

傅里叶变换红外光谱技术用于细菌检测的影响因素

杨丽君^{1,2}, 王 静^{1,*}, 李兆杰¹, 宋晓华¹, 崔凤杰¹, 胡巧茹¹

(1.威海出入境检验检疫局, 山东 威海 264205; 2.烟台出入境检验检疫局, 山东 烟台 264200)

摘 要: 应用傅里叶变换红外光谱(FT-IR)技术, 结合化学计量学分析方法, 以大肠杆菌为例, 探讨细菌浓度、培养时间、加热灭活等对FT-IR用于细菌检测的影响。结果表明, FT-IR技术可以分别将不同浓度、不同培养时间、活体与加热灭活的细菌进行有效区分, 说明细菌浓度、培养时间及加热灭活会影响细菌的光谱特征并干扰FT-IR的细菌检测结果。表明, 统一的样品前处理是决定FT-IR检测细菌成功的关键技术之一。

关键词: 傅里叶变换红外光谱; 浓度; 培养时间; 灭活; 检测; 影响

Several Factors for the Detection of Bacteria by FT-IR Spectroscopy

YANG Li-jun^{1,2}, WANG Jing^{1,*}, LI Zhao-jie¹, SONG Xiao-hua¹, CUI Feng-jie¹, HU Qiao-ru¹

(1. Weihai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Weihai 264205, China;

2. Yantai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai 264000, China)

Abstract: A strain of *Escherichia coli* was used to study the application of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy combined with chemometric method for bacterial detection. We examined the effects of bacterial concentration, culture time and heat inactivation on the detection of *Escherichia coli* by FT-IR spectroscopy. Results indicated that bacteria with different concentrations, culture time, and heat inactivation could be differentiated by FT-IR spectroscopy, respectively. However, the concentration, culture time and heat inactivation revealed significant impact on spectral characteristics and could interfere with the analytic results. Therefore, uniform preparation of bacteria is one of the most important factors for the successful differentiation of bacteria by FT-IR spectroscopy. Meanwhile, these results provide a theoretical basis for extensive application of FT-IR spectroscopy to detect bacteria.

Key words: Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR); concentration; culture time; inactivation; detection; effect
中图分类号: Q31 文献标志码: A 文章编号: 1002-6630(2013)08-0190-05

应用傅里叶变换红外光谱(fourier transform infrared, FT-IR)技术, 可读取微生物菌体细胞壁、细胞膜及细胞内包括肽聚糖、脂多糖、磷脂双分子层、蛋白质、水、脂肪、多糖以及核酸等所有组成成分化学键的振动情况, 提供整个微生物菌体生化组成成分的光谱定量信息^[1]。FT-IR技术反应的是整个细胞组分的光谱特征, 具有较高的指纹特征, 结合化学计量学分析方法, 成功实现对微生物的分类、鉴定及检测^[2-6]。

细菌是一个活的生命体, 不同的培养条件可能会引起代谢产生变化, 目前在这方面的研究已有些许报道。吴海^[7]研究发现, 不同pH值以及不同培养基条件培养下的金黄色葡萄球菌的光谱图存在可以肉眼识别的谱带差异, 但却并未将这种谱带差异通过计量学运算进行有效

区分; Orsini等^[8]分别从白色念珠菌同一菌落的中心、中间及边缘取样, 分别采集其红外光谱, 通过比较发现3种光谱存在明显的谱带差异, 这种差异主要是由于他们对葡萄糖的吸收利用不同所致。但这种谱带差异是否可以通过计量学运算进行区分作者并未进行研究。上述研究都是对不同培养条件下的细菌的光谱进行比较, 并未对这些培养条件的不同是否会影响FT-IT技术对细菌的检测结果进行研究。

不同培养阶段细菌代谢特征不同, 同样对应菌体内的代谢物质也不同, 然而FT-IR技术是否将这些差别有效的分辨出来, 目前还缺少必要的实验数据证明; FT-IR技术对光谱的归一化处理可以消除样品量不同带来的光谱差异^[9], 但这种浓度差异是否能完全修正消除而不影

收稿日期: 2012-03-18

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局项目(2010IK151)

作者简介: 杨丽君(1969—), 女, 高级工程师, 硕士, 主要从事微生物学、海洋毒素研究。E-mail: lizhaojie8102@yahoo.cn

*通信作者: 王静(1975—), 女, 高级工程师, 硕士, 主要从事微生物学、海洋毒素研究。E-mail: hunterlee_81@163.com

响FT-IR分析结果尚需进一步试验验证,这对样品制备及结果处理至关重要;另外,加热灭活可以破坏菌体内物质,如核酸断裂、蛋白质变性、肽段断裂等,可以消除或减弱一些致病菌的致病性,但FT-IR是否能将菌体内这些物质的变化通过光谱差异有效的分辨出来,目前也缺少实验证明。本实验针对以上问题展开研究,拟阐明细菌浓度、细菌培养时间、细菌灭活等对FT-IR技术用于细菌检测的影响。这将会为FT-IR广泛用于细菌检测提供重要的方法依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种

大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)44113来自作者单位菌种库,从-70℃接种到营养肉汤中,37℃培养18~24h,备用。

1.1.2 材料与试剂

ZnSe窗片(透过波长对应波段范围为7800~4400 cm^{-1} ,透过率大于68%,直径25mm,厚度2mm);超纯水由Millipore仪器Milli Q生产(电阻18.2M Ω);0.9%生理盐水、无水乙醇(分析纯);伊红美兰平板(EMB)、营养肉汤(按说明书配制) 北京陆桥生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

核酸蛋白分析仪 美国Bio-rad公司;CR22G III离心机 日本日立公司;恒温恒湿培养箱、干燥箱 美国3M公司;VERTEX70型傅里叶变换红外光谱仪 德国布鲁克公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备

1.3.1.1 不同浓度样品制备

用无菌接种环挑取*E.coli* 44113活化肉汤培养物一环,接种于盛有营养肉汤的大试管中,(36±1)℃培养18~24h,用核酸蛋白分析仪测定其OD₆₀₀,并用血球计数板在显微镜下计数菌液浓度。

分别吸取*E.coli*肉汤培养物1、0.5、0.25mL于1.5mL离心管中,5000×g离心5min,吸弃上清液,加入1mL无菌生理盐水悬浮洗涤,5000×g离心5min,再加入1mL超纯水悬浮洗涤,5000×g离心5min,超纯水重复洗涤两次,最后用50 μL 超纯水悬浮混匀。以1mL肉汤培养物制得的50 μL 菌液为标准,分别得到*E.coli* 1、2、4倍不同稀释度的菌液。用微量移液器分别吸取各不同稀释度的菌悬液10 μL 于ZnSe窗片中心位置,水平置于45℃干燥箱中烘干,制成干燥菌斑。

1.3.1.2 不同培养时间样品制备

按上述方法接种*E.coli* 44113于营养肉汤中,置于

(36±1)℃振荡培养箱培养,分别于培养4、6、8h取样,测定其OD₆₀₀,并计数菌液浓度。

将振荡培养4、6、8h的菌液分别稀释或浓缩至(36±1)℃静置培养18~24h的菌液浓度,使它们浓度一致,用营养肉汤进行稀释。

制备不同培养时间*E.coli* 44113的干燥菌斑,方法同上。

1.3.1.3 加热灭活样品制备

按上述方法接种*E.coli* 44113于营养肉汤中,置于(36±1)℃培养箱培养18~24h,测定其OD₆₀₀,并计数菌液浓度。

分别吸取1mL上述肉汤培养物于2个1.5mL离心管中,制备50 μL 菌悬液两管,方法同上。其中一管置于100℃沸水浴中煮沸15min以灭活细菌,冷却至室温。

制备活体和加热灭活*E.coli* 44113的干燥菌斑,方法同上。

1.3.2 光谱采集

将载有样品的ZnSe窗片置于傅里叶变换红外光谱仪上进行光谱采集,模式为透过率模式(采用气氛补偿功能去除环境大气中的水蒸气和CO₂的吸收光谱干扰)。实验参数为:波段范围4000~600 cm^{-1} [13,10-12],光谱分辨率4 cm^{-1} ,64次光谱累计求平均[13]。

1.3.3 光谱处理及数据分析

每个样品至少做6次实验,每次做3个重复,取平均值。利用OPUS 6.5软件(VERTEX70自带的扫描分析软件),首先对获得FT-IR光谱透光率进行透过率-吸光度转化,然后进行基线校正(消除基线漂移),再对4000~600 cm^{-1} 波数范围光谱进行矢量归一化处理,得到归一化后的FT-IR光谱。将归一化后的光谱转化为DPT数据点格式,进而转化为Excel数据格式。

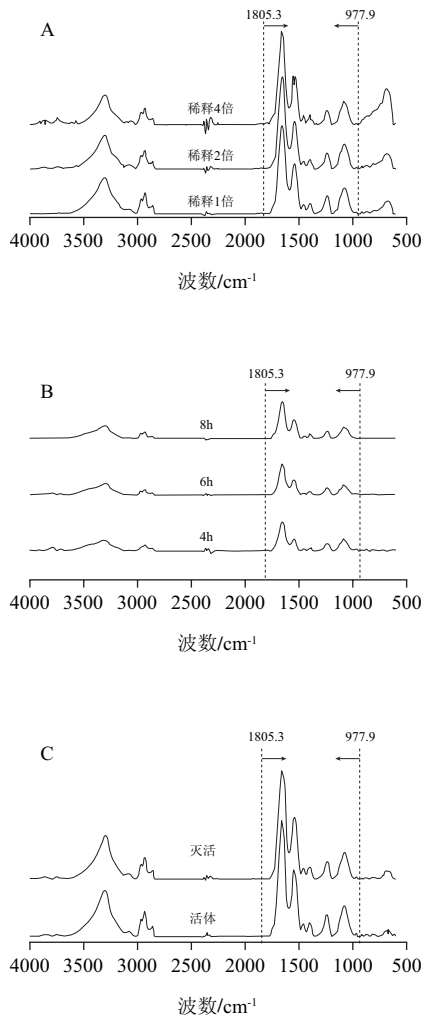
将处理后的不同浓度、不同培养时间、活体和加热灭活细菌的977.9~1805.3 cm^{-1} 波数范围光谱数据分别导入Matlab 6.5和Statistica 6.0软件,进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和分级聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA),分别得到不同稀释倍数、不同培养时间、活体和加热灭活*E.coli* 44113 FT-IR光谱的主成分聚类分布图和树状聚类分布图。

2 结果与分析

2.1 光谱分析

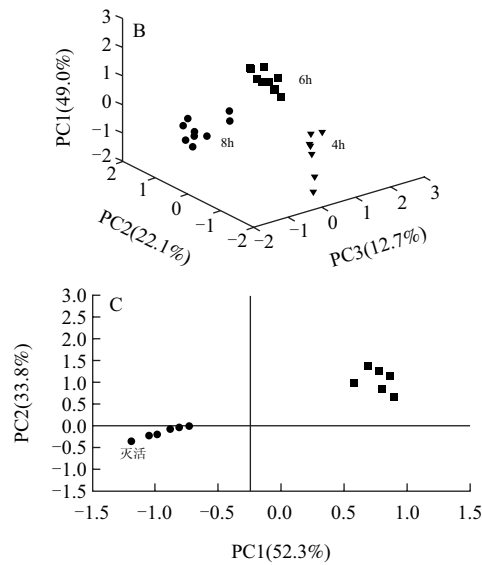
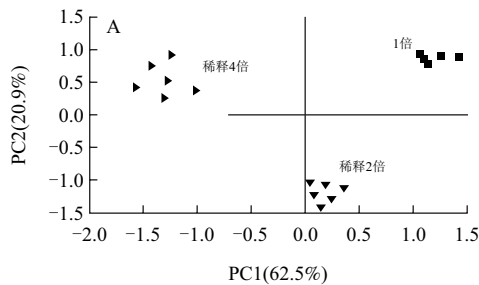
培养18~24h后测得*E.coli*培养液OD₆₀₀约为0.85,浓度约为4.2×10⁸CFU/mL。*E.coli* 1、2、4倍不同稀释度的平均光谱图见图1A。*E.coli*振荡培养4、6、8h的OD₆₀₀分别约为1.26、1.32、2.1,对应的浓度分别约为6.3×10⁸、6.6×10⁸、1.1×10⁹CFU/mL。因此,需用营养肉汤将其统一稀释至OD₆₀₀约为0.85。不同培养时间*E.coli*平均光谱见

图1B。活体和加热灭活后*E.coli*平均光谱见图1C。可知，光谱经基线校正和矢量归一化后，肉眼仍难发现其中的差别。



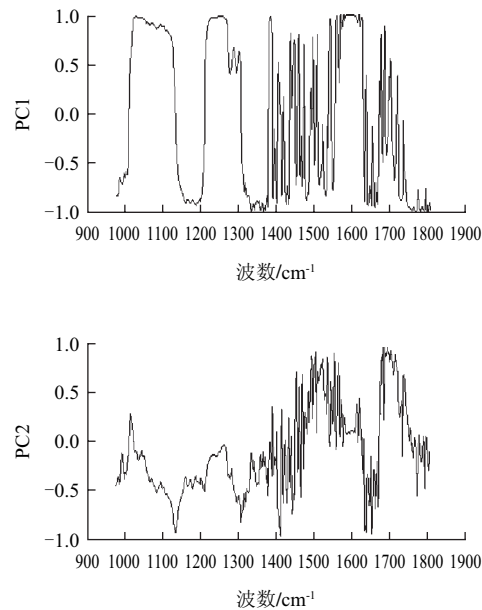
A.不同稀释倍数*E. coli* 44113平均光谱; B.不同培养时间*E. coli* 44113平均光谱; C.活体和加热灭活*E. coli* 44113平均光谱。
图1 不同稀释倍数、不同培养时间、加热灭活*E. coli* 44113的平均光谱
Fig.1 Average FT-IR spectra of *E. coli* 44113 with different dilution ratios, different culture time and heat inactivation treatments

2.2 数据分析
2.2.1 主成分分析

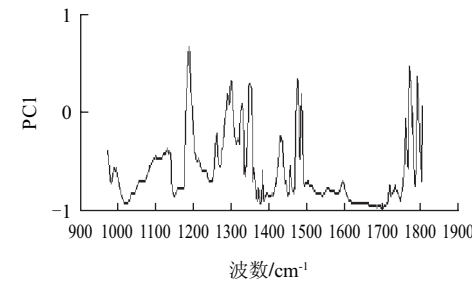


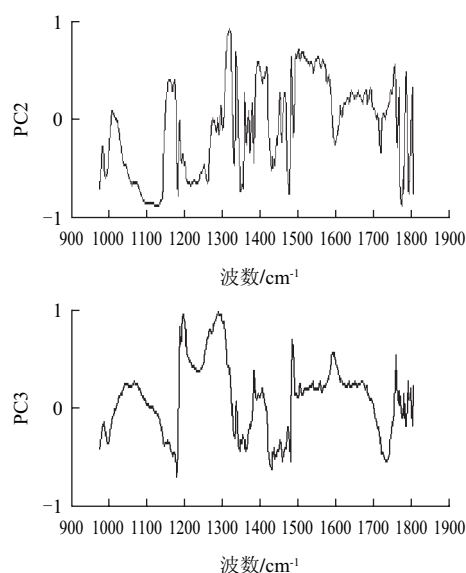
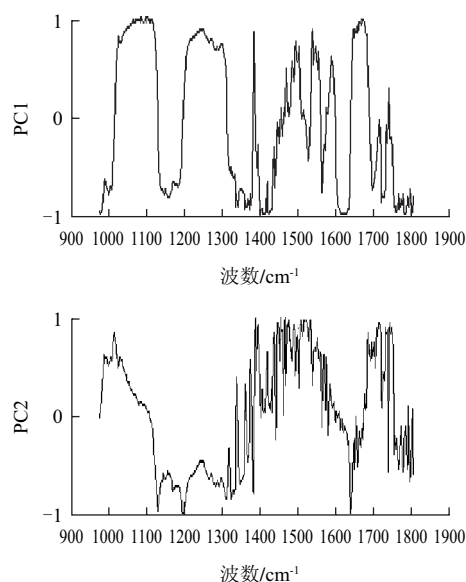
A.不同稀释倍数*E.coli* 44113 FT-IR光谱PCA聚类分布图;
B.不同培养时间*E.coli* 44113 FT-IR光谱PCA聚类分布图;
C.活体和加热灭活*E.coli* 44113 FT-IR光谱PCA聚类分布图。
图2 不同稀释倍数、不同培养时间、加热灭活*E.coli* 44113 FT-IR光谱PCA聚类分布图

Fig.2 Results of PCA cluster



A.不同稀释倍数*E.coli* 44113 FT-IR光谱主成分权重图



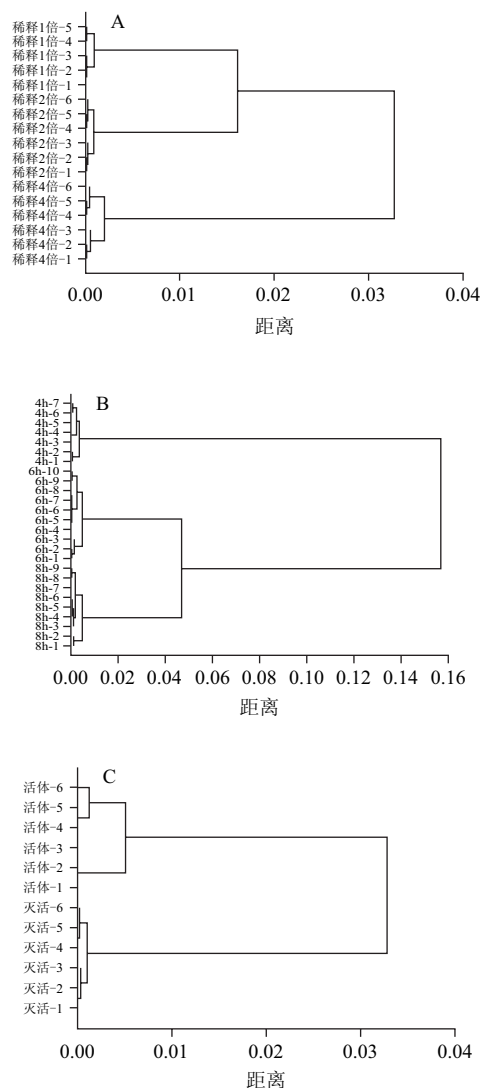
B.不同培养时间*E.coli* 44113 FT-IR光谱主成分权重图C.活体和加热灭活*E.coli* 44113 FT-IR光谱主成分权重图。**图3 不同稀释倍数、不同培养时间、加热灭活*E.coli* 44113 FT-IR光谱各主成分权重图****Fig.3 Loading plot of PCs from PCA analysis of FT-IR spectra of *E. coli* 44113**

以主成分1(PC1)和主成分2(PC2)作为聚类依据, PCA分析可以将不同稀释度样品进行较好聚类(图2A)。PC1和PC2分别占有光谱总变异性的百分比为62.5%、20.9%, 说明PC1和PC2代表了样品中绝大多数的信息, 采用前2个主成分建立的聚类分析模型是具有代表性的, 两主成分PC1和PC2权重见图3A, 权重较大的波段对定量分析模型的贡献也较大; 以PC1、PC2和PC3作为聚类依据, 得到主成分聚类三维分布图(图2B), PCA分析可以将不同培养时间样品进行较好聚类。PC1、PC2和PC3分别占有光谱总变异性的百分比为49.0%、22.1%和12.7%, 说

明PC1、PC2和PC3三个主成分代表了样品中绝大多数的信息, 采用前3个主成分建立的聚类分析模型是具有代表性的, 3个主成分PC1、PC2和PC3权重见图3B; 以PC1、PC2作为聚类依据, PCA分析可以将活体和灭活的*E.coli* 较好聚类(图2C)。PC1和PC2分别占有光谱总变异性的百分比为52.3%和33.81%, 说明PC1和PC2两个主成分代表了样品中绝大多数的信息, 采用前2个主成分建立的聚类分析模型是具有代表性的, 2个主成分PC1和PC2和权重见图3C。

2.2.2 分级聚类分析(HCA)

通过分别对*E.coli* 44113不同稀释度、不同培养时间、加热灭活的光谱进行HCA分析, 利用皮尔森积矩相关系数, 用光谱间的距离作为判定依据, 得到树状聚类分布图, 见图4。由图4可知, HCA分析可以分别将不同稀释度、不同培养时间、加热灭活的样品进行较好聚类。

**图4 不同稀释倍数(A)、不同培养时间(B)、活体和加热灭活(C) *E.coli* 44113 FT-IR光谱HCA聚类分布图****Fig.4 Results of HCA cluster**

3 讨论

FT-IR技术的高灵敏性致使样品的前处理至关重要,特别像细菌这样活的生命体,不同培养条件可能会导致细菌的代谢特征发生变化,可能会直接引起FT-IR光谱的变化。而这些变化是否会影响到FT-IR对细菌的检测结果,目前这方面的研究并不多,本实验通过对不同浓度、不同培养时间、加热灭活3种处理条件下的*E.coli* 44113的FT-IR光谱进行分析,旨在阐明3种处理条件对FT-IR技术用于细菌检测的影响。

对不同稀释倍数*E.coli* 44113的光谱首先进行矢量归一化处理,理论上消除了样品量不同带来的光谱差异^[9]。但PCA和HCA分析均能对不同稀释倍数*E.coli* 44113的光谱进行区分,因此可知,尽管矢量归一化可以消除样品量不同带来的光谱差异,但这并非绝对,仅能在一定程度上消除样品量不同带来的光谱差异。上述结果说明较大的浓度差异也会影响FT-IR技术对细菌的检测结果。因此在利用FT-IR技术进行微生物检测时,不能忽视浓度的影响,应尽可能统一样品的浓度,减少后期分析的难度。

细菌在不同培养时间代谢特征不一样,对应的光谱特征应当也不相同。对不同培养时间*E.coli* 44113的光谱分析验证了这一点。PCA和HCA分析均能对不同培养时间*E.coli* 44113的光谱进行区分。说明不同的培养时间会干扰FT-IR技术对细菌的检测结果。可能的原因是:FT-IR光谱读取的是整个细胞所有组成成分的化学键的振动情况,不同培养时间的细菌体内代谢成分有所不同,FT-IR技术可能就会灵敏的捕捉到这些区别并将其有效的区分开来。因此在利用FT-IR技术对微生物进行分类鉴定时,应尽可能统一样品的培养时间,提高分析的准确度。

加热灭活可以破坏细菌的物质结构,包括蛋白质变性、核酸断裂、肽段断裂、酶失活等。对加热灭活前后的*E.coli* 44113光谱进行聚类分析证明了加热引起的光谱变化。PCA和HCA分析均能对加热灭活前后*E.coli* 44113的光谱进行较好分类。说明加热灭活会干扰FT-IR技术对细菌的检测结果,这种影响可能是由于细菌物质结构的

变化导致的光谱特征发生改变引起。因此为得到FT-IR技术对微生物的准确检测结果,应读取活体微生物的红外光谱进行分析。

综上所述,细菌浓度、培养时间、加热灭活均会带来细菌FT-IR光谱的变化并干扰FT-IR技术对细菌的检测结果。因此,在应用FT-IR技术对细菌进行检测时,统一的样品前处理是决定检测是否成功的关键技术之一。

参考文献:

- [1] NAUMANN D. Some ultrastructural information on intact, living bacterial cells and related cell-wall fragments as given by FTIR[J]. *Infrared Phys*, 1984, 24(2): 233-238.
- [2] NAUMANN D, HELM D, LABISCHINSKI H. Microbiological characterization by FT-IR spectroscopy[J]. *Nature*, 1991, 351: 81-82.
- [3] HELM D, LABISCHINSKI H, SCHALLEHN G, et al. Classification and identification of bacteria by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. *J Gen Microbiol*, 1991, 137(1): 69-79.
- [4] HELM D, LABISCHINSKI H, NAUMANN D. Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-Transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach[J]. *J Microbiol Meth*, 1991, 14(2): 127-142.
- [5] HORBACH I, NAUMANN D, FEHRENBACH F J. Simultaneous infections with different serogroups of *Legionella pneumophila* investigated by routine methods and Fourier transform infrared spectroscopy[J]. *J Clin Microbiol*, 1988, 26(6): 1106-1110.
- [6] KIRSCHNER C, MAQUELIN K, PINA P, et al. Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(5): 1763-1770.
- [7] 吴海. 傅里叶变换红外光谱技术对微生物研究的探索实验[J]. *中国资源综合利用*[J], 2009, 27(5): 23-25.
- [8] ORSINI F, AMI D, VILLA A M, et al. FT-IR microspectroscopy for microbiological studies[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 42(1): 17-27.
- [9] 蔡飞, 陆峰. 傅里叶变换红外光谱结合化学计量学在微生物判别、分类、鉴定中的应用[J]. 2002, 20(4): 238-240.
- [10] BEATTIE S H, HOLT C, HIRST D, et al. Discrimination among *Bacillus cereus*, *B. mycoides* and *B. thuringiensis* and some other species of the genus *Bacillus* by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 164(1): 201-206.
- [11] LIN M, AL-HOLY M, CHANG S S, et al. Rapid discrimination of *Alicyclobacillus* strains in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Int J Food Microbiol*, 2005, 105(3): 369-376.
- [12] RODRIGUEZ-SAONA L E, KHAMBATY F M, FRY F S, et al. Rapid detection and identification of bacterial strains by Fourier transform nearinfrared spectroscopy[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(2): 574-579.
- [13] BARTLOMIEJ D, ANDRZEJ B, DOROTA N, et al. Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis[J]. *International Dairy Journal*, 2007, 17: 183-189.