

利用傅里叶变换红外光谱技术检测病原菌

陈彦长 张惠纯

(中国进出口商品检验技术研究所,北京)

摘要 本文着重介绍了 Naumann 等自 80 年代以来利用傅里叶变换红外光谱技术,对病原菌进行鉴别和鉴定方面的研究工作。并对其检测方法、实验方案、细菌的红外光谱、方法的重复性及谱图量化、微分指数及其使用分别做了较详细的介绍。

关键词 傅里叶变换红外光谱;病原菌检测

利用红外光谱鉴别细菌早在 50 年代开始。1951 年 Randall^[1] 等提出对细菌的整体进行红外检测,实验是将干燥菌体与溴化钾试剂以 1:100 比例混合压制成透明薄片后进行红外测试的,这有助于抗酸菌分群的研究。1959 年 Noris^[2] 总结了前人利用普通红外光谱分析细菌的工作,并指出细菌的红外特征吸收可用于细菌鉴定。1972 年 Kuroda 和 Arai^[3] 将细菌的红外光谱自 3000—2800,1750—1650,1550—1370 和 1250—950cm⁻¹ 分别划分为 I、II、III、IV 四个区域,把这四个区域内的特征吸收加以组合,即可获得各属特征,用于区分链霉菌属、放线菌属、诺卡氏菌属和分枝杆菌属。

尽管如此,由于普通红外光谱扫描速度低,在区分复杂光谱及相似性方面也有困难。因此,利用红外技术鉴别细菌的研究工作一直进展不大。1969 年世界上首次推出第一台傅里叶变换红外光谱仪,它是傅里叶变换技术(Fourier Transform),红外光谱(Infrared Spectroscopy)以及计算机技术相结合的产物,简称 FT-IR。现代的 FT-IR 具有光通量大,信噪比高,扫描速度快,可在每一时刻获得全频域光谱响应的特点。同时,还能快速而精确地进行谱图处理和谱图检索。这势必促进红外光谱在细菌检测方面的应用。

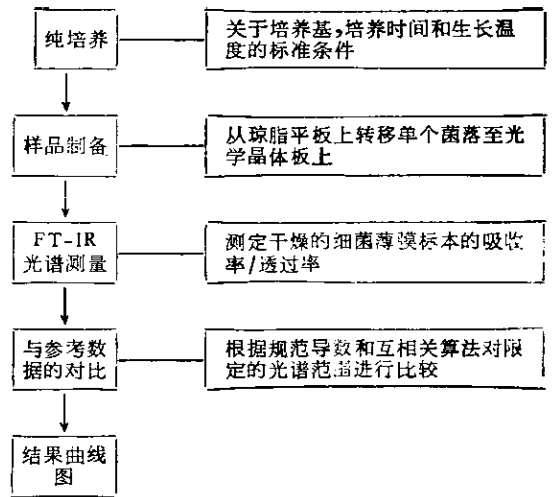
近 10 年来,Naumann^[4] 利用 FT-IR 技术在细菌检测方面做了大量工作。指出:细菌分离成纯培养后,利用 FT-IR 技术可在几分钟内完成对病原菌的鉴定。其方法先进,灵

敏度高,重复性好,并可能鉴别到血清型水平。

本文详细介绍了国外这一领域的动态,以供参考。

(一) 检测方法步骤

Naumann^[4] 认为在进行 FT-IR 测量前,对培养基,细菌收获,标本制备,测定时间,光谱分辨率以及数据评价等方面,需要制定一个十分标准的实验方案,其步骤如下:



据 Naumann 介绍^[4],所有细菌都是涂覆在硒化锌(ZnSe)晶体上进行 FT-IR 光谱测量的。用已校准的铂金环将经 37℃ 生长 20 ± 2 小时的细菌样品直接从培养基平板上取出,

本文经孟洪德教授审阅,特此致谢。

悬浮于 30 μl 水中,接着从上述悬浮液中取出 20 μl 转移至一个硒化锌窗片上。由于样品用量少,因此,可在硒化锌窗片上点涂至 20 个样品。在干燥器中,菌悬液被干燥剂和适度的真空脱水成为透明的细菌薄膜。然后将这块附有细菌薄膜的硒化锌窗片移至一个专为连续测定病原菌而设计的、不透气的、可旋转的透明容器内。置该容器于不带任何辅助聚焦的 10-MXE 型的 FT-IR 光谱仪 (Nicolet Instr., Madison, USA) 上。在中红外区域 (4000—400cm⁻¹) 4 个波数分辨率下测量 2 分钟。实验中采用的是全细菌测量,该图(图 1)显示了复杂的红外吸收。

们根据细菌的红外吸收谱带的数目、峰位置、半峰宽、谱带形状、相对峰密度、相对峰强度等参数来解释细菌的特殊化学组成^[9,12,13]。因为是特异的,所以完全可以作为细菌“指纹光谱”来使用。

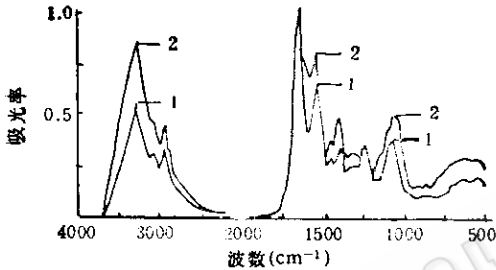


图 1 2 种不同细菌的红外谱图 (4000—500cm⁻¹)
细菌在 bacto peptone agar 上培养 20±2 小时,37℃

- 1. 金黄色葡萄球菌 *S. aureus*, Strain SG 511.
- 2. 藤黄微球菌 *Micrococcus lutes* M1108

通常将所测光谱用 Savitzky/Golay 规则计算一阶导数和二阶导数光谱。并将 1200—900cm⁻¹ 区域内的一次导数光谱按文献 [5—8] 介绍的互相关性函数计算出其微分指数 (D 值)。最后将被测未知光谱与已存入计算机数据库内的标准细菌光谱及其 D 值进行检索比较,判定细菌类别。

(二) 细菌的红外光谱

全细菌的红外光谱图 2^[6]、图 3^[9]、图 4^[10] 揭示了其自身特有的复杂的特征吸收。其中任一吸收谱带都是很有意义的^[2,11,12]。这些谱带是由细菌的各个单一组分,例如细胞壁、细胞膜、蛋白质、核酸等所产生的特征光谱曲线组成。人

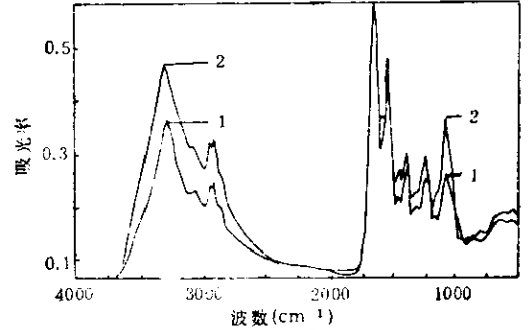


图 2 2 种不同细菌的红外光谱 (4000—500cm⁻¹)

- 1. 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*
- 2. 产气荚膜梭菌 *Clostridium perfringens*

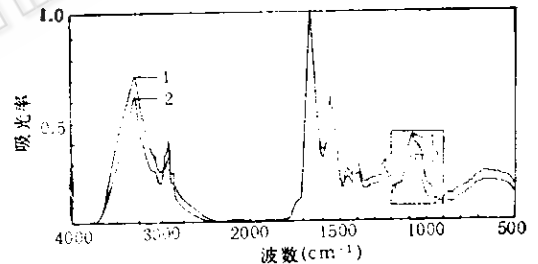


图 3 2 种不同细菌的红外光谱 (4000—500cm⁻¹)

- 1. 鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium*, Var. Copenhagen
- 2. 明尼苏达沙门氏菌 *Salmonella minnesota*, Kaufmann 利用方框内曲线计算 D 值

在图 2—4 中绘制了 2 种不同的细菌,它们显示了各种细菌所特有的光谱信息(关于数量、频率和吸收强度)。并可知其差异明显,这是利用 FT-IR 鉴别细菌的基础。

为使提供的数据简明、易读、便于用数值表示结果,常常选取最灵敏,最有选择性的 1200—900cm⁻¹ 区域 (该区域内的吸收光谱受细菌中的各种多糖支配)。但在最后数据评价时,很有可能涉及其它光谱区域,甚至整个光谱

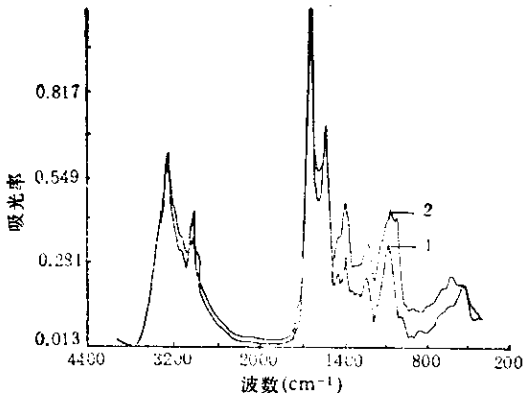


图4 2种不同细菌的红外光谱(4000—400cm⁻¹)
 (1) 化脓链球菌 *Streptococcus Pyogenes*
 (2) 肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella Pneumoniae*

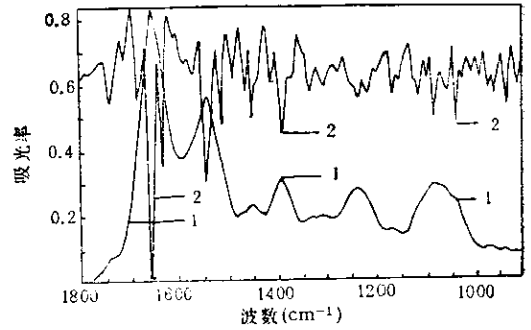


图5 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 的红外光谱(1300—900cm⁻¹)
 1. 原始光谱
 2. 由原始光谱求出的二阶导数光谱

区。

FT-IR 光谱仪光通量大, 信噪比高, 检测细菌时所需样品量仅几微克, 如果应用 FT-IR 显微镜, 样品用量可降至毫微克。

为避免人工制样时, 因细菌薄膜内所含不定量水份, 薄膜厚度差异以及因硒化锌晶体表面漫散射所引起的基线漂移, 在细菌光谱比较时统一使用归一化的一阶、二阶导数光谱, 参见图5^[4], 图6^[14]。

图7^[9]则是从临床上分离出的四种细菌普通测量光谱及导数光谱。

由图5、6、7可知: 同一种细菌其普通测量光谱与其导数光谱比较, 后者谱带精细。两种不同细菌的普通测量光谱与其导数光谱比较, 导数光谱可提高重叠谱带的分辨率, 更能显示出差异性。图7中临床分离的细菌光谱差异十分明显。

(三) 方法的重复性

Naumann 介绍该方法具有极佳的可重复性, 详见图8^[14], 图9^[9]。

方法的可重复性试验是对 *S. aureus*, Strain SG 511 和 *S. aureus*, Strain 52A5G 2种不同细菌各来自4个不同菌落的样品检测。光谱范围在1200—900cm⁻¹ 波数之间。

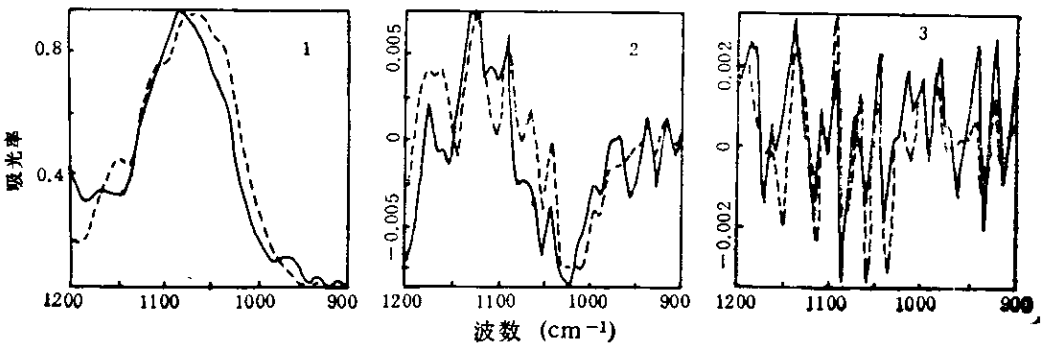


图6 2个不同细菌的红外光谱(1200—900cm⁻¹)
 “——”金黄色葡萄球菌 *S. aureus*, Strain SG 511,
 “.....”藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*, M1108
 1. 普通测量
 2. 一阶导数光谱
 3. 二阶导数光谱

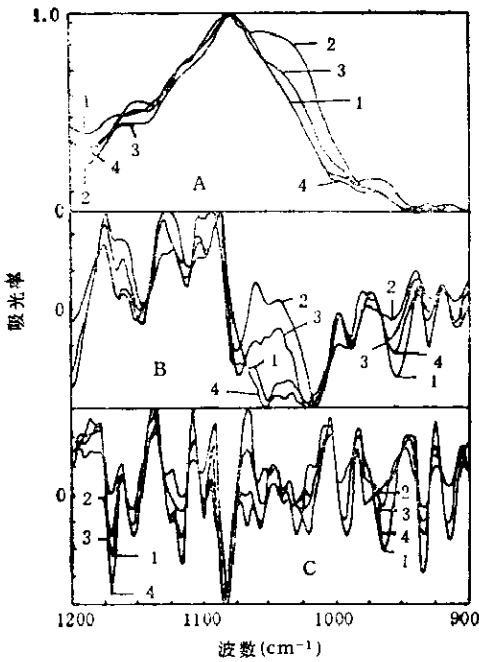


图7 从临床分离出4种细菌的红外光谱(1200—900cm⁻¹)

- A. 普通测谱 B. 由A求出一阶导数光谱 C. 由A求出的二阶导数光谱
- 1. 摩根摩根氏菌 *Morganella morganii*
- 2. 液化沙雷氏菌 *Serratia liquefacies*
- 3. 少丙二酸盐枸橼酸盐杆菌 *Citrobacter amaloniticus*
- 4. 奇异变形杆菌 *Proteus mirabilis*

由图8、9可知：来自不同纯培养的4个单独菌落经FT-IR测定其光谱极为相似。这不仅与FT-IR仪器本身高精度、高稳定性有

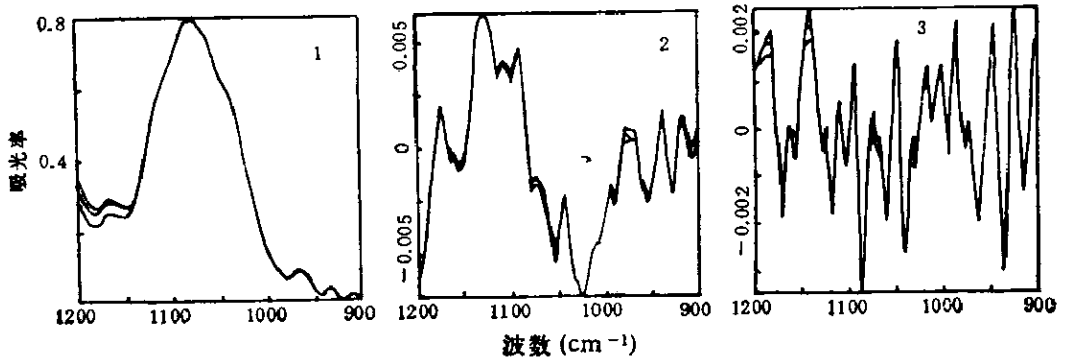


图8 重复性实验(1200—900cm⁻¹)

来自金黄色葡萄球菌 *S. aureus*, Strain SG 511 的4个不同菌落的检测

- 1. 普通测量
- 2. 由普通测量求得的一阶导数光谱
- 3. 由普通测量求得的二阶导数光谱

关。同时还与该方法所建立的十分标准的实验步骤有密切关系。经实验证明，该方法具有极好的可重复性。这一特点将有利于计算机检索和建立标准细菌谱库。

(四) 谱图量化及微分指数

为解决不同细菌之间的光谱差异, Naumann 应用互相关算法对光谱进行量化, 即对特定光谱区域内的光谱曲线求导数, 进而计算出微分指数^[8], 对细菌进行鉴别时, 根据各个细菌的微分指数列出细菌的相关图表(见表1)^[10], 这样细菌之间的区别将更加一目了然。

微分指数即D值, 它是通过公式 $D = (1 - \alpha) \times 1000$ 求得, 其中 α 为相关系数, D值范围在 0—1000 之间。每次确定同一光谱时必须终归到零。

2个单独测定的细菌光谱, 若光谱形状极为相似, 则D值必然相同或十分接近(见表2)^[10]。若光谱形状差异明显, 其D值差异也较大, 由此可对不同细菌加以区别。

表1中4个不同属细菌的红外光谱图(图10)^[10], 其普通测量差异明显, D值相差也较大。

表2^[10]列出金黄色葡萄球菌 *S. aureus* Strain pelzer 在 bacsto peptone agar 上培养的8个细菌菌落的D值。

表3^[10]是将表皮葡萄球菌 *S. epiderm* 与金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 的九个不同菌株进

表1 4个不同属细菌的D值

样品	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	肺炎克雷伯氏菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	埃希氏大肠菌 <i>Escherichia coli</i>	鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	0			
肺炎克雷伯氏菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	307	0		
埃希氏大肠菌 <i>Escherichia coli</i>	150	304	0	
鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	184	163	124	0

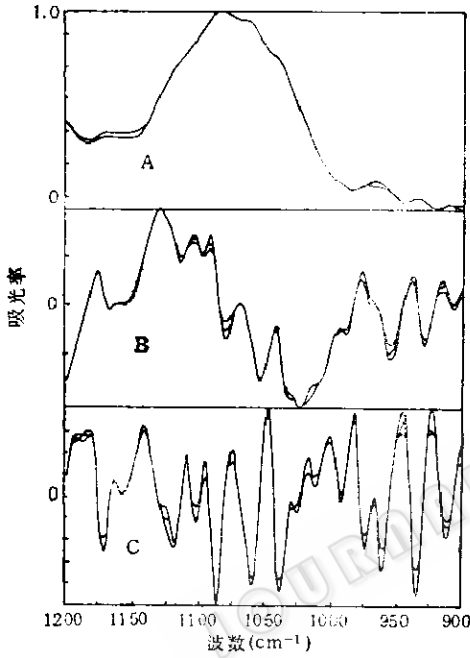


图9 重复性实验(1200—900cm⁻¹) 来自金黄色葡萄球菌 *S. aureus*, Strain 52A 5G 的4个不同菌落的检测

- A. 普通弱显
- B. 一阶导数光谱
- C. 二阶导数光谱

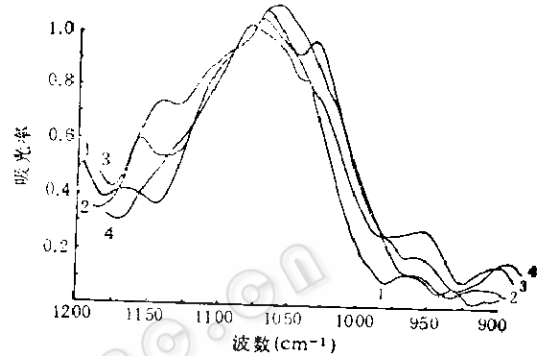


图10 4个不同属细菌的红外光谱(1200—900cm⁻¹)

- 1. 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*
- 2. 肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae*
- 3. 埃希氏大肠菌 *Escherichia coli*
- 4. 鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium*

表2 同一细菌8个菌落的D值与相关图表

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0							
2	1	0						
3	1	1	0					
4	2	1	2	0				
5	2	3	2	5	0			
6	2	1	2	2	3	0		
7	2	2	2	1	4	1	0	
8	2	2	2	3	2	2	2	0

表3 表皮葡萄球菌的D值与金黄色葡萄球菌的九个不同菌株D值的比较

样品	SG 511	52A5G	peizer	oxford	clin. isol	H. RK1	H. GB	H/28	H/4B	<i>S. epiderm</i>
SG 511	0									
52A5G	21	0								
peizer	17	11	0							
oxford	18	16	16	0						
clin. isol	19	16	12	15	0					
H. RK1	18	31	15	21	17	0				
H. GB	29	20	23	7	24	36	0			
H/28	19	22	13	11	17	11	17	0		
H/4B	27	21	15	12	17	25	11	10	0	
<i>S. epiderm</i>	53	72	55	47	50	55	54	56	50	0

表4 鼠伤寒沙门氏菌3个不同血清型的D值

样品	鼠伤寒沙门氏菌哥本哈根变种 a	鼠伤寒沙门氏菌哥本哈根变种 b	鼠伤寒沙门氏菌哥本哈根变种 c
鼠伤寒沙门氏菌哥本哈根变种 a <i>S. typhimurium</i> Var. Copenhagen (a)	0		
鼠伤寒沙门氏菌哥本哈根变种 b <i>S. typhimurium</i> Var. Copenhagen (b)	9	0	
鼠伤寒沙门氏菌哥本哈根变种 c <i>S. typhimurium</i> Var. Copenhagen (c)	57	31	0

a. 缺 O5 抗原 b. 缺 O5 抗原, 但有一个质粒 c. 含 O5 抗原, 并有与 b 相同的质粒

表5 从病人分离出的细菌与同种参考菌株的D值相关图表 (1200—900cm⁻¹)

参考菌株与分离菌	SG4	B2	B3	C2	D2	SG8	SG1	B1	C1	D1	SG5	SG10	B4	<i>L. dumoffii</i>	<i>E. coli</i>
SG 4	0														
B2	12	0													
B3	23	25	0												
C2	13	19	10	0											
D2	9	8	18	16	0										
SG8	91	90	136	125	94	0									
SG1	90	80	81	80	89	237	0								
B1	80	61	58	67	72	219	15	0							
C1	81	63	54	65	73	221	19	6	0						
D1	36	23	50	43	32	151	23	19	20	0					
SG5	23	25	32	26	28	88	97	87	98	37					
SG10	26	30	29	25	25	108	101	74	68	44	25	0			
B4	28	31	26	28	26	98	86	60	57	40	25	5	0		
<i>L. dumoffii</i>	76	91	96	69	83	192	146	128	124	93	80	81	86	0	
<i>E. coli</i>	139	116	180	153	134	258	98	110	110	82	125	145	148	166	0

行光谱测量, 并求得D值, 制成相关图表。

表4^[4]将鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* 的3个不同血清型的D值列出。

表5^[8]是从同时感染的病人 B. C. D 身上分离的细菌和参考菌株经 FT-IR 测量且量化后制成的相关图表。

从这些相关图可以看出, 该方法不仅可以对不同属、不同种的菌株进行鉴别, 甚至可以鉴别到血清型。形状相似的光谱得到的D值小, 形状不同的光谱得到的D值大。在建立细菌的红外谱库时, 根据常规细菌鉴定的结果和标准菌株的对比, 可以规定D值在零到某一范围内的菌可视为同一种菌。D值大于某一值, 可视为不同的细菌, 这就完成了对细菌的鉴别。

结 论

在食品检验和环境监测中, 通常要随时指出超过规定数量的互不相同的病原菌。例如, 金黄色葡萄球菌、埃希氏大肠菌、链球菌、梭状芽孢杆菌等。为了检出这些细菌, 通常要进行多种生化反应、血清学及噬菌体分型试验。当要求对各种细菌的分离物的同一性和非同源性作出确证鉴定时, FT-IR 技术从理论上讲似乎是适宜的。

目前, 利用 FT-IR 技术鉴别和鉴定病原菌的方法尚在不断完善中。但从大量研究中已经证明, 该方法用于微生物病原菌的鉴别和鉴定是可行的, 很有可能成为未来的一种新检测

(下转第301页)

方法或作为现有方法的补充。另外,还可用于快速识别,流行病分析和微生物学其它方面的研究。

参 考 文 献

1. Randall H M et al.: *J. Amer. Rev. Tuberc.*, **63**: 373, 1951.
2. Norris K P.: *The Journal of Hygiene*, **57**: 326—345, 1959.
3. Kuroda S et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **18**: 331, 1972.
4. Naumann D.: *Proceeding of 2nd World Congress Foodborne Infections and in Toxications*, 405—408, 1986.
5. Frank J: *Computer Processing of Electron Micrographs*, Springer Verlag, Berlin, 187—222, 1980.
6. Rossi T M et al.: *J. Appl. Spec.*, **39**: 49, 1985.
7. Marin V H et al.: *Ultramicroscopy*, **13**: 165—134, 1984.
8. Horbach I et al.: *J. Clin. Microbio.*, **26**(6): 1106—1110, 1988.
9. Naumann D: *J. Molecular Structure*, **174**: 165—170, 1988.
10. Giesbreche P et al.: *Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology*, 198—206, 1985.
11. Naumann D et al.: *A New Method for the Rapid Identification of Microorganisms Using FT-IR*, 1, 1984.
12. Naumann D et al.: *Infrared Phys.*, **24**: 238, 1984.
13. Naumann D et al.: *Eur J. Biochem.*, **125**: 505—515, 1982.
14. Naumann D: *SPIE*, **553**: 233—238, 1985.