

## 研究报告

## 基于银纳米棒的表面增强拉曼基底探究土霉素对植物乳杆菌的影响

孙新<sup>#1,2</sup>, 商可心<sup>#2,3</sup>, 王周平<sup>1,2,3</sup>, 马小媛<sup>\*1,2,3</sup>

1 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122

3 国家功能食品研究中心, 江苏 无锡 214122

孙新, 商可心, 王周平, 马小媛. 基于银纳米棒的表面增强拉曼基底探究土霉素对植物乳杆菌的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 163-172

Sun Xin, Shang Kexin, Wang Zhouping, Ma Xiaoyuan. Effect of oxytetracycline on *Lactobacillus plantarum* on surface enhanced Raman substrate based on Ag NRs[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 163-172

**摘要:**【背景】土霉素属四环素类抗生素, 在医疗制药和动物养殖行业应用广泛。抗生素的滥用与残留极易导致环境中的益生菌产生耐药, 各类益生菌通过食物进入机体后, 可将耐药基因转移给致病菌。目前的耐药菌株筛选方法耗时较长, 最小抑菌浓度测定结果也可能存在偏差, 而且无法在抗菌机理及耐药机制方面提供线索。【目的】采用表面增强拉曼光谱(surface enhanced Raman spectroscopy, SERS)技术探究土霉素与植物乳杆菌之间的相互作用, 以期为微生物耐药菌株的快速筛选提供理论基础, 并为研究抗菌机理及耐药机制提供思路及方法。【方法】组装银纳米棒与石英后得到一种具有良好、稳定的 SERS 增强效应的固相基底; 在植物乳杆菌菌液中加入不同浓度土霉素后各自分别孵育 30、60 和 90 min, 利用组装好的固相基底对细菌细胞进行 SERS 信号测定, 拉曼光谱的出峰位置和峰强度变化可以体现不同土霉素浓度及作用时间条件下植物乳杆菌细胞成分的差异, 可进一步推断土霉素对植物乳杆菌生长的影响。【结果】0.5×MIC 土霉素会造成 SERS 光谱强度的降低; 1.0×MIC 土霉素作用 90 min 后, SERS 在 1 612、1 630 cm<sup>-1</sup> 处出现 2 个分别代表酪氨酸和酰胺 I 的新峰, 推测植物乳杆菌细胞壁被破坏; 2.0×MIC 土霉素作用 60 min 便可对受试菌体细胞壁造成较大破坏。【结论】通过拉曼光谱检测可以反映细菌细胞状态的改变、胞内胞外成分的变化情况, 在研究抗菌药物对细菌的作用方式及耐药机制等方面都具有重要意义, 为微生

基金项目: 无锡市社会发展科技示范工程项目(N20201001); 江苏省重点研发项目(BE2018306)

#对本文贡献相同

Supported by: Wuxi Social Development Fund Project (N20201001); Key Research and Development Program of Jiangsu Province (BE2018306)

#These authors equally contributed to this work

\*Corresponding author: E-mail: maxy@jiangnan.edu.cn

Received: 2021-04-29; Accepted: 2021-06-16; Published online: 2021-10-18

物耐药性菌株的快速筛选提供了良好的技术基础。

**关键词：** 抗生素；表面增强拉曼光谱；微生物

## Effect of oxytetracycline on *Lactobacillus plantarum* on surface enhanced Raman substrate based on Ag NRs

SUN Xin<sup>#1,2</sup>, SHANG Kexin<sup>#2,3</sup>, WANG Zhouping<sup>1,2,3</sup>, MA Xiaoyuan<sup>\*1,2,3</sup>

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 National Engineering Research Center for Functional Food, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract: [Background]** As a kind of tetracycline, oxytetracycline (OTC) is used widely in pharmacy making and animal breeding. Abuse and residues of antibiotics can easily lead to drug resistance of probiotics in the environment, and all kinds of probiotics can transfer drug-resistant genes to pathogenic bacteria after entering the body through food. The current screening methods for drug-resistant strains are time-consuming, and the results of the minimum inhibitory concentration determination may be biased, and the results do not directly show the antibacterial mechanism and drug resistance mechanism. **[Objective]** In this study, surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) technology was used to explore the interaction between oxytetracycline and *Lactobacillus plantarum*, aiming to provide a theoretical basis for the rapid screening of microbial drug-resistant strains and provide ideas and methods for the study of antimicrobial mechanism and drug-resistant mechanism. **[Methods]** In this experiment, a kind of solid phase substrate with good and stable SERS enhanced effect was obtained after assembling silver nanorods and quartz. After adding oxytetracycline at different concentrations, *Lactobacillus plantarum* was incubated for 30 min, 60 min and 90 min respectively. The assembled solid substrate was used to measure the SERS signal of the bacteria cells. The changes of the peak location and peak intensity of Raman spectrum could reflect the differences in the cell components of *Lactobacillus plantarum* under different oxytetracycline concentrations and action time. The effect of oxytetracycline on the growth of *Lactobacillus plantarum* can be further inferred. **[Results]** The results showed that 0.5×MIC oxytetracycline mainly caused the decrease of SERS spectrum intensity. 1.0×MIC oxytetracycline at 90 min may lead to the destruction of the bacterial cell wall, the SERS spectra in, 1612 cm<sup>-1</sup> and 1630 cm<sup>-1</sup> appear two peaks represent the tyrosine and amide I. The cell wall was damaged by 2.0×MIC oxytetracycline at 60 min. **[Conclusion]** Raman spectroscopy detection can reflect the changes of bacterial cell state and intracellular and extracellular components, which is of great significance for the study of antimicrobial agents on bacteria and the mechanism of drug resistance, and also provides a good technical basis for the rapid screening of microbial drug-resistant strains.

**Keywords:** antibiotics; SERS; microorganism

表面增强拉曼光谱(surface enhanced Raman spectroscopy, SERS)广泛应用于环境化学、生物化学中有机化合物的分析,是研究表面和界面过程的重要工具,可实现各类生物化学成分的超灵敏检测<sup>[1-2]</sup>。其优势在于能够在非常小的检测体积条件下对极低检测水平的靶标分子提供指纹信息<sup>[3-6]</sup>。本实验中使用到的具有 SERS 效应的固相基底能够对热点的生成及靶标分子的精确位置有很好的控制,在重复利用和增强效果方面存在较大优势<sup>[7-10]</sup>。

抗生素的滥用及残留易导致耐药的发生,生活中常见的益生菌很可能会携带一些耐药基因,在发酵型食品中应用广泛的植物乳杆菌一旦携带耐药基因通过各类食品进入人体并将耐药性传播给致病菌,将给人体带来巨大风险。微生物与抗生素之间的抗菌机制与耐药机制研究对于指导微生物菌株的筛选及应用具有重要意义。本实验组装银纳米棒与石英后得到具有良好 SERS 增强效应的固相基底,通过检测相关菌液中 SERS 的出峰位置和峰强度变化来探究土霉素对植物乳杆菌生长的影响,通过不同土霉素浓度及作用时间条件下植物乳杆菌细胞成分的差异分析推断相关抗菌机制及耐药机制,以期为深入研究抗生素对细菌的作用方式提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

硝酸银、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、氢氧化钠、抗坏血酸、硼氢化钠、柠檬酸钠、吐温-80、氯化钠、琼脂粉、牛肉浸膏、胰蛋白胨、浓硫酸、无水乙醇、丙酮、磷酸氢二钾过氧化氢、乙酸钠、土霉素、0.2  $\mu\text{m}$  水系滤膜等所有试剂耗材均购买于国药控股有限公司。实验用水均为超纯水,所用试剂均为分析纯。

透射电子显微镜,日本电子公司;紫外分光光度计,岛津公司;分析天平,奥豪斯仪器(中国)

有限公司;实验室 pH 计,奥豪斯仪器(中国)有限公司;LabRAM HR800 共聚焦显微拉曼光谱仪(激发光源为 633 nm),HORIBA 公司。拉曼光谱的数据处理均使用 Labspec 6.0 软件。

### 1.2 实验原理

食人鱼溶液处理会使石英片表面带有羟基,经过孵育 CTAB 修饰的银纳米棒因带有正电荷而吸附在石英片表面,从而形成具有 SERS 效应的固相基底。植物乳杆菌细胞可以与表面的银纳米棒紧密接触,银纳米棒能够对其表面的植物乳杆菌细胞壁和细胞膜中的成分进行 SERS 信号增强,从而得到各种组分的拉曼光谱信息,实验原理如图 1 所示。土霉素对植物乳杆菌细胞的影响可以通过拉曼光谱信息的改变来体现。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 种子法合成银纳米棒

合成银纳米棒的第一步是合成单分散的银纳米种子(Ag seed)<sup>[11]</sup>。分别加 20 mL 柠檬酸钠水溶液(1%,质量分数)和 75 mL 超纯水至 250 mL 三颈烧瓶中,75  $^{\circ}\text{C}$  水浴静置 20 min 后剧烈搅拌,同时加入 1.7 mL 硝酸银水溶液(1%,质量分数),随后迅速加入 2 mL 硼氢化钠水溶液(新鲜配制),剧烈反应 1 h 后取出静置,冷却至室温,经 0.2  $\mu\text{m}$  水系滤膜过滤后,保存滤液于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

参考 Jana 等<sup>[12]</sup>的方法并加以改进来制备银纳米棒。于 10 mL CTAB 溶液(0.1 mol/L)中加入 250  $\mu\text{L}$  硝酸银溶液(10 mmol/L)和 60  $\mu\text{L}$  去离子水 5 倍稀释后的银纳米种子,30  $^{\circ}\text{C}$  静置 10 min。将 500  $\mu\text{L}$  抗坏血酸溶液(0.1 mol/L)和 100  $\mu\text{L}$  氢氧化钠溶液(1 mol/L)混合后再与之前得到的液体混合,搅拌 5 min 后静置 10 min。如此制得银纳米棒后离心(3 000 r/min, 10 min) 3 次进行纯化,最后重新分散于 1 mL 超纯水中,保存于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

#### 1.3.2 羟基化石英片的制备

石英片大小应为 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 的正方形,

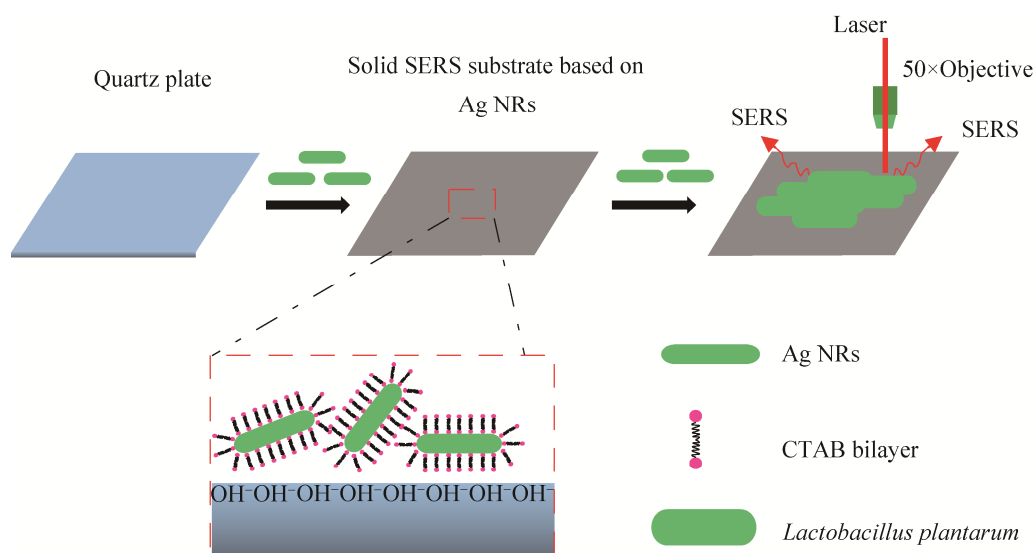


图1 基于银纳米棒固相 SERS 基底探究土霉素对植物乳杆菌影响原理图

Figure 1 Schematic illustration of solid SERS substrate based on Ag NRs for exploration of oxytetracycline's influence on the *Lactobacillus plantarum*.

先后用丙酮和超纯水进行超声清洗, 每次超声 20 min。末次超纯水清洗后用氮气吹干。将 30% 的过氧化氢加入 98% 的浓硫酸中, 体积比为 3:7, 配制 10 mL 食人鱼溶液。将玻片放入其中, 80 °C 浸泡 30 min, 取出先用乙醇冲洗, 再用超纯水清洁, 最后用高纯氮气吹干, 保存在氮气中备用。

### 1.3.3 银纳米棒固相基底的制备

取配制好的银纳米棒溶液 1 mL, 用超纯水稀释 3 倍后放入预先处理好的羟基化石英片, 使其浸没。37 °C 静置过夜, 银纳米棒因表面被 CTAB 修饰, 可以通过静电吸附作用与带有 OH<sup>-</sup> 的石英片紧密结合, 从而产生银纳米棒固相基底。制备好的固相基底用超纯水清洗后氮气吹干, 保存在氮气中备用。

### 1.3.4 细菌样品的制备

取出实验室保存的植物乳杆菌菌液, 在生物安全柜中无菌接种于 LB 液体培养基, 37 °C、150 r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 值在 0.8 左右, 将活化后的植物乳杆菌接种到 MRS 液体培养基中, 37 °C 静置培养至对数生长期(OD<sub>600</sub> 约为 1.3)。取对数生长

期菌液 1 mL, 5 000 r/min 离心 5 min 除去菌液中的培养基, 用生理盐水重悬、清洗再离心, 重复 3 次。经试验得知土霉素对受试植物乳杆菌的最小抑菌浓度为 4 μg/mL, 配制一定浓度的土霉素溶液, 分别加入到 1 mL 菌液中, 使最终菌液中土霉素的浓度分别为 2、4、8 μg/mL。将各菌液置于 37 °C 培养箱中静置, 30、60、90 min 这 3 个时间点从各菌液中取样, 5 000 r/min 离心 5 min 弃上清, 用生理盐水重悬、清洗再离心, 重复 3 次。

### 1.3.5 细菌 SERS 的测定

取生理盐水重悬后的各菌液 10 μL, 滴于银纳米棒固相基底上, 待菌液近干时进行 SERS 的测定。测定时的参数设定为: 激发光源为 633 nm, 显微镜×50 vis, 采集时间为 10 s, 循环次数为 1 次, 光栅 600 gr/mm, 拉曼位移 400–2 000 cm<sup>-1</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 银纳米棒固相基底的表征

共聚焦拉曼显微镜 50 倍镜下拍摄各阶段石英片的光学图像如图 2 所示。图 2A 显示彻底清

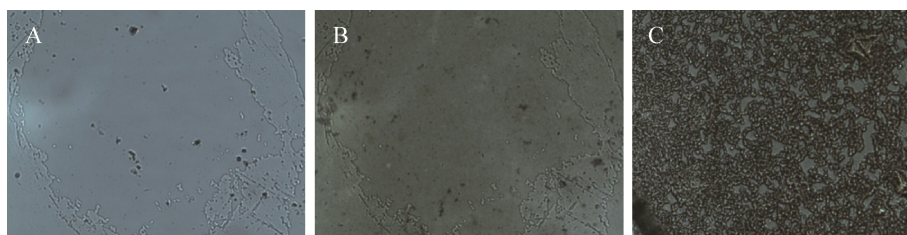


图2 共聚焦拉曼显微镜图像 A: 石英片图像; B: 银纳米棒组装的石英片图像; C: 植物乳杆菌细胞在固相基底上图像

Figure 2 Confocal Raman image. A: Quartz chip; B: Quartz chip assembled with Ag NRs; C: *Lactobacillus plantarum* on the Raman substrate.

洗后的石英片在显微镜下表面平整,整体光线为淡蓝色,有一定的透光性。从图 2B 则可以看出与银纳米棒组装之后的石英片呈现暗灰色,表面平整但几乎不透光。据此推断银纳米棒在石英片上结合完全、吸附均匀、整体组装良好,有助于后期 SERS 光谱信号均一稳定。将植物乳杆菌菌液滴于制备好的 SERS 基底上,待菌液近干时得到光学图像,图 2C 中显示大量植物乳杆菌细胞成对或呈短链状分布,细胞之间分隔较为明显,无堆叠现象,与基底表面结合紧密。这有利于得到良好的细胞壁和细胞膜 SERS,进而监测其成分变化。

## 2.2 银纳米棒与石英片组装表征

通过紫外-可见光光谱检测发现(图 3),实验

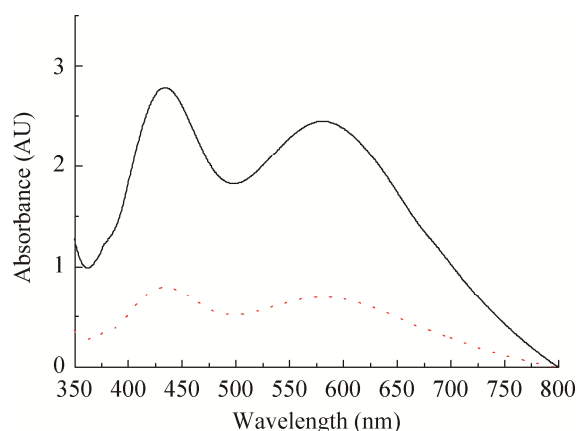


图3 银纳米棒溶液与石英片孵育前(实线)和孵育后(虚线)的紫外-可见光光谱

Figure 3 UV-vis spectrum of Ag NRs solution before (solid line) and after (dotted line) incubating with quartz chip.

中制备的银纳米棒在 430 nm 和 580 nm 处各有一个吸收峰,银纳米棒溶液与石英片孵育后的吸收峰强度与孵育前的银纳米棒溶液相比明显下降,表明经过与石英片孵育后溶液中银纳米棒的浓度大幅度下降,据此推断银纳米棒与石英片组装成功。

## 2.3 SERS 信号来源表征

为排除 SERS 信号中存在植物乳杆菌外其他物质干扰的可能性,分别对实验中制备的固相基底、末次洗涤菌液所得上清及受试菌液进行 SERS 的测定。图 4 结果显示,固相基底测得的 SERS 是一条类似波浪状的谱线,峰形较杂乱,这里给出的是经平滑处理后的谱线,这些峰的峰值很小,整条光谱与植物乳杆菌细胞的光谱相比

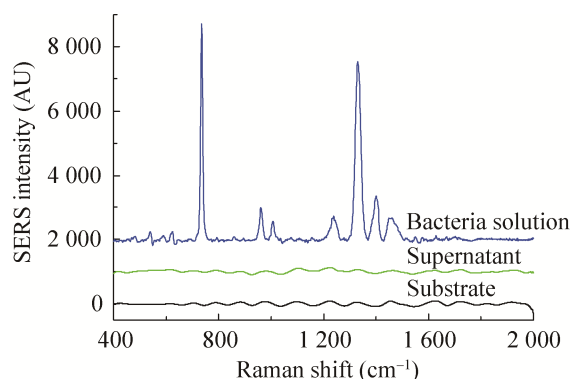


图4 SERS 基底和最后一次洗涤上清以及菌液的 SERS 光谱图

Figure 4 Raman spectrum of SERS substrate, the last time washing supernatant and *Lactobacillus plantarum* solution.

近似于一条直线；末次洗涤菌液离心的上清的 SERS 测定结果显示与固相基底的光谱相似，表明上清中无干扰物质；受试植物乳杆菌与固相基底结合后，检测发现其 SERS 光谱信号值较强且出峰位置清晰，峰值区分明显，表明固相基底对于植物乳杆菌细胞的 SERS 增强具有良好效果。从图 4 可以看出，实验检测到的 SERS 信号全部来自植物乳杆菌细胞，可排除其他物质干扰的可能性。

## 2.4 SERS 重现性表征

为了检验该方法在测定植物乳杆菌细胞 SERS 时的重现性，实验中分别使用了不同批次合成的固相基底对不同批次培养的植物乳杆菌细胞进行 SERS 测定。图 5 显示，不同批次的固相基底和菌液在 SERS 上特征峰的出峰位置和信号强度均基本保持一致，验证了实验中合成的固相基底稳定性和重复性良好，细菌细胞的 SERS 光谱信号结果可重复。

## 2.5 银纳米棒与石英片组装优化

银纳米棒在紫外-可见光光谱检测中，430 nm 波长区域的特征峰是横向等离子体带，而 580 nm 波长区域的特征峰是棒状颗粒的纵向等离子体

带。430 nm 波长区域特征峰有可能受球形纳米粒子影响，因而选择 580 nm 波长区域特征峰强度的下降值来表征银纳米棒组装到石英片上的效率。银纳米棒溶液与石英片孵育后每隔 3 h 进行一次吸收峰强度测定。图 6 显示，580 nm 处吸收峰强度的下降值随着时间的增长而呈现增加趋势，到 12 h 时趋于平稳，表明此时石英片对银纳米棒的吸附能力达到饱和，因而 SERS 固相基底组装的孵育时长设为 12 h。

## 2.6 土霉素对植物乳杆菌生长的影响

土霉素属四环素类抗生素，抗菌谱较为广泛，其作用机理主要是通过结合细菌核糖体 30S 亚基，阻碍氨酰基转运 RNA 与核糖体的结合，进而抑制细菌蛋白质的合成，最终达到抗菌的目的。本实验室预试验数据显示土霉素对受试植物乳杆菌的最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 约为 4  $\mu\text{g/mL}$ ，据此土霉素的研究浓度定为 0.5、1.0 和 2.0 倍 MIC 来探究其对植物乳杆菌的影响。为了解受试菌株细胞壁和细胞膜中的成分变化，本研究通过查阅文献根据测得的 SERS 光谱图对其主要成分进行匹配对应<sup>[13-19]</sup>，如表 1 所示。

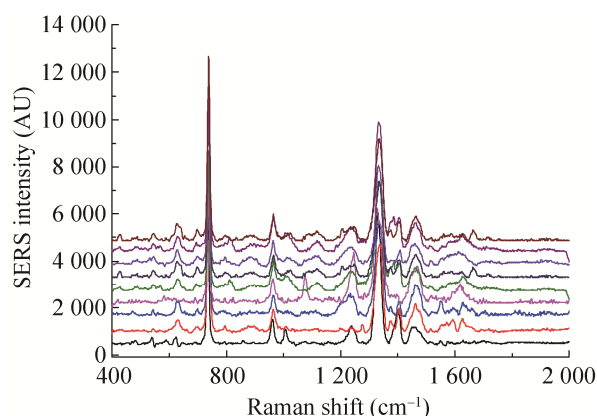


图 5 不同批次培养的植物乳杆菌细胞 SERS 光谱图  
Figure 5 Raman spectrum of *Lactobacillus plantarum* from different culturing batches.

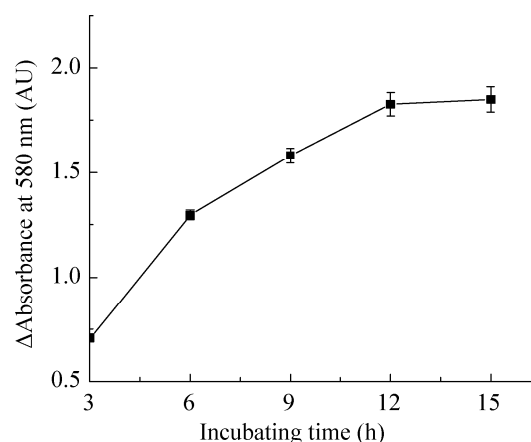


图 6 银纳米棒溶液与石英片孵育时间优化曲线图  
Figure 6 Optimization of the incubating time of Ag NRs solution and quartz chip.



**表 1 植物乳杆菌 SERS 光谱峰对应成分匹配表**  
**Table 1 Components identification of SERS spectrum of *Lactobacillus plantarum***

拉曼位移	对应成分
Raman shift	Corresponding component
( $\text{cm}^{-1}$ )	
660	半胱氨酸 C-S 伸缩模式 Cysteine C-S stretching mode
~735	肽聚糖中的 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸 N-acetyl glucosamine and N-acetyl teichoic acid in peptidoglycan
963	蛋白质中 C-C-C 或 C-C-N 伸缩振动 C-C-C or C-C-N stretching vibrations in proteins
1 007	苯丙氨酸(对称环呼吸模式)(蛋白质) Phenylalanine (Symmetric Ring Respiratory Pattern) (Protein)
1 033	脂质成分中 C-C 伸缩振动 C-C stretching vibrations in lipid components
1 084	$\text{PO}_2$ 或 C-O-C 伸缩振动 $\text{PO}_2$ or C-O-C stretching vibration
1 139	蛋白质中 C-C/C-N 伸缩振动 C-C/C-N stretching vibrations in proteins
1 244	酰胺 III, 反对称( $\text{PO}_4$ ) Amide III, antisymmetric ( $\text{PO}_4$ )
1 321-1 345	蛋白质中 C-H 弯曲振动 C-H bending vibrations in proteins
1 390	对称 $\text{COO}^-$ Symmetric $\text{COO}^-$
1 455	蛋白质或脂质中 $\text{CH}_2$ 变形 $\text{CH}_2$ deformations in proteins or lipids
1 589	NH 变形或酰胺 II 中 CN 伸缩振动 NH deformation or amide II CN stretching vibration
1 612	酪氨酸 Tyrosine
1 630	酰胺 I Amide I

土霉素终浓度分别为 2、4、8  $\mu\text{g/mL}$  的受试植物乳杆菌菌液在培养 30、60、90 min 时的 SERS 光谱图如图 7 所示。土霉素浓度为 2  $\mu\text{g/mL}$ 、孵育 30 min 的受试菌细胞 SERS 光谱图与 0 min 对照无明显差别(图 7A), 即此时的菌体未检测到明显变化。孵育 60 min 后发现拉曼位移 735、1 333  $\text{cm}^{-1}$  处的峰出现下降趋势, 根据表 1 可知

此二峰分别为肽聚糖和蛋白质的特征峰, 孵育 90 min 时这 2 个峰明显下降。推断 0.5 $\times$ MIC 的土霉素在前 30 min 对受试植物乳杆菌的生长影响较小, 菌体几乎检测不到变化, 而在生长 60 min, 特别是 90 min 时, 菌体胞壁中肽聚糖和胞膜中蛋白质含量开始发生明显改变, 此时土霉素开始影响受试菌体的生长。图 7B 显示, 4  $\mu\text{g/mL}$  土霉素浓度的受试菌液随着孵育时间的延长, 拉曼位移为 735  $\text{cm}^{-1}$  的峰出现显著下降, 推测菌体胞壁受到破坏。由表 1 可见, 963、1 007、1 244、1 333  $\text{cm}^{-1}$  拉曼位移处分别代表的蛋白质中 C-C-C/C-C-N 伸缩振动、蛋白质中 C-H 弯曲振动、氨基酸及酰胺键的峰均出现显著降低, 1 455  $\text{cm}^{-1}$  拉曼位移处显示脂肪饱和度的峰也出现显著下降, 说明菌细胞膜中蛋白质和脂肪均发生了明显变化, 推测土霉素的作用导致菌体蛋白质合成受到抑制, 细胞膜的结构及成分发生改变。孵育时间 90 min 时, 菌液拉曼光谱显示拉曼位移 1 321-1 345  $\text{cm}^{-1}$  附近与蛋白质相关的成分峰值较之前有所增长, 在 1 033  $\text{cm}^{-1}$  附近出现的小峰, 发现其与脂质成分中 C-C 伸缩振动相关。拉曼位移 1 612  $\text{cm}^{-1}$  和 1 630  $\text{cm}^{-1}$  处出现新峰, 提示检测到酪氨酸和酰胺 I。由于细胞壁中几乎不存在酪氨酸, 一般只在菌体胞膜中, 据此推断菌体胞壁已损坏, 露出的细胞膜蛋白质和脂质暴露较多, 相应拉曼位移处 SERS 信号出现增强。8  $\mu\text{g/mL}$  土霉素的受试菌液孵育 30 min 时, 拉曼位移 735  $\text{cm}^{-1}$  处的峰值与最初相比下降了 80%, 随着孵育时间的延长, 1 333  $\text{cm}^{-1}$  处的峰值出现显著下降, 而且位于 1 612、1 630  $\text{cm}^{-1}$  处的峰值出现显著上升(图 7C), 据此推断 8  $\mu\text{g/mL}$  土霉素环境下受试菌胞壁在短时间内即出现明显损害, 同时菌体胞膜中的蛋白质和脂质也发生变化。

相同时间点而不同土霉素浓度的 SERS 光谱之间的比较如图 8 所示。比较相同孵育时间, 不

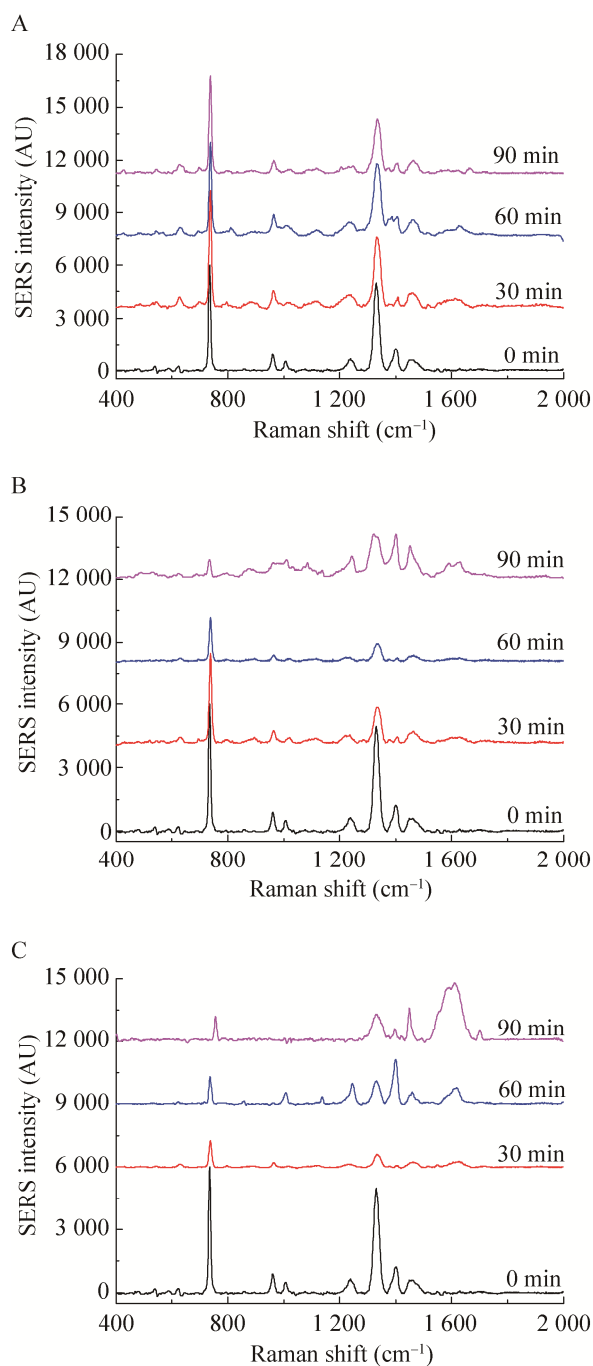


图 7 不同土霉素浓度下的植物乳杆菌 SERS 光谱图 土霉素浓度为 2  $\mu\text{g/mL}$  (A)、4  $\mu\text{g/mL}$  (B) 和 8  $\mu\text{g/mL}$  (C)

Figure 7 SERS spectrum of *Lactobacillus plantarum* with different concentration of OTC. The concentration of OTC is 2  $\mu\text{g/mL}$  (A), 4  $\mu\text{g/mL}$  (B) and 8  $\mu\text{g/mL}$  (C).

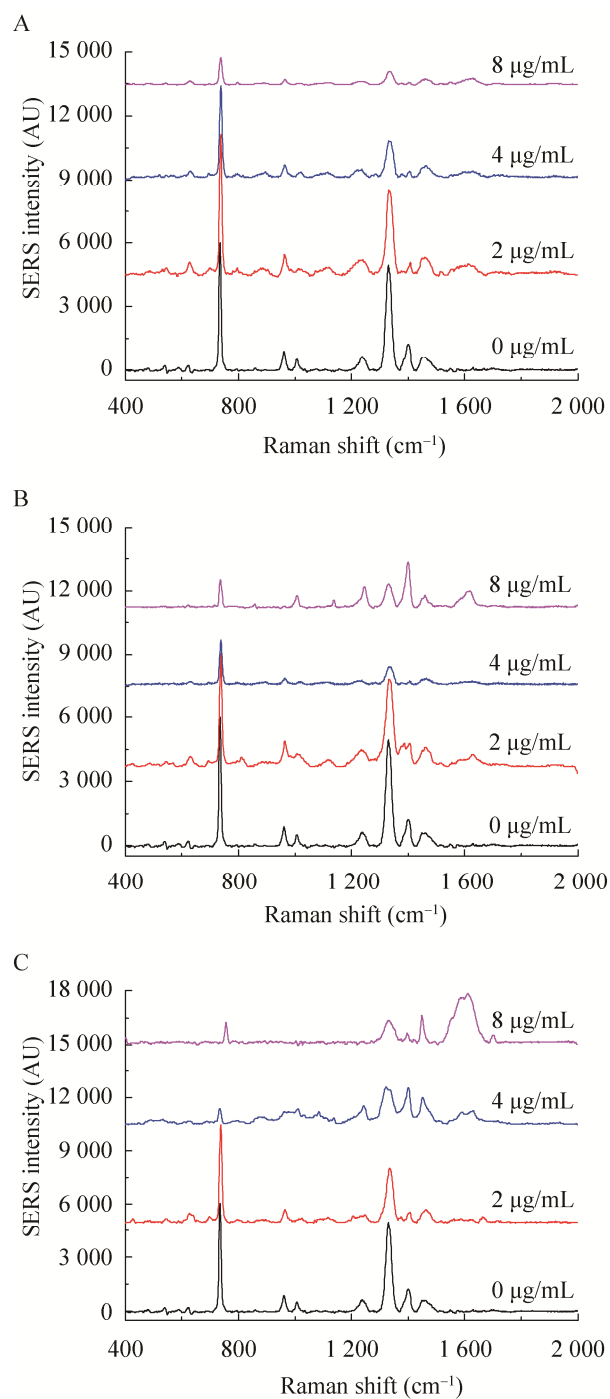


图 8 不同时间下的植物乳杆菌 SERS 光谱图 时间为 30 min (A)、60 min (B) 和 90 min (C)

Figure 8 SERS spectrum of *Lactobacillus plantarum* at different time. The time is 30 min (A), 60 min (B) and 90 min (C).



同土霉素浓度受试植物乳杆菌生长的差异发现:  $0.5\times\text{MIC}$  土霉素对受试菌体细胞生长的影响不大, 孵育 90 min 的菌体细胞仍未监测到明显变化;  $1.0\times\text{MIC}$  和  $2.0\times\text{MIC}$  土霉素作用的受试菌体细胞在 30 min 时即检测到明显变化, 其中  $1.0\times\text{MIC}$  土霉素浓度的菌液在孵育 90 min 时才检测出菌体胞壁的损坏, 相比较  $2.0\times\text{MIC}$  土霉素对受试菌体的影响最大, 孵育 60 min 时即检测到受试菌体胞壁的明显破坏。

### 3 讨论与结论

SERS 检测具有高度灵敏性, 对于样品的要求不高, 可检测样品范围广泛, 样品状态可以为固体、液体甚至气体, 样品前处理简便、高效<sup>[20-22]</sup>。目前, SERS 检测技术已广泛应用于环境科学、分析化学、食品质量检测及生命科学等领域<sup>[23-26]</sup>。在微生物相关研究领域方面, Duan 等<sup>[27]</sup>研究基于金纳米颗粒的 SERS 固相基底及副溶血性弧菌适配体, 发现了利用 SERS 信号强度检测副溶血性弧菌定量分析的有效方法。此外, 在生物应用方面, Xu 等<sup>[28]</sup>利用碘离子修饰的银纳米球在接近生理条件下实现了对单链和双链 DNA 的 SERS 信号测定, 利用碘离子修饰可以排除原来银纳米球表面化学物质对 DNA 检测的干扰, 同时以磷酸碳骨架的 SERS 信号作为一个内部标准, 实现了对 DNA 序列单碱基水平的测定。相信基于 SERS 检测技术进行微生物学相关研究在未来具有很大潜力。

本实验组装银纳米棒与石英后得到具有良好 SERS 增强效应的固相基底, 对不同土霉素浓度及作用时间条件下植物乳杆菌细胞成分的差异分析发现, 最小抑菌浓度的土霉素在 90 min 时会造成受试菌体细胞壁破损,  $2.0\times\text{MIC}$  土霉素在孵育时间达到 60 min 时已对受试菌体细胞壁造成较为严重的损伤。由此推断, 土霉素对于本研

究的受试植物乳杆菌的生长具有良好抑制作用, 菌体细胞对于土霉素的作用反应较为敏感, 通过检测相关菌液中 SERS 的出峰位置和峰强度变化可以用来探究土霉素对植物乳杆菌生长的影响, 为探究抗生素对细菌的影响以及菌体耐药性方面的研究提供了良好的基础。本研究使用的土霉素属广谱抗生素, 目前在医疗制药和动物养殖行业应用比较广泛, 残留导致的耐药问题也较为严重, 因此本实验先行研究了植物乳杆菌对土霉素的耐药情况, 后续实验中会进一步研究植物乳杆菌对诸如多粘菌素 B、万古霉素、链霉素、庆大霉素、青霉素、氯霉素、氧氟沙星等各类抗生素的耐药情况, 结合多种数据处理分析手段, 可进一步验证细菌拉曼光谱信号的变化情况与抗生素对于细菌抗菌机制的相关性。

### REFERENCES

- [1] Kneipp K, Kneipp H, Kneipp J. Surface-enhanced Raman scattering in local optical fields of silver and gold nanoaggregates-from single-molecule Raman spectroscopy to ultrasensitive probing in live cells[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2006, 39(7): 443-450
- [2] Lane LA, Qian XM, Nie SM. SERS nanoparticles in medicine: from label-free detection to spectroscopic tagging[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(19): 10489-10529
- [3] Guerrini L, Krpetić Ž, van Lierop D, Alvarez-Puebla RA, Graham D. Direct surface-enhanced Raman scattering analysis of DNA duplexes[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2015, 54(4): 1144-1148
- [4] Patolsky F, Zheng GF, Lieber CM. Fabrication of silicon nanowire devices for ultrasensitive, label-free, real-time detection of biological and chemical species[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(4): 1711-1724
- [5] Pushkarsky MB, Dunayevskiy IG, Prasanna M, Tsekoun AG, Go R, Patel CKN. High-sensitivity detection of TNT[J]. *PNAS*, 2006, 103(52): 19630-19634
- [6] Xu NF, Xu LG, Ma W, Liu LQ, Kuang H, Xu CL. An ultrasensitive immunochromatographic assay for non-pretreatment monitoring of chloramphenicol in raw milk[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2015, 26(5): 635-644
- [7] Upadhyayula VKK. Functionalized gold nanoparticle

- supported sensory mechanisms applied in detection of chemical and biological threat agents: a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 715: 1-18
- [8] Willets KA, Van Duyne RP. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing[J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2007, 58: 267-297
- [9] Hu JQ, Chen Q, Xie ZX, Han GB, Wang RH, Ren B, Zhang Y, Yang ZL, Tian ZQ. A simple and effective route for the synthesis of crystalline silver nanorods and nanowires[J]. *Advanced Functional Materials*, 2004, 14(2): 183-189
- [10] Xie XH, Pu HB, Sun DW. Recent advances in nanofabrication techniques for SERS substrates and their applications in food safety analysis[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, 58(16): 2800-2813
- [11] Wan Y, Guo ZR, Jiang XL, Fang K, Lu X, Zhang Y, Gu N. Quasi-spherical silver nanoparticles: aqueous synthesis and size control by the seed-mediated Lee-Meisel method[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2013, 394: 263-268
- [12] Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ. Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio[J]. *Chemical Communications*, 2001(7): 617-618
- [13] Jarvis RM, Goodacre R. Discrimination of bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(1): 40-47
- [14] Athamneh AIM, Alajlouni RA, Wallace RS, Seleem MN, Senger RS. Phenotypic profiling of antibiotic response signatures in *Escherichia coli* using Raman spectroscopy[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(3): 1302-1314
- [15] Jarvis RM, Goodacre R. Characterisation and identification of bacteria using SERS[J]. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37(5): 931-936
- [16] Kahraman M, Zamaleeva AI, Fakhrullin RF, Culha M. Layer-by-layer coating of bacteria with noble metal nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 395(8): 2559-2567
- [17] Prucek R, Ranc V, Kvítek L, Panáček A, Zbořil R, Kolář M. Reproducible discrimination between Gram-positive and Gram-negative bacteria using surface enhanced Raman spectroscopy with infrared excitation[J]. *The Analyst*, 2012, 137(12): 2866-2870
- [18] Sundaram J, Park B, Hinton A, Lawrence KC, Kwon Y. Detection and differentiation of *Salmonella* serotypes using surface enhanced Raman scattering (SERS) technique[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2013, 7(1): 1-12
- [19] Walter A, März A, Schumacher W, Rösch P, Popp J. Towards a fast, high specific and reliable discrimination of bacteria on strain level by means of SERS in a microfluidic device[J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(6): 1013-1021
- [20] Wang YQ, Yan B, Chen LX. SERS tags: novel optical nanoprobe for bioanalysis[J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(3): 1391-1428
- [21] Craig AP, Franca AS, Irudayaraj J. Surface-enhanced Raman spectroscopy applied to food safety[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2013, 4: 369-380
- [22] Pang S, Labuza TP, He LL. Development of a single aptamer-based surface enhanced Raman scattering method for rapid detection of multiple pesticides[J]. *The Analyst*, 2014, 139(8): 1895-1901
- [23] Bantz KC, Meyer AF, Wittenberg NJ, Im H, Kurtuluş O, Lee SH, Lindquist NC, Oh SH, Haynes CL. Recent progress in SERS biosensing[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2011, 13(24): 11551-11567
- [24] Zheng JK, He LL. Surface-enhanced Raman spectroscopy for the chemical analysis of food[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, 13(3): 317-328
- [25] Li MX, Yang H, Li SQ, Zhao K, Li JG, Jiang DN, Sun LL, Deng AP. Ultrasensitive and quantitative detection of a new  $\beta$ -agonist phenylethanolamine A by a novel immunochromatographic assay based on surface-enhanced Raman scattering (SERS)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(45): 10896-10902
- [26] Li JM, Liu JY, Yang Y, Qin D. Bifunctional Ag@Pd-Ag nanocubes for highly sensitive monitoring of catalytic reactions by surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(22): 7039-7042
- [27] Duan N, Shen MF, Wu SJ, Zhao CX, Ma XY, Wang ZP. Graphene oxide wrapped Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au nanostructures as substrates for aptamer-based detection of *Vibrio parahaemolyticus* by surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Microchimica Acta*, 2017, 184(8): 2653-2660
- [28] Xu LJ, Lei ZC, Li JX, Zong C, Yang CJ, Ren B. Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy detection of DNA with single-base sensitivity[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(15): 5149-5154