

束琴霞, 张 鹏, 张 林, 等. 发光细菌法快速检测水发产品中甲醛毒性的研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 329-331.

发光细菌法快速检测水发产品中甲醛毒性的研究

束琴霞¹, 张 鹏², 张 林², 邹勇平²

(1. 扬州市职业大学, 江苏扬州 225000; 2. 江苏省扬州市产品质量检验所, 江苏扬州 225000)

摘要:介绍一种以发光细菌(青海弧菌 Q67)作为检测活体检测水发产品中甲醛毒性的方法。检测发现随着甲醛浓度的升高和作用时间延长, 青海弧菌 Q67 的相对发光强度逐渐降低, 作用时间在 5 min 左右时, 甲醛对青海弧菌的效应拟合曲线线性最好, 甲醛对青海弧菌 Q67 的 EC_{50} 为 0.044 mg/mL, 甲醛对青海弧菌的最低检测限为 0.01 mg/mL。

关键词:发光细菌; 甲醛毒性; 水发产品; 发光强度

中图分类号: X131.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0329-02

甲醛是一种无色、有强烈刺激性气味的气体, 易溶于水。水发产品中所含甲醛的浓度不高, 一般不会急性中毒, 但长期食用这些含甲醛的产品, 会产生慢性中毒, 造成肝、肾损害, 诱发肝炎、肾炎和酸中毒, 甚至癌变。因为甲醛具有较好的杀菌和防腐作用, 一些不法商贩在水发产品中违规使用甲醛对该类产品进行防腐, 来保持产品的光鲜度和延长产品的保质期。从相关文献来看, 还有不少商家无视国家相关法律法规, 继续把甲醛添加到水发产品中^[1-2]。近年来, 随着水发产品用甲醛浸泡事件的不断发生, 食品的甲醛问题成为公共卫生关注的焦点, 并被列入国家食品安全战略研究的重点。

甲醛的常用检测方法主要有变色酸法、乙酰丙酮法、品红亚硫酸光度法、高效液相色谱法(HPLC法)、气相色谱法(GC法)、气-质联用法(GC-MS法)等^[3]。目前, 甲醛测定多采用比色法, 比色法具有仪器价格低廉、操作简单、易于推广等优点, 但是由于基于化学反应的原理, 专属性不够, 容易受到性质相似物质的干扰; HPLC法、GC法、GC-MS法等仪器分析方法虽具有更强的选择性和更高的灵敏度, 但检测所用仪器设备和检测成本投入要求较高, 故无法很好地推广。本研究尝试使用一种以发光细菌——青海弧菌 Q67 作为检测活体检测水发产品中甲醛毒性的方法, 为相关的项目检测和行业监管提供新的技术支持。

1 试验部分

1.1 发光细菌法的测定原理

发光细菌体内的荧光素酶催化荧光素的氧化作用产生生物发光, 生物发光直接与细胞的活性及代谢状况相关。毒性物质会改变细胞的状态, 包括细胞壁、细胞膜、电子的转移系统、酶及细胞质的结构, 这些变化最终导致生物发光的减弱。通过生物发光强度的测定即可计算得到水发产品甲醛毒性的强弱。

1.2 试验仪器及耗材

主要检测仪器: Synergy H1 多功能微孔板检测仪(检测仪

序列号 269900); 隔水式恒温培养箱; 移液器。

试验用菌剂: 发光细菌——青海弧菌 Q67(试验用菌为青海弧菌 Q67 冻干粉, 由华东师范大学提供)。根据比较, 青海弧菌 Q67 生长的最适条件是: 温度 10 ~ 30 ℃, pH 值 6.0 ~ 9.0, 盐度 0.85% (质量分数)。因为青海弧菌与其他发光细菌如明亮发光杆菌、费氏弧菌等相比较有较宽的 pH 值适应范围及较低的盐度要求, 使青海弧菌 Q67 在样品预处理、排除干扰因子等方面具有明显的优势, 所以本研究选用 Q67 为测试细菌。

试验用水发产品: 随机购自扬州市区的 3 个菜场和 1 个批发市场。

1.3 试验方法

1.3.1 菌剂复苏与培养 (1) 取 -20 ℃ 保存的青海弧菌 Q67 冻干粉, 加入 5 mL 0.85% (质量分数, 下同) 的 NaCl 溶液, 充分混合后于 20 ℃ 放置 15 min, 使青海弧菌 Q67 恢复稳定发光, 所得菌液待用。(2) 发光细菌的培养: 青海弧菌培养。培养基配方: I 号, 混合盐 12.49 g, 酵母膏 5 g, 胰酶 5 g, 甘油 3 mL, 加水至 1 000 mL, pH 值 9.0; II 号, 混合盐 10 g, 硫酸铵 4.2 g, 葡萄糖 10 g, 甘油 3 mL, 胰酶 1 g, 加水至 1 000 mL, pH 值 8.5。混合盐成分: $MgSO_4$ 5.07 g, $MgCO_3$ 2.25 g, $MgCl_2$ 0.19 g, $CaCO_3$ 0.06 g, KCl 0.44 g, NaCl 16.59 g, KBr 0.24 g。塞上棉球, 用牛皮纸包扎好, 经 121 ℃ 高压灭菌 20 ~ 30 min 后备用^[4]。固体培养基: 以上配方加 2% 琼脂即为固体培养基。电炉加热使溶解至透明, 趁热用漏斗分装于试管中, 每支试管装至 1/3, 塞上棉球, 用牛皮纸包扎好, 经 121 ℃ 高压灭菌 20 ~ 30 min 后, 取出制成斜面。培养: 将青海弧菌冻干粉用 0.5 mL 0.85% NaCl 溶解, 迅速转入 50 mL 培养液中, 22 ℃ 恒温培养, 每 24 h 后转接 1 次斜面, 将培养好的第 3 代斜面置于 4 ℃ 冰箱中备用。将培养好的菌种接入固体培养基平板中, 22 ℃ 恒温培养 12 ~ 18 h 后备用^[5]。(3) 检测用菌液制备: 将培养好的菌种接入固体培养基平板中, 22 ℃ 恒温培养 12 ~ 18 h 后加 5 mL 0.85% 生理盐水至青海弧菌平板中, 适当振荡将菌体冲下, 漩涡振荡器将菌液摇匀, 并用 0.85% 生理盐水把细菌浓度调节至合适范围后备用。

1.3.2 标样及样品处理 甲醛: 用蒸馏水将甲醛配制成一定质量分数的标准液, 进行青海弧菌毒性检测。用实验室自制超纯水将甲醛分别稀释至 6 个浓度梯度系列, 每个浓度系列

收稿日期: 2013-05-31

基金项目: 国家质检总局科研项目(编号: 2010QK175)。

作者简介: 束琴霞(1979—), 女, 江苏丹阳人, 讲师, 主要从事环境微生物技术和食品安全分析研究。E-mail: yzhchliu2006@126.com。

根据先前的试验结果,使得浓度系列产生的发光强度抑制率在 0~100% 均匀分布。然后再对各样品进行青海弧菌毒性检测。样品处理:准确称取 1.0 g 预先打匀的样品于 10 mL 磨口具塞比色管中,加 0.85% 生理盐水至 10 mL,轻摇至样品充分溶解,用 0.45 μm 滤膜过滤,在不同时间间隔用生物毒性测试仪测量相对发光强度。

1.3.3 甲醛的毒性检测 Synergy H1 (检测仪序列号 269900)检测方法:向 96 孔板中的 A1 孔加入 200 μL 的超纯水(作为本底),A2 孔加入 200 μL 的超纯水(作为空白),A3 至 A7 孔分别依次加入上述配制的浓度梯度的标准液,再于 A2 至 A7 孔中分别加入“1.3.1”节所得菌液 50 μL(或 100 μL),在 B、C 排做平行样,然后放入 Synergy H1 检测仪中,分别检测 5、10、15、30、60 min 时青海弧菌的发光强度。

1.3.4 数据处理 通常用相对发光强度反映毒性大小。毒性越大则对发光抑制越强烈,相对发光强度就越小,反之则发光强度越大。

相对发光强度及发光抑制率的计算:

相对发光强度 = (样品发光强度/对照发光强度) × 100%。(1)

根据拟合模拟计算甲醛与青海弧菌 Q67 作用不同时间的半效应浓度(EC₅₀),拟合剂量-效应曲线,并以此判断甲醛对青海弧菌 Q67 毒性的大小。

2 结果与分析

用实验室自制超纯水将甲醛分别稀释至 6 个质量浓度梯度系列(0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL),然后用 Synergy H1 检测,具体参见“1.3.1”节及“1.3.2”节,计算公式参见“1.3.4”节的公式(1)。

作用时间为 5、10、15、30、60 min 时,不同浓度的甲醛对青海弧菌 Q67 的剂量-效应拟合曲线见图 1。由图 1 分析可见:(1)随着甲醛浓度的升高,青海弧菌 Q67 的相对发光强度逐渐降低,两者呈线性负相关;(2)随着作用时间的延长,青海弧菌的相对发光强度逐渐降低,在 5 min 时,线性方程为 $y = -11.058x + 109.68, r^2 = 0.9947$,甲醛对青海弧菌的效应拟合曲线线性最好,甲醛对青海弧菌 Q67 的 EC₅₀ 为 0.044 mg/mL;(3)甲醛对青海弧菌的最低检测限为 0.01 mg/mL。

笔者使用发光细菌法检测了 8 个水发产品(编号 1~8)的甲醛毒性情况,结果(表 1)表明,所购水发产品均无急性毒性生物效应,毒理学评价安全。

通过表 1 可以看出:用发光细菌检测的 8 个水发产品,在 5~60 min 内,发光强度均未明显下降。根据标准曲线计算,8 个样品的甲醛浓度均低于 0.01 mg/mL。对 6 号样品进行加标处理,加标浓度为 0.02 mg/mL,其 15 min 时相对发光强度为 71.39%,根据标准曲线计算得出其甲醛浓度为 0.017 mg/mL,加标回收率约为 85%。

由于水发样品成分复杂,干扰因素较多,各种成分都会影响甲醛毒性检测的结果,所以在以后的试验过程中,应结合其他甲醛标准检测方法,进一步研究甲醛对发光细菌的毒性影响,同时根据不同的样品探索样品前处理方法,使得甲醛毒性检测尽量避免其他基质的影响^[6-7]。

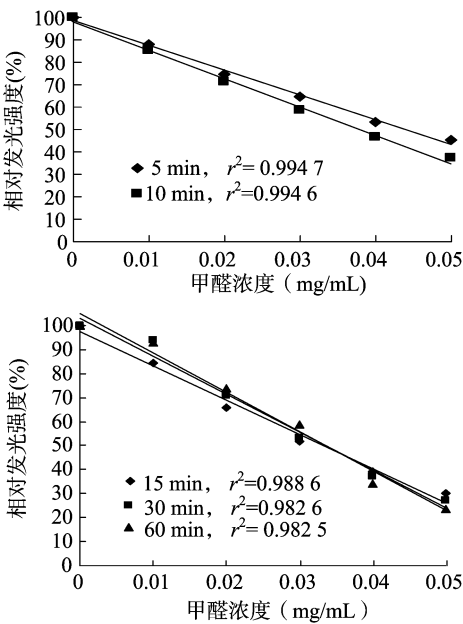


图1 不同浓度、不同时间下甲醛对青海弧菌的毒性效应

表 1 水发产品中甲醛对青海弧菌的毒性检测结果

水发产品 样品号	相对发光强度(%)				
	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min
1	96.33	95.48	94.36	94.27	92.55
2	98.84	96.29	93.46	92.78	92.32
3	97.55	97.86	96.37	95.71	93.64
4	98.27	97.36	96.22	95.49	96.39
5	95.36	96.48	96.11	95.68	95.74
6	96.55	96.74	95.39	94.28	93.16
7	97.56	97.33	96.58	96.43	95.89
8	98.37	98.21	97.67	96.37	95.41
6(加标)	72.86	72.54	71.39	70.64	70.2

注:6(加标)为 6 号水发产品中加标 0.02 mg/mL。

发光细菌法进行甲醛毒性的检测,能直接、客观地反映出甲醛对生物的急性毒性。对于因为人为故意添加原因造成的甲醛残留,毒性测试可以在 5 min 内快速展现甲醛的毒性。发光细菌法非常适合检测甲醛毒性,便于监督机构对水发产品的甲醛超标问题作出快速反应,为全面保障广大消费者的健康与生命安全提供一种快速、有效的检测方法。

3 注意事项

在分析前,大部分样品不需要做特殊准备,但对一些特别的样品需要进行测试前的准备,几种情况列出如下:

(1) 浑浊样品:浑浊或含有不沉淀颗粒物的样品,需要用一些通常的处理办法去除浊度。例如可以用适当的转速离心一定时间,达到去除浊度或颗粒物的目的。应当注意的是,样品的浑浊可能引起不明确的发光增强或减弱,只有当不考虑浑浊带来的毒性时,才使用以上的去浊度的过程。

(2) pH 值:样品的 pH 值可能以一种不可预测的方式影响测试结果。当 pH 值在 6.0~9.0 之间时,测试试剂表现出良好的发光性,当样品的 pH 值超出这个范围时,会影响毒性检测,因而,样品的 pH 值应该按照规定调节到 6~9 之间。

(3) 有色样品:如果有明显的颜色(特别是红、棕或黑色),

唐长波,方立刚.黄桃可溶性固形物的近红外漫反射光谱检测[J].江苏农业科学,2013,41(11):331-333.

黄桃可溶性固形物的近红外漫反射光谱检测

唐长波¹,方立刚²

(1. 苏州市职业大学,江苏苏州 215104; 2. 江苏省现代企业信息化应用支撑软件工程技术研发中心,江苏苏州 215104)

摘要:利用傅里叶变换近红外漫反射光谱(NIRS)技术,采用偏最小二乘法(PLS),以 60 个黄桃为标准样品,25 个黄桃为验证样品,研究近红外光谱漫反射技术预测黄桃内部可溶性固形物含量的方法。试验结果表明:对原始光谱选取 $9\,400 \sim 5\,450$ 、 $4\,600 \sim 4\,250\text{ cm}^{-1}$ 波数范围,进行减去一条直线处理,采用改进偏最小二乘法建立黄桃可溶性固形物的预测模型, r_c 、 $RMSECV$ 分别为 0.863 2、0.582,外部验证 r_p 、 $RMSEP$ 分别为 0.941 3、0.275,说明近红外漫反射光谱无损检测黄桃的可溶性固形物含量是可行的。

关键词:近红外漫反射光谱;黄桃;可溶性固形物

中图分类号:S662.101;TS201.2

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2013)11-0331-03

黄桃属于蔷薇科桃属,富含胡萝卜素、膳食纤维、铁钙及多种微量元素,肉质紧致香甜,深受广大消费者的喜爱。但黄桃由于产地、栽培条件及品种的不同,其食用品质也会有较大差异。水果中的可溶性固形物主要是糖类,是衡量水果品质的主要指标之一^[1-2],但以往的检测方法需要破坏样品进行分析,无法快速准确地进行水果分级。

收稿日期:2013-02-27

基金项目:江苏省自然科学基金(编号:BK2012164);江苏省苏州市科技计划(编号:SYN201105);江苏省现代企业信息化应用支撑软件工程技术研发中心开放基金(编号: SX201201)。

作者简介:唐长波(1981—),男,博士,讲师,主要从事食品安全与质量控制研究。E-mail: tcb_xueshu@163.com。

通信作者:方立刚,博士,副教授,主要从事精细果业技术研究。E-mail: fanglg@jssvc.edu.cn。

可能会吸收光而影响测试精度。这样的样品应该在测试前用蒸馏水或去离子水稀释(25%或50%)。

(4)含氯样品:由于氯消毒过程导致样品中含有氯,这些氯会影响细菌试剂的活性,从而影响测试结果,这种样品首先要用硫代硫酸钠溶液去氯。

4 结论

根据试验结果分析,使用发光细菌法快速检测水发产品中的甲醛含量并判断是否超标是可行的。综合上述结果,分析可得以下结论:(1)甲醛对青海弧菌 Q67 的毒性存在显著的剂量-效应关系,且效应能够在短时间(5 min 左右)内显现并达到最佳效果,甲醛对青海弧菌 Q67 的 EC_{50} 为 0.044 mg/mL 。(2)根据多次试验分析,待测液与发光细菌青海弧菌菌液的体积比为 2:1 或 4:1 时更利于检测,且能得到较准确的结果。(3)甲醛对青海弧菌的最低检测限为 0.01 mg/mL ,所以发光细菌法可以用于快速检测并判定其是否超标。综上所述,应用青海弧菌 Q67 快速检测水发产品中的甲醛含量将有很好的应用前景,发光细菌法检测快速、简便、精确度较高,但是目前来说尚存在诸多不足,有很多需要克服的问题。如青海弧菌是一种极其脆弱敏感的细菌,极微

近红外无损检测技术近年来因其具有检测快速简便、无污染、不破坏样品等特点,在果蔬等农产品的内部品质检测方面应用广泛^[3-6]。本研究使用近红外光谱结合偏最小二乘法对黄桃中可溶性固形物含量进行快速无损检测,推动黄桃品质的自动在线检测与分级技术在生产中的应用,有助于实现水果分级,提高水果产业的经济效益。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黄桃:采摘于江苏省苏州市吴中区某果园;MPA 型傅里叶变换近红外光谱仪(德国 Bruker 公司);PR-101 α 型折射式数字糖度计($0.0 \sim 45.0^\circ\text{Brix}$,精度 0.1% ,日本 Atago 公司)。

1.2 近红外光谱采集

应用傅里叶变换近红外光谱仪采集黄桃的近红外漫反射

量的重金属或其他有毒物质就能使青海弧菌致死,从而影响其发光强度;食品中的成分较复杂,前处理又存在诸多限制,故试验结果有很多的不确定性。这些问题有待今后探索解决,以完善甲醛的发光细菌检测方法。

参考文献:

- [1] 聂长春. 商丘市水发产品中甲醛的监测分析[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(7):839-839.
- [2] 林太清,徐天源,王春晓. 广州市售水产品中甲醛的使用情况调查[J]. 中国卫生监督杂志,2005,12(1):42-44.
- [3] 李晶平,陆慧宁,鲁统部. 甲醛毒性及其常用检测方法[J]. 广州化工,2006,34(1):51-53.
- [4] 朱文杰,汪杰,陈晓耘,等. 发光细菌一新种——青海弧菌[J]. 海洋与湖泊,1994(3):273-279.
- [5] 吴淑杭. 发光细菌法快速检测农产品中主要污染物联合毒性技术研究[D]. 上海:华东师范大学,2007.
- [6] 熊蔚蔚. 主要畜产品污染物毒性发光细菌快速检测技术研究[D]. 上海:华东师范大学,2008.
- [7] 郑敬民,赵曙霞,朱文杰,等. 环境因子对青海弧菌生长和发光的影响[J]. 华东师范大学学报:自然科学版,1999,18(1):99-103.