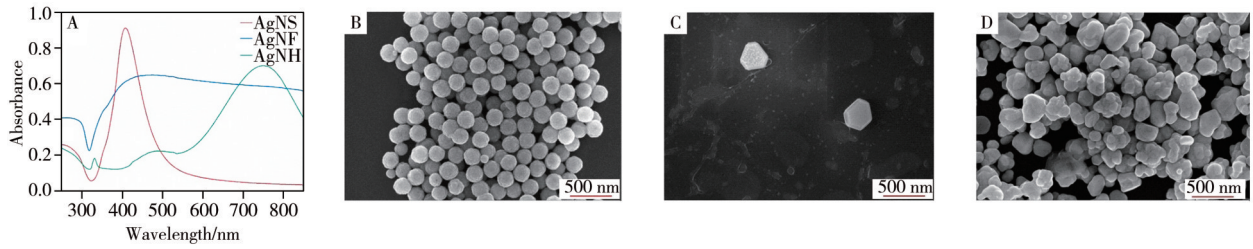


图1 AgNS、AgNH 和AgNF 的UV-Vis 光谱(A)及其SEM图(B-D)
Fig. 1 UV-Vis spectra(A) and SEM images(B-D) of AgNS, AgNH and AgNF

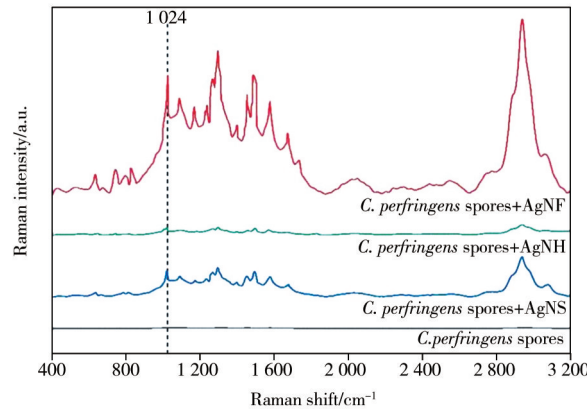


图2 3种纳米材料对产气荚膜梭菌芽孢的SERS响应图
Fig. 2 SERS response images of three nanomaterials to *C. perfringens* spores

表 1 不同形貌的银纳米材料对产气荚膜梭菌芽孢的SERS增强因子

Table 1 SERS enhancement factors of *C. perfringens* spores of silver nanomaterials with different morphologies

| Type | $I_{RS}/\text{a. u.}$ | $I_{SERS}/\text{a. u.}$ | c_{RS}/c_{SERS} | AEF |
|------|-----------------------|-------------------------|-------------------|--------------------|
| AgNS | 852 | 48 129 | 100 | 5.64×10^3 |
| AgNH | 852 | 13 587 | 100 | 2.10×10^3 |
| AgNF | 852 | 218 060 | 100 | 2.56×10^4 |

2.3 AgNF对3种芽孢SERS增强效应的重复性检验

为验证AgNF在食源性芽孢检测中的稳定性, 通过激光共聚焦拉曼光谱仪分别对浓度均为 $10^5\ \text{cfu/mL}$ 的枯草杆菌芽孢、蜡样杆菌芽孢和产气荚膜梭菌芽孢随机扫描 15 次, 结果如图 3 所示。以AgNF为SERS基底采集的3种食源性芽孢的15条平行SERS光谱具有良好的重复性。枯草杆菌芽孢在 $1\ 024\ \text{cm}^{-1}$ 处拉曼峰值的相对标准偏差(RSD)为9.3%, 蜡样杆菌芽孢在 $1\ 024\ \text{cm}^{-1}$ 处的RSD为8.5%, 而产气荚膜梭菌芽孢在 $1\ 024\ \text{cm}^{-1}$ 处的RSD为3.7%。通过比较可以看出, 产气荚膜梭菌芽孢的RSD最低, 表明其在相同条件下的拉曼峰值具有更好的稳定性。

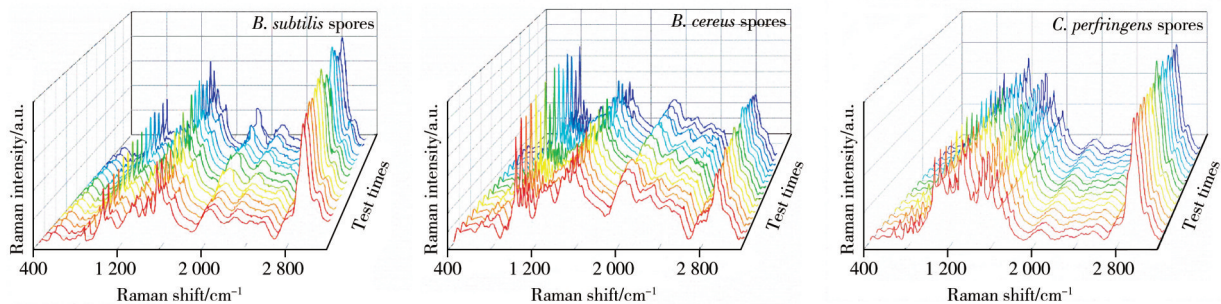


图3 AgNF对3种芽孢SERS增强效应的重复性试验结果
Fig. 3 Repeatability test results of AgNF enhancing SERS effects on three types of spores

2.4 3种食源性芽孢的光谱解析

以AgNF为基底,对上述3种食源性芽孢进行15次随机SERS扫描,图4为在400~1 800 cm^{-1} 光谱范围内,经基线校正和平滑处理的3种食源性芽孢的SERS平均图谱。表2为这些SERS光谱峰位的初步归属。可以明显看出三者的拉曼振动峰数量存在显著差异。由于芽孢中吡啶二羧酸钙(Ca^{2+} -DPA)的浓度相对较高(约为芽孢干重的5%~15%),可以观察到,3种食源性芽孢的SERS光谱中 Ca^{2+} -DPA的振动峰数量及其峰强度在整体光谱中占主导地位(图4)。这些振动峰的位置主要分布在1 000~1 023 cm^{-1} 、1 387~1 402 cm^{-1} 、1 443~1 455 cm^{-1} 和1 569~1 577 cm^{-1} 波段。不同芽孢的 Ca^{2+} -DPA含量差异导致出峰数量与强度不同也可以作为芽孢的判断依据,3种不同食源性芽孢 Ca^{2+} -DPA的SERS出峰强度对比结果如图5所示,其中枯草杆菌芽孢和产气荚膜梭菌芽孢在1 005~1 025 cm^{-1} 、1 397~1 401 cm^{-1} 、1 446~1 452 cm^{-1} 和1 575~1 577 cm^{-1} 均存在拉曼峰且强度各不相同,蜡样杆菌芽孢只在1 005~1 025 cm^{-1} 和1 446~1 452 cm^{-1} 波段出现拉曼峰,且其在1 005~1 025 cm^{-1} 处的峰强度最强。 Ca^{2+} -DPA的SERS光谱出峰强度间存在明显差异,是区分3种食源性芽孢的主要特征峰。

此外,在SERS光谱图谱中还可以观察到3种食源性芽孢的其他拉曼振动峰,这些峰的出峰位置和强度差异明显,这些差异体现了不同芽孢组成成分和化学键振动形式的不同。枯草杆菌芽孢和蜡样杆菌芽孢在666~673 cm^{-1} (半胱氨酸C—S拉伸模式)、1 047~1 054 cm^{-1} (细胞壁脂质的C—C拉伸模式)和1 537~1 548 cm^{-1} (酰胺II)处均出现拉曼振动峰,但产气荚膜梭菌芽孢在上述光谱范围内不存在振动峰;蜡样杆菌芽孢和产气荚膜梭菌芽孢在1 235~1 231 cm^{-1} (酰胺III)和1 488~1 492 cm^{-1} (腺嘌呤,鸟嘌呤)范围均存在振动峰,而829~838 cm^{-1} (糖苷键延伸(C—C))处的峰只存在于枯草杆菌芽孢和产气荚膜梭菌芽孢的拉曼图谱中。蜡样杆菌芽孢在781 cm^{-1} (酪氨酸C—N键伸缩振动模式)、896 cm^{-1} (磷酸二酯,脱氧核糖)、1 115 cm^{-1} (核酸 PO_2 拉伸模式)和1 320 cm^{-1} (腺嘌呤(核酸))处有特征拉曼振动峰;产气荚膜梭菌芽孢在634 cm^{-1} (苯丙氨酸C—C扭曲模式)、744 cm^{-1} (细胞壁肽聚糖结构单元)和1 672 cm^{-1} (酰胺I(不饱和脂质))处有特征振动。由此可见,基于AgNF为基底材料的SERS技术具有区分不同类型食源性芽孢的能力。

2.5 3种食源性芽孢的定性识别

本研究采用HCA对3种芽孢的拉曼光谱进行初步对比分析,并通过主成分分析(PCA)和KNN等机器学习算法开展模型建立和菌种定性识别工作,对以AgNF为基底材料的SERS技术检测3种食源性芽孢的分类效果进行评估。

HCA是一种无监督的机器学习算法,通过该算法可将SERS光谱进行分组,使相似的观察值彼此靠近。为了实现目标检测物SERS光谱的分析,可以采取先聚类再判断的方法,并构建树状图来评估研究对象种群之间的相似性与差异性^[27]。

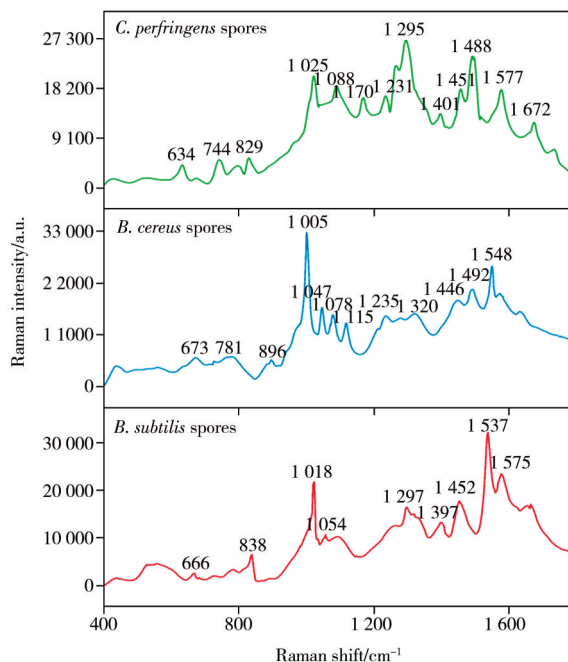


图4 3种食源性芽孢在400~1 800 cm^{-1} 光谱波段的SERS平均图谱

Fig. 4 SERS average spectra of three food-borne spores in 400~1 800 cm^{-1} spectral band

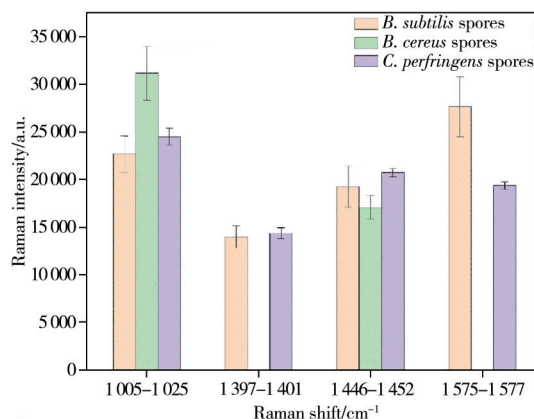


图5 3种不同食源性芽孢中 Ca^{2+} -DPA的SERS出峰强度对比

Fig. 5 Comparison of SERS peak intensity of Ca^{2+} -DPA in three different food-borne spores

表2 3种食源性芽孢 SERS 光谱拉曼位移的暂定归属^[15-26]

Table 2 Tentative attribution of SERS spectral Raman shifts of three food-borne spores^[15-26]

| Raman shift/cm ⁻¹ | | | Assignment | Raman shift/cm ⁻¹ (Reference) |
|------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|--|
| <i>B. subtilis</i> spores | <i>B. cereus</i> spores | <i>C. perfringens</i> spores | | |
| - | - | 634 | 苯丙氨酸 C—C 扭曲模式 | 624 |
| 666 | 673 | - | 半胱氨酸 C—S 拉伸模式 | 662~677 |
| - | - | 744 | 细胞壁肽聚糖结构单元 | 740 |
| - | 781 | - | 酪氨酸 C—N 键伸缩振动模式 | 785~792 |
| 838 | - | 829 | 糖苷键延伸(C—C) | 830~840 |
| - | 896 | - | 磷酸二酯, 脱氧核糖 | 897 |
| 1 018 | 1 005 | 1 025 | Ca ²⁺ -DPA | 1 017 |
| 1 054 | 1 047 | - | 细胞壁脂质的 C—C 拉伸模式 | 1 047~1 056 |
| - | 1 078 | 1 088 | DNA、O—P—O | 1 084 |
| - | 1 115 | - | 核酸 PO ₂ 拉伸模式 | 1 129 |
| - | 1 235 | 1 231 | 酰胺 III | 1 235 |
| 1 297 | - | 1 295 | 脂质 CH(变形) | 1 299 |
| - | 1 320 | - | 腺嘌呤(核酸) | 1 322 |
| 1 397 | - | 1 401 | Ca ²⁺ -DPA | 1 395~1 403 |
| 1 452 | 1 446 | 1 451 | Ca ²⁺ -DPA | 1 440~1 452 |
| - | 1 492 | 1 488 | 腺嘌呤, 鸟嘌呤 | 1 486~1 498 |
| 1 537 | 1 548 | - | 酰胺 II | 1 528~1 547 |
| 1 575 | - | 1 577 | Ca ²⁺ -DPA | 1 570~1 580 |
| - | - | 1 672 | 酰胺 I (不饱和脂质) | 1 665 |

图 6 中 SERS 光谱的聚类分析显示出 3 个明显的簇, 各簇之间相互聚类无交叉干扰。在聚类距离为 3 的位置, 3 种芽孢被清晰地分为 3 个独立的聚类, 其中枯草杆菌芽孢和蜡样杆菌芽孢在聚类距离为 7 时被归为一类, 这种聚类现象说明两者在 SERS 特征拉曼光谱上的相似度较高。这是因为它们同属于芽孢杆菌菌属的芽孢, 化学结构和组成较为相似, 而与属于梭菌芽孢属的产气荚膜梭菌芽孢在结构和组成成分上存在明显区别。基于 SERS 光谱技术结合 HCA 分析, 不仅能有效分化 3 种芽孢, 而且还能检测梭状芽孢杆菌与芽孢杆菌之间以及同种属芽孢之间的差异性。

采用 PCA 对 3 种芽孢的原始拉曼光谱数据进行降维处理, 以减少冗余特征、提高分类效率, 并降低计算资源的消耗。PCA 作为一种无监督统计方法, 其基本原理在于通过将原始数据映射到一组新且线性无关的主成分上, 实现数据维度的降低。这一过程旨在最大限度地保留原始数据中的信息, 使得在更低维度上能够更清晰地表达数据的变异性和结构^[28]。通过对 3 种芽孢的原始拉曼光谱数据进行主成分分析降维, 提取前 2 个主成分(图 7)进行可视化分析(图 8), 有助于提高分类模型的效率和准确性。

利用降维后的数据构建 KNN 模型, KNN 是一种基于实例的监督学习算法, 适用于解决分类和回归问题。其核心思想是通过计算未标记数据点与已标记数据点之间的距离, 利用多数表决原则确定未标记数据点的类别^[29]。KNN 具有简单直观、易于理解和实现的特点, 尤其适用于小规模数据集和少量类别的问题。在实际应用中, 选择合适的 K 值至关重要, 当 K 值较小时, 分类的结果比较复杂, 易出现过拟合; K 值过大时, 分

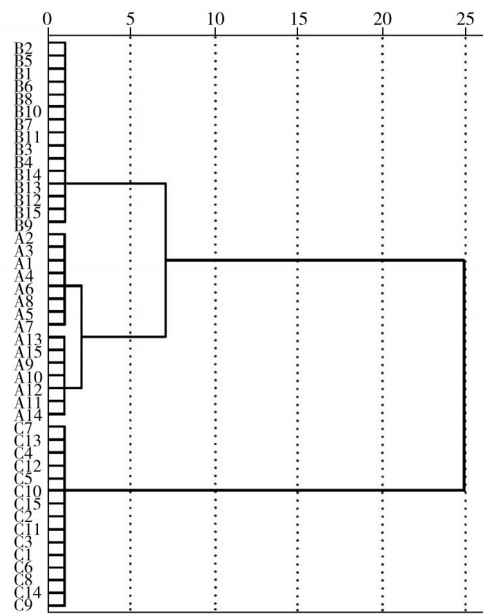


图 6 3 种食源性芽孢 SERS 图谱的 HCA 结果树状图
Fig. 6 Tree diagram of HCA results of SERS maps of three food-borne spores

A1-A15: *B. subtilis* spores; B1-B10: *B. cereus* spores, C1-C10: *C. perfringens* spore

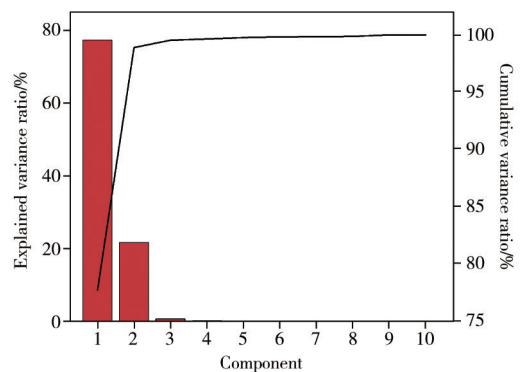


图 7 主成分累计贡献率

Fig. 7 Principal component cumulative contribution rate

类简单，出现错误的识别概率较大。不同 K 值对芽孢识别效果的影响见图 9。

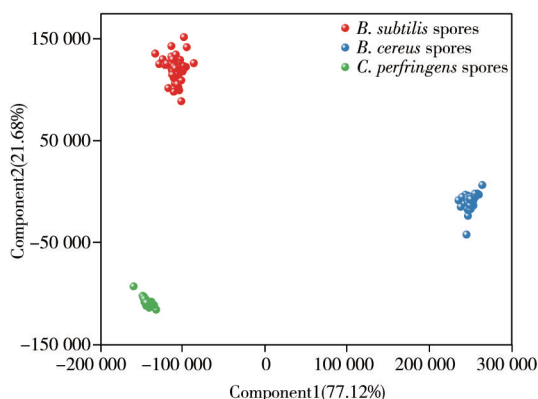


图 8 PCA 降维后样本数据分布图

Fig. 8 Sample data distribution after PCA dimensionality reduction

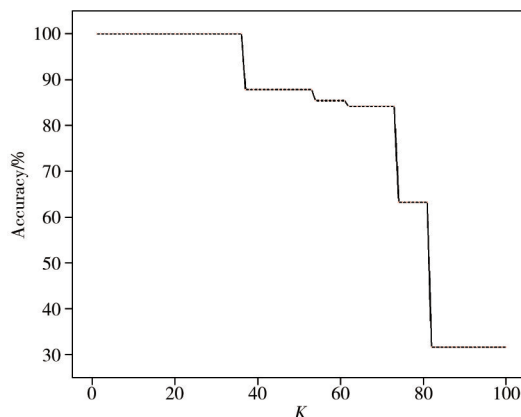


图 9 不同 K 值 KNN 识别率

Fig. 9 Recognition rate of KNN with different K values

随着 K 值的增大，识别的准确度逐渐下降，其中，在 $K > 70$ 后，识别准确度明显下降。本文选用 $K=1$ ，分析其对芽孢的识别效果，结果见表 3。由表可知， $K=1$ 的 KNN 算法在识别食源性芽孢分类中无识别错误，识别率可达 100%。

表 3 3 种食源性致病菌芽孢的 KNN 模型分类结果

Table 3 Classification results of KNN model of three food-borne pathogens

| Measured group | Prediction group | | | Total | Sensitivity/% | Specificity/% |
|------------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------------|-------|---------------|---------------|
| | <i>B. subtilis</i> spores | <i>B. cereus</i> spores | <i>C. perfringens</i> spores | | | |
| <i>B. subtilis</i> spores | 34 | 0 | 0 | 34 | 100/100 | 100/100 |
| <i>B. cereus</i> spores | 0 | 46 | 0 | 46 | | |
| <i>C. perfringens</i> spores | 0 | 0 | 40 | 40 | | |

2.6 食源性芽孢的数字化定量模型构建

以浓度分别为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 cfu/mL 的枯草杆菌芽孢进行 SERS 测试，构建 AgNF 增强基底上不同枯草杆菌芽孢浓度对数值与最强特征峰 1537 cm^{-1} 处 SERS 峰强度之间的线性关系。如图 10A 所示，枯草杆菌 1537 cm^{-1} 处的 SERS 强度随浓度降低而降低， 10^1 cfu/mL 的枯草杆菌芽孢和在 1537 cm^{-1} 处的特征峰不明显。以枯草杆菌芽孢不同浓度的对数值 ($\lg c$) 为横坐标 (x)，以 1537 cm^{-1} 处的峰强度为纵坐标 (y)，得到芽孢的数字化定量方程 $y=6767.38x-6240.21$ ， $r^2=0.92$ (图 10B)。由此可见，以 AgNF 为基底材料的 SERS 技术对食源性芽孢具有良好的定量分析能力，对枯草杆菌芽孢的检出限达 10^1 cfu/mL。

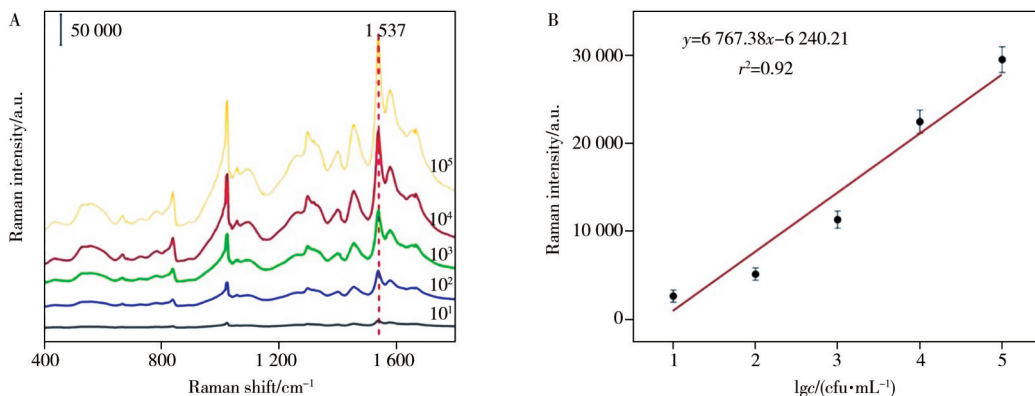


图 10 枯草杆菌芽孢的 SERS 光谱(A)及数字化定量模型(B)

Fig. 10 SERS spectra(A) and digital quantitative model(B) of *B. subtilis* spores

3 结 论

本研究制备了 AgNS、AgNH 和 AgNF 3 种不同形貌的银溶胶纳米材料，并对其进行了 UV-Vis 和

SEM表征,通过与芽孢偶联并采集其拉曼光谱比较了3种不同形状纳米材料的增强效应。结果显示,AgNF对食源性芽孢的SERS增强效果最为显著。通过对比不同种属食源性芽孢的SERS图谱,揭示了它们之间的差异性。区分3种食源性芽孢的主要特征峰分布在 $1\ 005\sim 1\ 025\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 397\sim 1\ 401\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 446\sim 1\ 452\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 575\sim 1\ 577\text{ cm}^{-1}$ 波段。利用HCA和KNN分析,可完全区分3种食源性芽孢的SERS光谱,实现不同食源性芽孢的快速识别。最后,基于枯草杆菌芽孢的浓度对数值与其 $1\ 537\text{ cm}^{-1}$ 处SERS峰强度之间的线性关系,构建了枯草杆菌芽孢的数字化定量方程,检出限为 10^1 cfu/mL 。所构建的方法可实现食源性芽孢的快速定量,为芽孢的有效防控提供了技术手段。

参考文献:

- [1] Cho W I, Chung M S. *Food Sci. Biotechnol.*, **2020**, 29: 1447-1461.
- [2] Vidic J, Chaix C, Manzano M, Heyndrickx M. *Biosensors*, **2020**, 10(3): 15.
- [3] Li R W, Yan J T, Feng B, Sun M, Ding C F, Shen H, Zhu J H, Yu S. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2023**, 15(15): 18663-18671.
- [4] Quintelas C, Mesquita D, Lopes J A, Ferreira E, Sousa C. *Int. J. Pharm.*, **2015**, 492(1/2): 199-206.
- [5] Zhu Y T, Li Z Y, Xie M M, Yan Y L, Zhang T, Wang H X. *J. Instrum. Anal.* (朱怡亭, 李芷瑶, 谢茂梅, 颜月玲, 张桐, 王海霞. 分析测试学报), **2024**, 43(1): 138-146.
- [6] Jiang L, Hassan M M, Ali S, Li H H, Sheng R, Chen Q S. *Trends Food Sci. Technol.*, **2021**, 112: 225-240.
- [7] Chen J G, Xu Y C, Yan H, Zhu Y Z, Wang L, Zhang Y, Lu Y, Xing W L. *Lab Chip*, **2018**, 18(16): 2441-2452.
- [8] Zhao Y W, Zhang Z H, Ning Y, Miao P Q, Li Z, Wang H X. *Spectrochim. Acta A*, **2023**, 293: 122510.
- [9] Gabudean A M, Biro D, Astilean S. *J. Mol. Struct.*, **2011**, 993(1/3): 420-424.
- [10] Tian J Q, Li M Y, Zhu Y D, Zhao L J, Liu S J, Liu W J, Jiang P, Zhao G M, Xu L N, Sun L X, Ma Y Y, Liang D. *Trans. Chin. Soc. Agric. Eng.* (田家齐, 李苗云, 朱瑶迪, 赵莉君, 刘世杰, 刘惟佳, 蒋培, 赵改名, 徐丽娜, 孙灵霞, 马阳阳, 梁栋. 农业工程学报), **2022**, 38(20): 257-265.
- [11] Keleştemur S, Çulha M. *Appl. Spectrosc.*, **2017**, 71(6): 1180-1188.
- [12] Zannotti M, Rossi A, Giovannetti R. *Coatings*, **2020**, 10(3): 288.
- [13] Tian Y R, Liu H M, Chen Y, Zhou C L, Jiang Y, Gu C J, Jiang T, Zhou J. *Sens. Actuators B*, **2019**, 301: 127142.
- [14] Breuch R, Klein D, Siefke E, Hebel M, Herbert U, Wickleder C, Kaul P. *Talanta*, **2020**, 219: 121315.
- [15] Kumar A, Goia D V. *Int. J. Nanomed.*, **2020**: 10425-10434.
- [16] Mungroo N A, Oliveira G, Neethirajan S. *Microchim. Acta*, **2016**, 183: 697-707.
- [17] Chisanga M, Muhamadali H, Ellis D I, Goodacre R. *Appl. Spectrosc.*, **2018**, 72(7): 987-1000.
- [18] Gao W C, Li B, Yao R Z, Li Z P, Wang X W, Dong X L, Qu H, Li Q X, Li N, Chi H, Zhou B, Xia Z P. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(18): 9836-9842.
- [19] Christie G, Setlow P. *Cell Signalling*, **2020**, 74: 109729.
- [20] Das S, Saxena K, Tinguely J C, Pal A, Wickramasinghe N L, Khezri A, Dubey V, Ahmad A, Perumal V, Ahmad R, Wadduwage D N, Ahluwalia B S, Metha D S. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2023**, 15(20): 24047-24058.
- [21] Kashif M, Majeed M I, Nawaz H, Nawaz H, Rashid N, Abubakar M, Ahmad S, Ali S, Hyat H, Bashir S, Batool F, Akbar S, Anwar M A. *Spectrochim. Acta A*, **2021**, 261: 119989.
- [22] Akanny E, Bonhommé A, Commun C, Doleans-Jordheim A, Farre C, Bessueille F, Bourgeois S, Bordes C. *J. Raman Spectrosc.*, **2020**, 51(4): 619-629.
- [23] Liu S J, Zhu Y D, Li M Y, Liu W J, Zhao L J, Ma Y Y, Xu L N, Wang N, Zhao G M, Liang D, Yu Q Y. *Food Anal. Methods*, **2022**, 15(10): 2810-2820.
- [24] Zhu A F, Ali S, Xu Y, Ouyang Q, Wang Z, Wang Z, Chen Q S. *Spectrochim. Acta A*, **2022**, 270: 120814.
- [25] Dina N E, Gherman A M R, Colniță A, Marconi D, Sârbu C. *Spectrochim. Acta A*, **2021**, 247: 119149.
- [26] An X J, Zhao J, Pei Y, Wang Z W, Liu Y K, Li B, Wei Y N, Wei H Y, Wu Z G, Li J W. *J. Instrum. Anal.* (安晓洁, 赵静, 裴媛, 王志武, 刘艳坤, 李波, 魏颖娜, 魏恒勇, 吴振刚, 李景武), **2023**, 42(1): 21-28.
- [27] Cozar I B, Colniță A, Szöke-Nagy T, Gherman A M R, Dina N E. *Anal. Lett.*, **2019**, 52(1): 177-189.
- [28] Pacella M. *Comput. Ind. Eng.*, **2018**, 122: 161-169.
- [29] Uddin S, Haque I, Lu H, Moni M A, Gide E. *Sci. Rep.*, **2022**, 12(1): 6256.

(责任编辑: 盛文彦)