

正电纳米银与卷积神经网络用于 4 种食源性致病菌的 SERS 鉴定

杨勇^{1,2}, 董浩^{1,2}, 王澍^{1,2*}, 桑瑶烁^{1,2}, 李志刚^{1,2}, 张龙^{1,2**}, 汪崇文³, 刘勇^{1,2}

¹中国科学院合肥物质科学研究院安徽光学精密机械研究所, 安徽 合肥 230031;

²中国科学技术大学研究生院科学岛分院, 安徽 合肥 230026;

³安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036

摘要 提出一种联合表面增强拉曼散射(SERS)与卷积神经网络(CNN)的方法,并将其用于食源性致病菌的快速鉴定。以带正电荷的银纳米颗粒(AgNPs⁺)为 SERS 基底,采集了金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、副溶血性弧菌以及单增李斯特菌的 SERS 指纹谱,并在这些数据上训练了一个包含 11 个一维卷积层的残差网络 ResNet11 用于这 4 种病原菌 SERS 指纹谱的分类识别。实验结果表明:AgNPs⁺是一种优秀的 SERS 增强基底,可在 624 cm⁻¹、730 cm⁻¹ 等波段增强 4 种病原菌的主要拉曼峰;构建的 ResNet11 分类器对 10⁷ mL⁻¹ 菌液分子浓度下采集的 SERS 指纹谱取得了 99.30% 的分类识别准确率,并且对 10³ mL⁻¹ 菌液分子浓度下采集的 SERS 指纹谱取得 98.00% 的识别准确率。

关键词 生物光学;食源性致病菌;表面增强拉曼散射;带正电荷的银纳米颗粒;卷积神经网络

中图分类号 O433

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL202249.1507405

1 引言

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*)、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, *V. parahaemolyticus*) 以及单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, *L. monocytogenes*) 是几种常见的食源性致病菌,由这些细菌感染引起的食源性疾病是当今世界上最广泛存在的卫生问题之一^[1-2]。在日常食品检验中,准确、灵敏地检测出食品中致病菌污染情况至关重要^[3],常用的细菌鉴定方法有平板培养^[4]、PCR^[5]、基因芯片^[6]、二代测序技术^[7]、免疫学检测^[8]等,这些方法各有优势,但在灵活性、易操作、准确性、低耗费比这几个方面无法统一。

表面增强拉曼散射(SERS)是指检测对象靠近金、银等纳米粒子时,贵金属增强基底表面的电磁场显著放大了检测对象的固有分子振动指纹(即拉曼光谱)^[9]。将 SERS 技术用于细菌检测可以获得不同细菌差异化的分子振动信息,其优点是快速、易于操作、灵敏度高、可用于指纹检测。1989 年,美国 Nebraska 大学的 Holt 等^[10]首次报道了使用 SERS 技术进行病

原菌检测。1993 年,英国纽卡斯尔大学 Magee 课题组从机理分析上指出:整个细菌菌体的指纹图谱可以用于病原菌的分类鉴定^[11]。此后,SERS 指纹谱检测方法被逐步用于沙门氏菌、*S. aureus*、大肠埃希菌等病原菌的检测^[12-13]。然而,SERS 技术用于细菌检测存在一定的使用局限性,主要存在的问题有:1)SERS 增强基底的选择性不强,其信号容易受到杂质的干扰^[14];2)增强材料难以在细菌表面分布均匀,导致细菌光谱强度一致性较差^[15];3)现有基于 SERS 指纹谱鉴定或区分细菌的研究采用的方法主要有主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘回归(OPLS-DA)、支持向量机(SVM)等^[16],这些方法应用于光谱分析均需要提前进行较为繁琐的数据预处理,一旦预处理方法使用不当,有很大概率导致模型预测能力下降,而且这些方法对光谱中非线性因素的抽象能力不足,导致算法的分类性能降低。可见,快速、准确地实现多种类、高相似度的临床微生物拉曼检测仍然具有较大的挑战性。近两年来,深度学习中的卷积神经网络(CNN)在多种类、高相似度的细菌拉曼光谱分析中逐步崭露头角,例如:Lu 等^[17]使用卷积神经网络对 14 种微生物的拉曼光谱进行分类,准确率超过 95%;Ho

收稿日期: 2021-12-09; 修回日期: 2022-03-03; 录用日期: 2022-04-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82072380)、合肥物质科学研究院医疗器械监管专项(YZJJ2021-J-YQ4)、安徽省自然科学基金(1908085QB85)

通信作者: *wangshu@aiofm.ac.com; **zhanglong@aiofm.ac.com

等^[18]使用残差卷积神经网络对 31 种细菌的拉曼光谱进行分类,准确率达到 82%。SERS 与 CNN 结合有望成为一种强大且具有良好前景的病原体检测手段。

针对这一问题,本研究合成了带正电荷的银纳米颗粒(AgNPs⁺),AgNPs⁺通过静电吸附效应稳定地结合在细菌的表面,从而提供高强度、稳定的 SERS 指纹谱。以 AgNPs⁺为 SERS 基底,采集 *S. aureus*、*E. coli*、*V. parahemolyticus* 以及 *L. monocytogenes* 4 种食源性致病菌的 SERS 指纹谱来构建训练数据集与测试数据集。基于残差网络(ResNet)结构构建了包含 10 个一维卷积层的病原菌 SERS 指纹谱分类器 ResNet11,并在训练数据集上进行训练。将测试数据集中未知类型的 SERS 指纹谱输入训练好的 ResNet11 中,即可快速输出该指纹谱的分类标签,从而鉴定对应菌株的类别。与目前实验室主要使用的微生物培养检测方法相比,本研究提出的“SERS+深度学习”方法可直接检测培养后制作的菌液样本,不需进行繁琐耗时的细菌生化检验实验,为食品病原菌感染的鉴定提供了一种快速、准确的方法。

2 实验方法

2.1 细菌样品的准备

收集了徐州医科大学附属医院检验科临床分离株,包括 10 株 *S. aureus*、10 株 *E. coli*、10 株 *V. parahemolyticus* 和 10 株 *L. monocytogenes*。采用梅里埃 VITEK 2 全自动细菌鉴定仪以及药敏实验进行综合鉴定分析时,均获得稳定可靠的鉴定结果。首先,将分离株在哥伦比亚血平板培养基上于 37 °C 过夜培养。然后,使用无菌去离子水制备分子浓度约为 10⁷ mL⁻¹ 的细菌溶液。

2.2 基于银纳米颗粒的 SERS 样品制作

根据文献[19]提出的方法制备 AgNPs⁺,具体步骤如下:1)向 20 mL 去离子水中加入 3.7 mg 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、10 mg 硝酸银(AgNO₃)以及 0.5 mL 氨水,配置 A 溶液;2)向 20 mL 去离子水中加入 3.7 mg CTAB 和 6.1 mg 硼氢化钠(NaBH₄),配置 B 溶液;3)将 A 溶液置于锥形瓶中冰浴搅拌(500 r/min),再将 B 溶液缓慢滴加到锥形瓶中混合并封口,继续搅拌 3 h;4)停止搅拌并撕掉封口膜,加热至沸腾并持续 10 min,冷却至室温后置于阴暗处 4 °C 保存。

2.3 光谱测量

采集 4 种病原菌的 SERS 光谱构建分析数据集。取 10 μL 菌液样品(分子浓度为 10⁷ mL⁻¹)与 10 μL 制备的 AgNPs⁺在 EP 管中混合均匀,孵育 10 min 后吸取 5 μL 混合物滴在单晶硅片上,干燥 30 min 后作为测量样品。使用便携式拉曼光谱仪(B&W TEK,

i-Raman Plus BWS465-785H)测量上述制备样品的 SERS 指纹谱,仪器参数设置如下:使用 785 nm 激发光源,激光功率为 15 mW,使用 20 倍长聚焦物镜,SERS 指纹谱采集的积分时间为 4 s。光谱范围为 400~1800 cm⁻¹,包含 665 个波段。测量前使用硅片对 520 cm⁻¹ 处拉曼位移进行校准。

在每种细菌中随机挑选 7 株测量拉曼信号用于训练,剩余 3 株测量拉曼信号用于测试。测量过程中,每个菌株制备 10 个样品,每个样品随机选择 6 个位点进行检测,每个位点采集 3 条光谱取平均值,即每个菌株采集 60 条光谱。将每种细菌的 420 条 SERS 指纹谱构建训练集用于训练,其余 180 条 SERS 指纹谱构建测试集用于测试。

2.4 基于 CNN 的病原菌 SERS 指纹谱分类网络模型构建

增加 CNN 网络深度可以进行更加复杂的特征抽象,取得更好的预测结果,但过多的卷积层会使模型预测的准确度达到饱和甚至下降^[20-21]。在本研究的 SERS 指纹谱分类任务中,样本量适中,数据维度较高,为了在深度抽象数据特征的同时抑制模型在训练过程中的退化程度,本研究基于残差结构^[22]构建了一个包含 11 个卷积层的残差网络 ResNet11。残差结构如图 1(a)所示,3 个依次连接的卷积层的输入和输出之间包含一条跳跃连接(shortcut connection)路径,当 shortcut connection 路径上无任何运算数据时,该结构被称为恒等模块(identity block)。图 1(b)为 ResNet11 的网络结构示意图,ResNet11 由 1 个卷积模块和 2 个恒等模块组成。采用十折交叉验证进行模型训练与验证,其中 90% 的训练数据用于网络训练,10% 的数据用于当前模型参数的验证。当模型迭代运算时,自动调整参数,使预测误差最小,直到平均预测精度达到稳定值。针对 4 种病原菌的多分类任务,使用交叉熵(cross entropy)损失函数和 Softmax 激活函数,学习率设置为 0.001,批处理数量为 16,在所有训练数据上迭代运算了 100 个 epoch。此外,还测试了卷积层数量小于 3 的浅层 CNN 网络,发现其在 4 种病原菌的多分类任务中效果不如 ResNet11。

2.5 用于评估的其他分类方法

为了对 CNN 方法的性能进行评估,另外选取 4 种经典的机器学习方法进行对比,分别是 Logistic 回归(Logistic)^[23]、SVM^[24]、随机森林(RF)^[25]以及 k-近邻(KNN)^[26],以上 4 种方法的简要介绍及关键参数设置如表 1 所示。

3 结果与讨论

3.1 AgNPs⁺的性能表征

本研究使用 AgNPs⁺作为 SERS 基底,AgNPs⁺与细菌外表面紧密靠近时能够产生 SERS 效应,从而

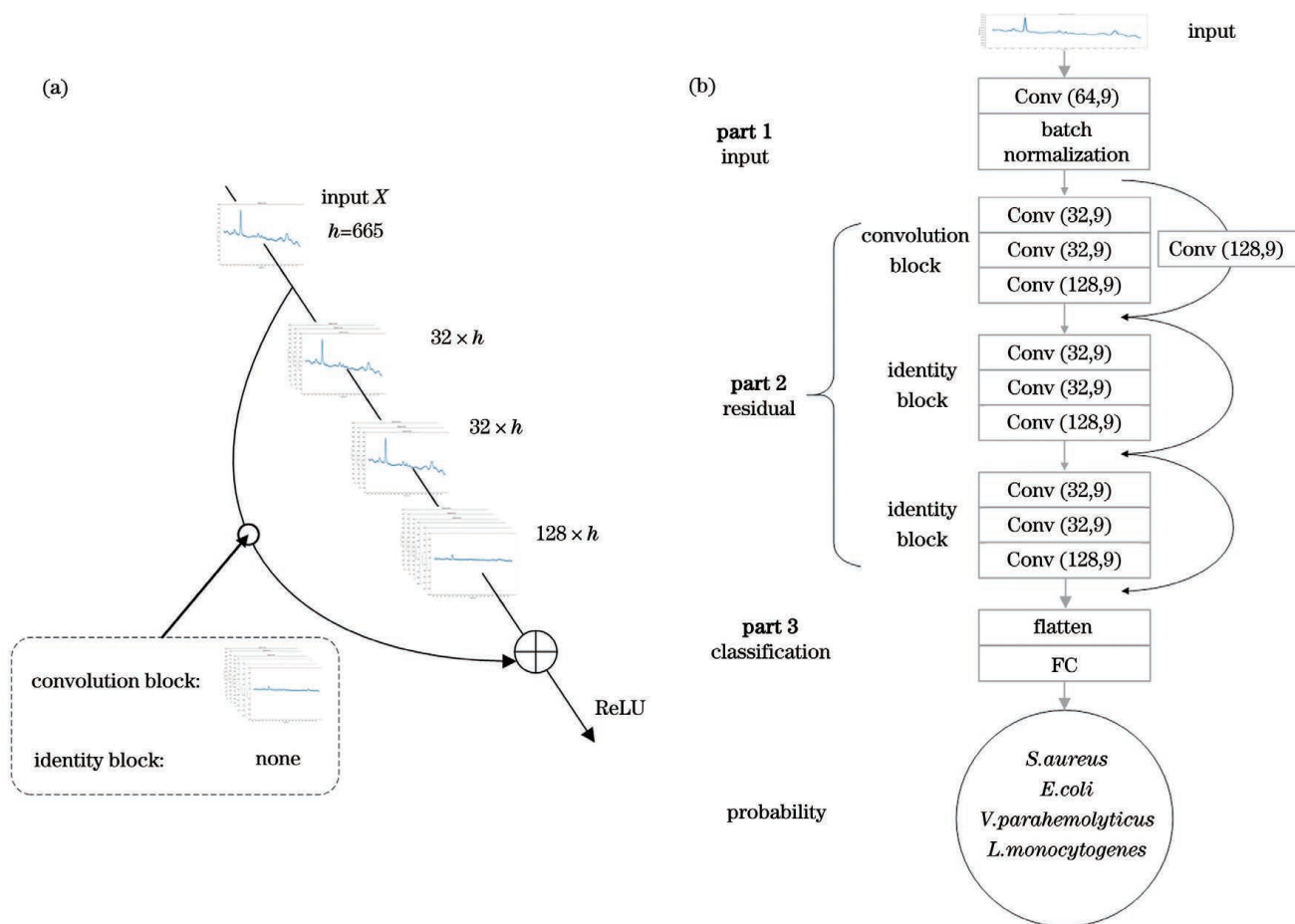


图 1 用于 SERS 分类的一维卷积神经网络。(a)残差块；(b)ResNet11 结构

Fig. 1 1D convolutional neural network for SERS classification. (a) Residual block; (b) structure of ResNet11

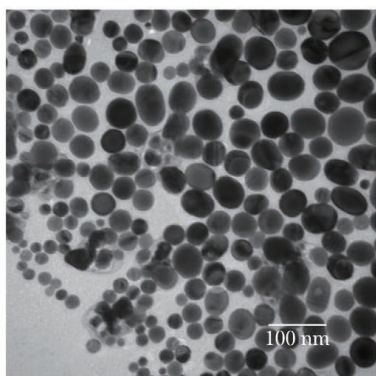
表 1 所使用的机器学习分类方法的简要介绍

Table 1 Brief introduction to the used machine learning classification methods

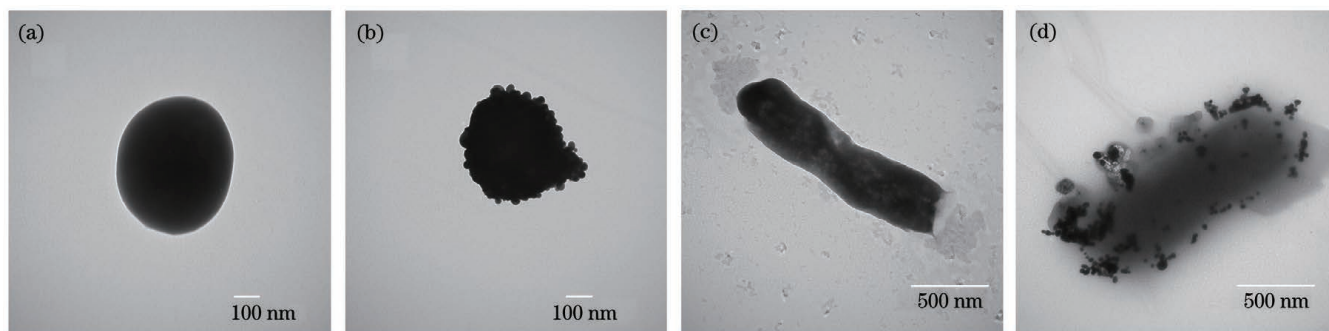
Methods	Description	Supervised	Linear	Algorithm	Key parameter
Logistic	Single-layer neural networks, searching for the most appropriate function parameters to minimize the distance between the predict and true value	Yes	Linear	Greedy algorithm & traversal search	solver= 'liblinear'
SVM	Searching the hyperplane which maximizes the margin between different classes	Yes	Indirect non-linear	Sequence minimization	kernel= 'linear'
RF	The prediction label of a new sample is the mean prediction of many decision trees which have been constructed during training	Yes	Non-linear	Greedy algorithm & traversal search	default
KNN	The prediction label of a new sample is depending on its distance (Manhattan distance, European distance, and Minkowski distance) to all available classes	Yes	Linear	K-dimensional tree	metric= 'euclidean'

增强细菌的拉曼信号。使用透射电子显微镜(TEM)分别研究了 AgNPs⁺的形态,以及 AgNPs⁺结合在细菌细胞壁上的形态、大小和分布,使用 Zeta 电位仪研究了去离子水溶液中 4 种食源性致病菌以及 AgNPs⁺的电位。

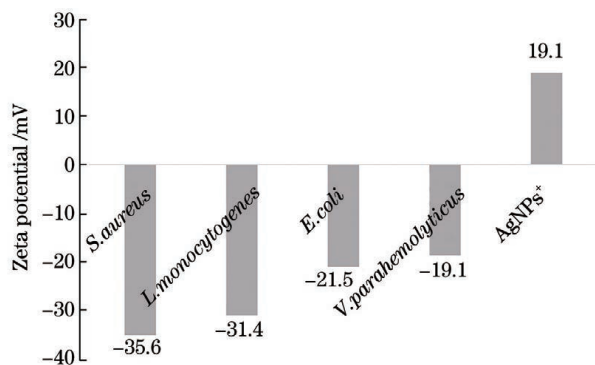
图 2 所示为本研究合成的 AgNPs⁺的 TEM 图像,可以观察到合成的 AgNPs⁺粒径分布为 10~100 nm,呈多分散性,与已报道的研究成果^[27]一致。本研究在预实验中通过离心法筛分出 20~40 nm 和 50~80 nm 两种粒径分布范围较窄的 AgNPs⁺用于病

图 2 AgNPs⁺的 TEM 图像Fig. 2 TEM image of AgNPs⁺

原菌的 SERS 增强,但 SERS 增强效果(强度、重现性)与 10~100 nm 粒径分布范围较宽的多分散 AgNPs⁺

图 3 AgNPs⁺与病原菌结合的 TEM 图像。(a) *S. aureus*; (b) *S. aureus*@AgNPs; (c) *E. coli*; (d) *E. coli*@AgNPsFig. 3 TEM images of AgNPs⁺ binding with pathogens. (a) *S. aureus*; (b) *S. aureus*@AgNPs; (c) *E. coli*; (d) *E. coli*@AgNPs

蛋白质是细菌细胞壁的主要成分,根据蛋白质等电点理论^[28],细菌的等电点 pH 值分布为 2~5,其中革兰阳性菌的 pH 值为 2~3,略低于革兰阴性菌的 pH 值(4~5)。使用 Zeta 电位仪分别测量 4 种细菌及合成的 AgNPs⁺的 Zeta 电位,结果如图 4 所示。测量结果中 4 种食源性致病菌均呈负电性,2 种革兰阳性菌 *S. aureus* 与 *L. monocytogenes* 的 Zeta 电位分别为 -35.6 mV 和 -31.4 mV,明显低于两种革兰阴性菌 *E. coli* 和 *V. parahemolyticus* (-21.5 mV、-19.1 mV);合成的 AgNPs⁺的 Zeta 电位为 19.1 mV,呈现强正电性。Zeta 电位的测量结果表明,AgNPs⁺是通过静电引力的相互作用吸附在细菌

图 4 4 种病原菌及 AgNPs⁺的 Zeta 电位分布Fig. 4 Zeta potential of four pathogens and AgNPs⁺

无显著差异。因此,为减少实验步骤,在后续工作中直接采用合成后未经筛选的 AgNPs⁺开展实验。

在研究的 4 种病原菌中, *S. aureus* 与 *L. monocytogenes* 为革兰阳性菌, *E. coli* 与 *V. parahemolyticus* 为革兰阴性菌,分别取 1 种阳性菌和 1 种阴性菌进行电镜表征,分析 AgNPs⁺与病原菌的结合效果。图 3(a)、(b)所示分别为 *S. aureus* 及 *S. aureus*@AgNPs 混合物的 TEM 图像;图 3(c)、(d)所示分别为 *E. coli* 及 *E. coli*@AgNPs 混合物的 TEM 图像。可以观察到,在 AgNPs⁺与病原菌的混合溶液中, *S. aureus* 和 *E. coli* 的外表面紧密地吸附了一层银纳米颗粒,银纳米颗粒表面的电磁场能够显著放大细菌固有的分子振动指纹,从而产生 SERS 效应。

的表面。

3.2 病原菌的 SERS 测量结果分析

为验证 AgNPs⁺对细菌的 SERS 效应,分别检测了不同物质的拉曼信号并进行比对分析,这些物质分别是 AgNPs⁺、硅片(Si)、4 种食源性致病菌 (*S. aureus*、*L. monocytogenes*、*E. coli*、*V. parahemolyticus*)以及 4 种食源性致病菌与银纳米颗粒形成的混合物 (*S. aureus*@AgNPs、*L. monocytogenes*@AgNPs、*E. coli*@AgNPs、*V. parahemolyticus*@AgNPs)。图 5 所示为测量得到的各种物质的 SERS 指纹谱,其中银纳米颗粒、硅片以及 4 种食源性致病菌分别展示 1 条谱线数据,每种食源性致病菌和银纳米颗粒的混合物分别展示 100 条谱线数据,灰色的伪影部分为 SERS 信号,彩色的光谱为这 100 条谱线的平均光谱。可以观察到:单晶硅片在 520 cm⁻¹处有明显特征峰;银纳米颗粒在 900 cm⁻¹等波段有微弱的拉曼信号,由银纳米颗粒中混入的杂质产生;未混合 AgNPs⁺的 4 种病原菌几乎未见拉曼信号;与银纳米颗粒混合孵育后,4 种病原菌在多个波段均出现了明显的特征峰,表明合成的 AgNPs⁺具有较高的 SERS 活性,能够有效增强细菌拉曼信号。

每种细菌的特征拉曼峰如下:1) *S. aureus* 的特征

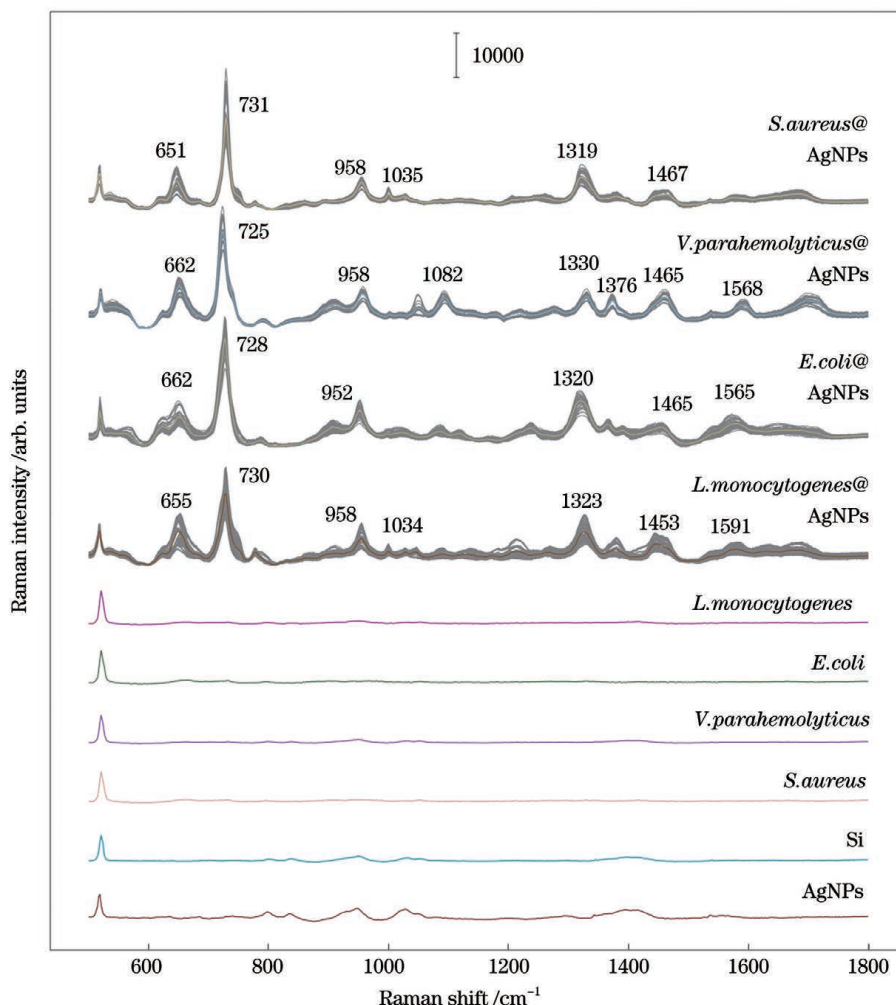


图 5 银纳米颗粒、硅片、4 种病原菌及其与 AgNPs 混合物的拉曼光谱

Fig. 5 Raman spectra of AgNPs, silicon wafer, four pathogens, and pathogen-AgNPs compounds

峰出现在 651, 731, 958, 1035, 1319, 1467 cm^{-1} 处; 2) *V. parahemolyticus* 的特征峰出现在 662, 725, 958, 1082, 1330, 1376, 1465, 1568 cm^{-1} 处; 3) *E. coli* 的特征峰出现在 662, 728, 952, 1320, 1465, 1565 cm^{-1} 处; 4) *L. monocytogenes* 的特征峰出现在 655, 730, 958, 1034, 1323, 1453, 1591 cm^{-1} 处。4 种细菌的 SERS 指纹谱非常相似, 特征拉曼峰的位置也高度重合, 这是因为构成细菌细胞壁的主要生物大分子(核酸、蛋白质、肽聚糖、脂类、碳水化合物等)含量十分相似。根据以上测量结果, 鉴别 4 种细菌指纹谱的关键点在于找出以上特征拉曼峰对应拉曼位移的微小偏差, 以及拉曼峰强度以及半峰全宽之间的差异。另外, 4 种细菌在 1035, 1082, 1376 cm^{-1} 这 3 个波段并非都有特征拉曼峰, 这也是区分的关键点。

为分析病原菌的拉曼光谱特性, 本研究查阅相关文献, 对细菌拉曼光谱 15 处拉曼峰的谱带归属进行了指认, 表 2 为主要官能团的拉曼峰归属。通过比对指认, 4 种细菌的主要特征峰均被增强, 与文献[29-32]报道的结果一致。

表 2 病原菌的主要拉曼峰归属^[29-32]

Table 2 Band assignment of main Raman peaks of pathogens^[29-32]

Raman shift / cm^{-1}	Assignment
621-624	Aromatic ring skeletal
651-683	$\delta(\text{COO}^-)$ guanine
720-735	Glycosidic ring, adenine
792-797	$\nu(\text{CN})$ Tyr
840-852	$\nu(\text{C}-\text{C})$
875	$\nu(\text{C}-\text{C})$ skeleton protein
952-958	$\nu(\text{CN})$, protein
1034-1042	CH group, protein
1085-1093	Lipid, nucleic acid
1128	$\nu(\text{C}-\text{C})$, nucleic acid
1319-1333	Adenine, polyadenine, DNA
1453-1467	$\delta(\text{CH}_2)$, COO^- , lipid
1565-1568	$\delta(\text{NH}, \text{CH})$, $\nu(\text{C}-\text{C})$
1581-1591	Adenine, guanine
1640-1688	Amide

3.3 方法重现性评价

以 *S. aureus*、*L. monocytogenes*、*E. coli* 和 *V. parahemolyticus* 4 种病原菌为研究对象,使用基于 AgNPs⁺ 的病原菌 SERS 指纹检测技术测量、获取检测的病原菌拉曼光谱,计算 730 cm⁻¹ 拉曼位移处的拉曼强度的相对标准偏差(RSD; κ_{RSD}),计算公式为

$$\kappa_{\text{RSD}} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)}}{\bar{x}} \times 100\%, \quad (1)$$

式中: $n=10$; x_i 为在 730 cm⁻¹ 拉曼位移处第 i 条光谱的拉曼强度; \bar{x} 为在 730 cm⁻¹ 拉曼位移处 n 条光谱

拉曼强度的平均值。

重现性分析的操作步骤如下:制作细菌悬液,加入 AgNPs⁺ 孵育 15 min,吸取混合溶液滴加在硅片上制作 10 个样品,干燥 20 min 后每一个样品随机选择 5 个位点进行测量并取平均值,最后计算这 10 条 SERS 指纹谱在 730 cm⁻¹ 拉曼位移处拉曼强度的 RSD。图 6 为 4 种病原菌各 10 个样品在相同实验条件下检测的 SERS 指纹谱。其 RSD 的分布范围为 5.74%~9.51%,平均 RSD 为 7.00%。RSD 分析结果表明,基于 AgNPs⁺ 的病原菌 SERS 检测技术具有较好的再现性,为进一步的细菌光谱分析提供可靠的数据支撑。

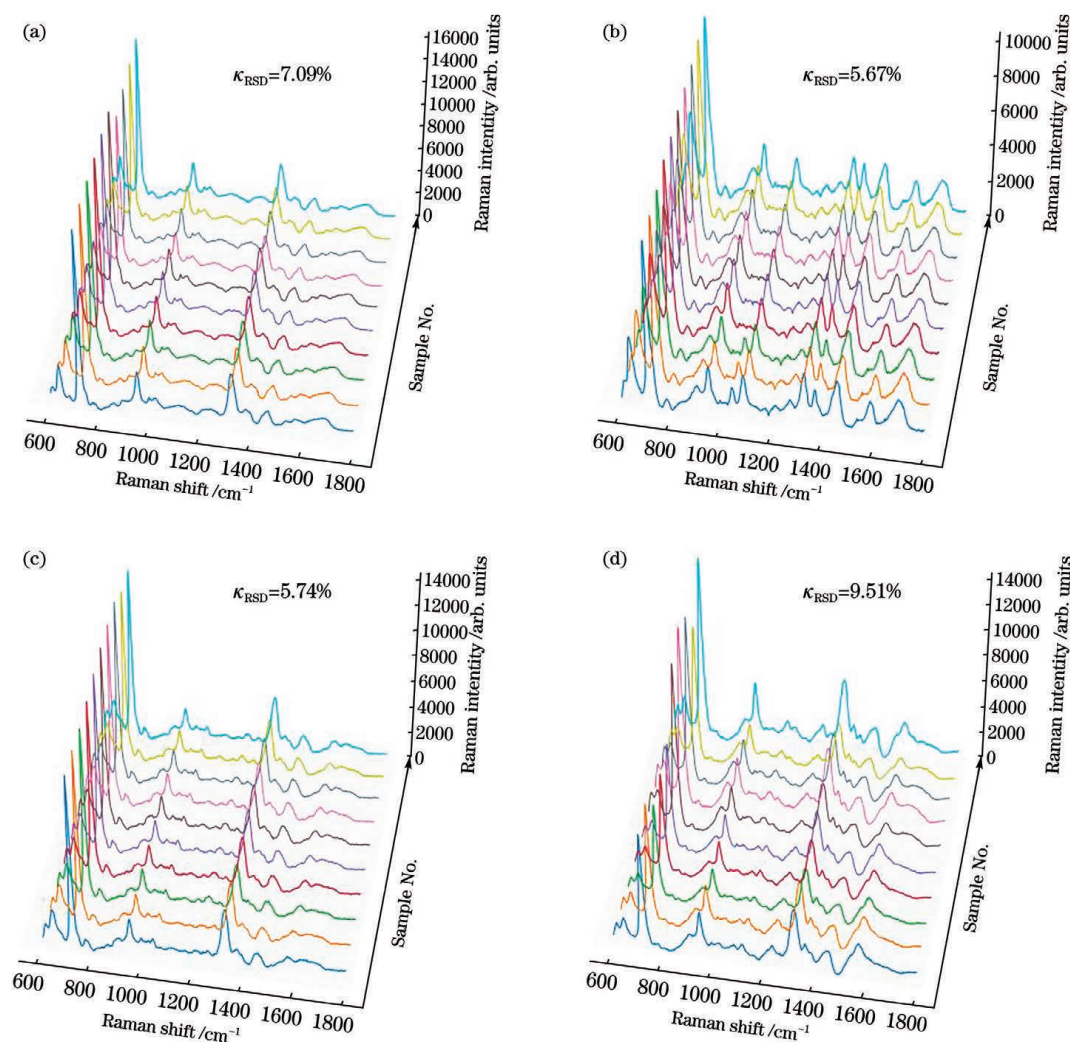


图 6 4 种病原菌的 10 次 SERS 指纹谱测量结果。(a) *S. aureus*; (b) *V. parahemolyticus*; (c) *L. monocytogenes*; (d) *E. coli*

Fig. 6 SERS printfinger spectra of 10 measurements of four pathogens. (a) *S. aureus*; (b) *V. parahemolyticus*; (c) *L. monocytogenes*; (d) *E. coli*

3.4 病原菌 SERS 指纹谱鉴定

根据 2.3 节介绍的方法,在 10⁷ mL⁻¹ 菌液分子浓度下构建了 4 种食源性致病菌的 SERS 数据集,每种细菌随机挑选 7 株进行 SERS 测量,所得测量数据用于模型的训练与验证,训练好的模型在 4 种细菌的剩余 3 株菌株上进行测试。使用所构建的深度学习分类

模型 ResNet11 和 2.5 节中列举的 4 种传统机器学习方法进行对比实验。依据 2.4 节的参数,模型在训练过程中学习率设置为 0.001,批处理数量为 16,在所有训练数据上迭代运算了 100 个 epoch,迭代次数为 100。图 7 所示为分类模型迭代训练 100 次过程中的训练和验证精度,可以看到模型在迭代 20 次以后就快速收敛。

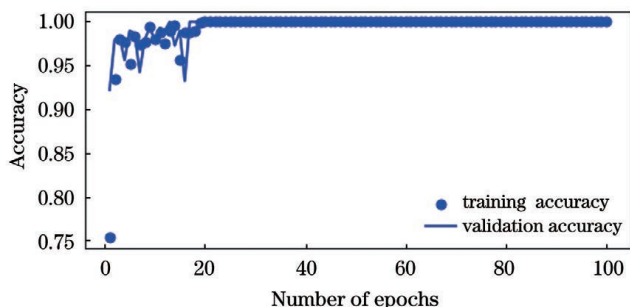


图 7 模型的训练精度和预测精度

Fig. 7 Training and validation accuracy of proposed model

表 3 为使用 5 种方法对 720 条高分子浓度病原菌 SERS 指纹谱分类准确率的测试结果,其中 SVM 方法的识别准确率为 95.83%, Logistic 为 92.64%, RF 为 85.27%, KNN 为 90.27%, 而所提出的 ResNet11 取得了 99.30% 的识别准确率。由此可见,与传统机器学习方法相比,深度学习方用于表面增强拉曼光谱分类时可取得更高的分类准确率。

表 3 不同方法对病原菌 SERS 指纹谱的分类准确率

Table 3 Classification accuracies of SERS fingerprint spectra of pathogens by different methods

Measurement condition	Classification accuracy / %				
	SVM	Logistic	RF	KNN	ResNet11
720 SERS spectra from 4 pathogens (10^7 mL^{-1})	95.83	92.64	85.27	90.27	99.30
100 SERS spectra of <i>S. aureus</i> (10^3 mL^{-1})	85.00	78.00	71.00	84.00	98.00

3.5 病原菌低强度的 SERS 指纹谱鉴定

在临床检验中,实验条件的差异如菌液分子浓度、细菌状态(死菌、活菌)、材料性能(粒径、电性)均会影响拉曼增强的效果,导致拉曼峰的强度降低,信噪比下降^[33]。由于数据信噪比的下降会影响分类算法的正确率,为考察分类算法应对弱信号的泛化能力,以 *S. aureus* 为实验对象,制作了低分子浓度的菌液样本并采集了低强度的 SERS 指纹谱,测试分类器的性能。低强度的 SERS 指纹谱的采集步骤如下:将制备好的 10^7 mL^{-1} 细菌溶液进行稀释,制备分子浓度为 10^3 mL^{-1} 的细菌溶液,依据 1.3 节的步骤与 AgNPs^+ 混匀孵育,干燥后测量样品,获取低分子浓度的 SERS 指纹谱,每株 *S. aureus* 采集 10 条 SERS 指纹谱,一共得到 100 条低强度光谱数据。

高分子浓度 *S. aureus* 样本(10^7 mL^{-1})与低分子浓度样本(10^3 mL^{-1})中采集的 SERS 指纹谱如图 8(a)所示。可以观察到,低分子浓度样本的主要特征拉曼峰的峰强与高分子浓度样本相比有较大幅度的衰减,数据信噪比明显降低。图 8(b)所示为低分子浓度 *S. aureus* 样本中加入 AgNPs^+ 前后测得的拉曼信号,可以观察到加入 AgNPs^+ 后,低分子浓度样本的特征拉曼峰被有效增强。将 731 cm^{-1} 处拉曼主峰的强度值作为拉曼增强因子的计算依据,加入 AgNPs^+ 后, 731 cm^{-1} 处拉曼主峰的强度值由 64 增加到 5347,增强因子为 83.5。

利用所构建的神经网络分类器 ResNet11 及 4 种机器学习方法对 100 条 *S. aureus* 低强度 SERS 指纹谱分类的准确率进行测试,结果如表 3 所示。相比于高分子浓度细菌溶液的测量结果,SVM、Logistic、RF、KNN 这 4 种传统机器学习方法的识别准确率明显下降,而 ResNet11 依然保持 98% 的准确率,这一结果表明 ResNet11 对低强度拉曼光谱依旧有着优秀的识别能力。

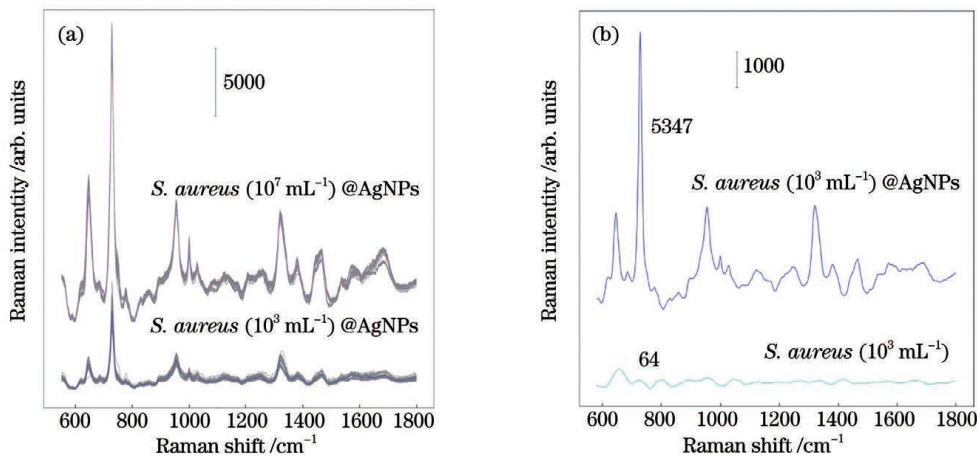


图 8 不同测量条件下 *S. aureus* 样本的 SERS 指纹谱和拉曼光谱。(a)高分子浓度和低分子浓度 *S. aureus* 样本测得的 SERS 指纹谱;(b)低分子浓度 *S. aureus* 样本中加入 AgNPs^+ 前后的拉曼光谱

Fig. 8 SERS fingerprint spectra and of Raman spectra of *S. aureus* solutions under different conditions. (a) SERS fingerprint spectra of *S. aureus* solutions with high molecular concentration and low molecular concentration; (b) Raman spectra of low molecular concentration *S. aureus* solution with and without AgNPs^+

4 结 论

提出一种基于 AgNPs⁺ 和 CNN 的 SERS 光谱检测方法,并将其用于 4 种主要食源性致病菌的快速鉴定。所制备的 AgNPs⁺ 在溶液中能够与带负电的细菌快速结合形成致密的包覆,具有较好的 SERS 增强效应,在测量结果的多个波段均能够明显地观察到 4 种病原菌的拉曼峰;所提出的基于残差结构的 ResNet11 无需繁琐的光谱预处理步骤就可取得 99.30% 的识别准确率,而且当识别拉曼峰强度相对较弱的 SERS 指纹谱时,该模型仍然取得 98.00% 的识别准确率,优于其他对比机器学习方法。由此可见,基于 AgNPs⁺ 和 CNN 的 SERS 光谱检测方法有助于提高食品安全中病原菌感染检测的能力,并且能够较为容易地推广应用到其他菌种的鉴定工作中。

参 考 文 献

- [1] Hameed S, Xie L J, Ying Y B. Conventional and emerging detection techniques for pathogenic bacteria in food science: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 81: 61-73.
- [2] Barba F J, Koubaa M, do Prado-Silva L, et al. Mild processing applied to the inactivation of the main foodborne bacterial pathogens: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 66: 20-35.
- [3] Chen J H, Andler S M, Goddard J M, et al. Integrating recognition elements with nanomaterials for bacteria sensing[J]. Chemical Society Reviews, 2017, 46(5): 1272-1283.
- [4] Rajapaksha P, Elbourne A, Gangadoo S, et al. A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms[J]. The Analyst, 2019, 144(2): 396-411.
- [5] Wohlwend N, Tiermann S, Risch L, et al. Evaluation of a multiplex real-time PCR assay for detecting major bacterial enteric pathogens in fecal specimens: intestinal inflammation and bacterial load are correlated in campylobacter infections[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2016, 54(9): 2262-2266.
- [6] Nasrabadi Z, Ranjbar R, Poorali F, et al. Detection of eight foodborne bacterial pathogens by oligonucleotide array hybridization[J]. Electronic Physician, 2017, 9(5): 4405-4411.
- [7] Kan B A, Zhou H J, Du P C, et al. Transforming bacterial disease surveillance and investigation using whole-genome sequence to probe the trace[J]. Frontiers of Medicine, 2018, 12(1): 23-33.
- [8] Hosseini S P, Vázquez-Villegas P, Rito-Palomares M, et al. Fundamentals and history of ELISA: the evolution of the immunoassays until invention of ELISA [M] // Hosseini S, Vázquez-Villegas P, Rito-Palomares M, et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). SpringerBriefs in applied sciences and technology. Singapore: Springer, 2018: 1-18.
- [9] 吴春芳, 潘浩, 朱业传. 银光栅/银纳米颗粒复合结构的光场增强研究[J]. 中国激光, 2022, 49(6): 0608003.
- [10] Wu C F, Pan H, Zhu Y C. Electric field enhancement for hybrid structure containing silver grating and silver nanoparticles[J]. Chinese Journal of Lasers, 2022, 49(6): 0608003.
- [10] Holt R E, Cotton T M. Surface-enhanced resonance Raman and electrochemical investigation of glucose oxidase catalysis at a silver electrode[J]. Journal of the American Chemical Society, 1989, 111(8): 2815-2821.
- [11] Goodfellow M, O'Donnell A G. Handbook of new bacterial systematics[M]. New York: Academic Press, 1993.
- [12] Yang D T, Zhou H B, Haisch C, et al. Reproducible *E. coli* detection based on label-free SERS and mapping[J]. Talanta, 2016, 146: 457-463.
- [13] Wang C W, Wang J F, Li M, et al. A rapid SERS method for label-free bacteria detection using polyethylenimine-modified Au-coated magnetic microspheres and Au@Ag nanoparticles[J]. The Analyst, 2016, 141(22): 6226-6238.
- [14] 刘二伟, 杨增玲, 韩鲁佳, 等. 原位生长法制备 Cu₂O-Ag 基底及 SERS 活性研究[J]. 光学学报, 2021, 41(7): 0724002.
- [14] Liu E W, Yang Z L, Han L J, et al. Fabrication and SERS activity of Cu₂O-Ag substrate by *in situ* growth[J]. Acta Optica Sinica, 2021, 41(7): 0724002.
- [15] Liu Y, Zhou H B, Hu Z W, et al. Label and label-free based surface-enhanced Raman scattering for pathogen bacteria detection: a review[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 94: 131-140.
- [16] Ralbovsky N M, Lednev I K. Towards development of a novel universal medical diagnostic method: Raman spectroscopy and machine learning[J]. Chemical Society Reviews, 2020, 49(20): 7428-7453.
- [17] Lu W L, Chen X Q, Wang L, et al. Combination of an artificial intelligence approach and laser tweezers Raman spectroscopy for microbial identification[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(9): 6288-6296.
- [18] Ho C S, Jean N, Hogan C A, et al. Rapid identification of pathogenic bacteria using Raman spectroscopy and deep learning[J]. Nature Communications, 2019, 10: 4927.
- [19] van Lierop D, Krpetić Ž, Guerrini L, et al. Positively charged silver nanoparticles and their effect on surface-enhanced Raman scattering of dye-labelled oligonucleotides[J]. Chemical Communications, 2012, 48(66): 8192-8194.
- [20] de Pascale L, Louet J, Santambrogio F. The Monge problem with vanishing gradient penalization: vortices and asymptotic profile[J]. Journal De Mathématiques Pures et Appliquées, 2016, 106(2): 237-279.
- [21] Goodfellow I J, Pouget-Abadie J, Mirza M, et al. Generative adversarial networks[J]. Communications of the ACM, 2020, 63(11): 139-144.
- [22] He K M, Zhang X Y, Ren S Q, et al. Identity mappings in deep residual networks [M] // Leibe B, Matas J, Sebe N, et al. Computer vision-ECCV 2016. Lecture notes in computer science. Cham: Springer, 2016, 9908: 630-645.
- [23] Tou J, Yip P, Leung H. Spread-spectrum signals and the chaotic logistic map[J]. Circuits, Systems and Signal Processing, 1999, 18(1): 59-73.
- [24] 储宝, 黄亮, 倪敬书, 等. 基于 GS-SVM 的脑组织差分路径因子定量方法研究[J]. 中国激光, 2022, 49(5): 0507303.
- [24] Chu B, Huang Y, Ni J S, et al. Quantitative methods of brain tissue differential pathlength factor based on GS-SVM [J]. Chinese Journal of Lasers, 2022, 49(5): 0507303.
- [25] 王其, 曾万聃, 夏志平, 等. 基于随机森林算法的食源性致病菌拉曼光谱识别[J]. 中国激光, 2021, 48(3): 0311002.
- [25] Wang Q, Zeng W D, Xia Z P, et al. Recognition of food-borne pathogenic bacteria by Raman spectroscopy based on random forest algorithm [J]. Chinese Journal of Lasers, 2021, 48(3): 0311002.
- [26] Acquarelli J, van Laarhoven T, Gerretzen J, et al. Convolutional neural networks for vibrational spectroscopic data analysis[J]. Analytica Chimica Acta, 2017, 954: 22-31.
- [27] Hu S, Kang H Q, Gu F, et al. Rapid detection method for pathogenic candida captured by magnetic nanoparticles and identified using SERS via AgNPs[J]. International Journal of Nanomedicine, 2021, 16: 941-950.
- [28] Herbert B, Righetti P G. A turning point in proteome analysis: sample prefractionation via multicompartment electrolyzers with isoelectric membranes [J]. Electrophoresis, 2000, 21(17): 3639-3648.
- [29] Butler H J, Ashton L, Bird B, et al. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials[J]. Nature Protocols, 2016,

- 11(4): 664-687.
- [30] Chen R P, Yang L, Goodison S, et al. Deep-learning approach to identifying cancer subtypes using high-dimensional genomic data[J]. *Bioinformatics*, 2019, 36(5): 1476-1483.
- [31] Papagiannopoulou C, Parchen R, Rubbens P, et al. Fast pathogen identification using single-cell matrix-assisted laser desorption/ionization-aerosol time-of-flight mass spectrometry data and deep learning methods [J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(11): 7523-7531.
- [32] Pathania D, Landeros C, Rohrer L, et al. Point-of-care cervical cancer screening using deep learning-based microholography[J]. *Theranostics*, 2019, 9(26): 8438-8447.
- [33] Chen X P, Tang M Q, Liu Y, et al. Surface-enhanced Raman scattering method for the identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using positively charged silver nanoparticles[J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186(2): 102.

Surface Enhanced Raman Scattering Detection of Four Foodborne Pathogens Using Positively Charged Silver Nanoparticles and Convolutional Neural Networks

Yang Yong^{1,2}, Dong Hao^{1,2}, Wang Shu^{1,2*}, Sang Yaosuo^{1,2}, Li Zhigang^{1,2}, Zhang Long^{1,2**}, Wang Chongwen³, Liu Yong^{1,2}

¹*Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Hefei Institute of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, Anhui, China;*

²*Science Island Branch, Graduate School of University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China;*

³*School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China*

Abstract

Objective Infectious diseases caused by foodborne pathogenic bacteria are always one of the most severe public health problems. Accurate detection of pathogenic microorganisms in food is necessary to guarantee food safety and to contain bacterial infection. Microbial culture-based methods and biochemical tests are still the golden standard in bacterial detection; however, these methods are time-consuming, taking about 2–3 days to carry out, and follow more than ten operation steps. In addition, new diagnostic technologies, such as conventional polymerase chain reaction, mass spectrometry, and DNA sequencing, suffer from many disadvantages including long processing time, laborious operation steps, limited sensitivity, and high cost; thus, they still cannot meet the requirements for clinical diagnosis and point-of-care testing. In recent years, bacterial detection methods based on surface enhanced Raman scattering (SERS) have achieved significant success and performed excellently on high-sensitivity, easy-to-operate, and fingerprint-based detection methods. In this paper, four major foodborne bacteria, namely, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*), and *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), are used as research objects. Furthermore, a novel SERS method, which combines positively charged Ag nanoparticles (AgNPs⁺) and convolutional neural networks (CNN), is proposed in this paper for accurate and rapid detection of the above four bacteria.

Methods Clinical isolates including 10 strains from each of *S. aureus*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*, and *L. monocytogenes* are collected from the laboratory department of the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University. First, AgNPs⁺ are prepared via reduction method of NaBH₄ and are fabricated in a buffer solution as substrate for SERS. Then, AgNPs@bacteria complexes are formed via electrostatic interactions, and high-quality SERS signals in a shift range of 400–1800 cm⁻¹ of pathogenic bacteria are measured from the forming complexes. Finally, a residual network consisting of 11 one-dimensional convolutional layers (ResNet11) is established and trained on these signals as the spectral classifier. In the spectral identification process, while a SERS spectrum collected from unknown samples is inputted to the trained classifier, the classification probability corresponding to the above four bacteria is calculated, and the label of the maximum value is taken as the predicted label. Based on this strategy, the accurate and precise laboratory testing of bacteria is realized by a high-performance optical analysis technique.

Results and Discussions It can be observed from the transmission electron microscope images that AgNPs⁺ are closely binding onto the cell walls of *S. aureus* and *E. coli* in mixed solution. Zeta potential measurement results of AgNPs⁺ and four bacteria represent the mechanism of the closely combined strong electrostatic attraction between bacteria and AgNPs⁺. The spectral measurement results of four types of AgNPs@bacteria complex show that AgNPs⁺ are an excellent SERS substrate. Mainly in bands of 624 cm⁻¹, 730 cm⁻¹, etc., obvious Raman peaks of the four pathogens with strong intensity are enhanced. By comparing and identifying the functional groups corresponding to the main Raman peaks in

SERS fingerprint spectrum, it is confirmed that the SERS measurement results are consistent with the reported literature. In addition, the average relative standard deviation of SERS measurements of ten times is about 7%, which presents well reproducibility. Meanwhile, the differences between SERS spectra from the four bacteria are studied and identified. For these four types of approximate spectra, the trained classifier ResNet11 achieves average accuracies of 99.30% for SERS fingerprints, with bacteria solution molecular concentration of 10^7 mL^{-1} , and also achieved average accuracies of 98.00% for low-intensity SERS fingerprints with the molecular concentration of 10^3 mL^{-1} . ResNet11 performs better accuracy and stability compared with other commonly used classification methods, such as Logistic regression, SVM, random forest, and KNN. Furthermore, ResNet11 may promote the practical application level of SERS technology.

Conclusions SERS technology can promise sensitive and label-free detection for bacteria and antibiotic susceptibility testing in single steps. However, achieving practical application remains challenging due to the unstable signal intensity and similar spectral curve. In addition, due to the large size of bacteria ($0.5\text{--}10 \mu\text{m}$), which is far beyond the nano gap that can produce stable SERS hot spots, the SERS enhancement effect of bacteria has always at a lower level. There are two ways to improve the quality of bacterial SERS signal: 1) by improving the stability of the substrate in the experiment; 2) by exploring the excellent combination between the substrate and bacteria. In this paper, AgNPs⁺ are prepared as SERS sensing substrate. The close and dense combination with bacteria that are negatively charged in solution can provide high-quality signal with high intensity and good reproducibility. On the other hand, novel algorithm of CNN based on residual structure can guarantee the identification accuracy of SERS spectra. It can reduce the opposite impact caused by spectral quality indirectly and can promote the practicability of SERS in bacterial detection. In summary, we propose an accurate and sensitive method for foodborne bacteria detection by using AgNPs⁺ and CNN. Considering the other advantages including good stability and easy operability, we believe that our approach will become a promising tool for bacterial detection in the laboratory.

Key words bio-optics; foodborne pathogens; surface enhanced Raman scattering; positively charged silver nanoparticles; convolutional neural networks