

傅立叶变换红外光谱技术对两株大肠杆菌的鉴别

王静^{1,2} 杨丽君^{1,3*} 李兆杰² 刘玉敏² 时文春² 崔凤杰² 宋晓华² 丛伟红²

(1. 山东大学 威海分校 山东 威海 264209)

(2. 威海出入境检验检疫局 山东 威海 264205)

(3. 烟台出入境检验检疫局 山东 烟台 264200)

摘要:【目的】应用傅立叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)技术对两株不同来源的大肠杆菌进行鉴别。【方法】用 FT-IR 技术对两株不同来源的大肠杆菌进行指纹图谱数据采集,用化学计量学分析方法对光谱进行分析。【结果】建立了基于主成分分析(Principal component analysis, PCA)和分级聚类分析(Hierarchical cluster analysis, HCA)两种聚类分析模型,均可将两株大肠杆菌进行成功区分。【结论】傅立叶变换红外光谱分析方法简便、快速、易操作,结果重现性好,可用于区分不同来源的同种细菌。

关键词: 傅立叶变换红外光谱, 大肠杆菌, 株, 鉴别

Differentiation of two strains of *Escherichia coli* by FT-IR spectroscopy

WANG Jing^{1,2} YANG Li-Ju^{1,3*} LI Zhao-Jie² LIU Yu-Min² SHI Wen-Chun²
CUI Feng-Jie² SONG Xiao-Hua² CONG Wei-Hong²

(1. Shandong University at Weihai, Weihai, Shandong 264209, China)

(2. Weihai Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Weihai, Shandong 264205, China)

(3. Yantai Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai, Shandong 264200, China)

Abstract: [Objective] To differentiate two strains of *Escherichia coli* from different sources

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科研项目(No. 2010IK151, 2012IK179)

*通讯作者: Tel: 86-631-5900158-6410; 18663136117@163.com

收稿日期: 2012-03-03; 接受日期: 2012-06-20

by fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). [Methods] FT-IR fingerprint absorption spectra of two strains of *E. coli* from different sources were collected and analyzed by chemometric methods. [Results] Two cluster models of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were established and could differentiate well the two strains of *E. coli*. [Conclusion] As a rapid, easy-to-use and accurate technique, FT-IR spectroscopy can be used to differentiate microorganisms at the strain level from different sources.

Keywords: Fourier transform infrared spectroscopy, *Escherichia coli*, Strain, Differentiation

傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)技术用于微生物学研究最早可追溯到 20 世纪 50 年代^[1-2]。但直到 1988 年 Naumann 等^[3]才将此技术作为一种有效的工具用于鉴定不同的微生物。1991 年,他在 Nature 杂志^[4]中指出 FT-IR 技术可以对微生物进行判别、分类和鉴定。此后,随着红外光谱技术、计算机技术、化学计量学等的发展,FT-IR 技术在微生物分类、鉴定中的应用越来越广泛,越来越深入。

傅立叶变换红外光谱是指对干涉后的红外光谱进行傅里叶变换而得到的光谱。FT-IR 技术通过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的化学键的振动情况,提供整个微生物菌体生化组成成分的光谱定量信息^[5]。以微生物菌体分子基团特征的 FT-IR 指纹图谱为基础,实现对微生物的分类、鉴定^[4,6-9]。与传统微生物分类鉴定方法相比,FT-IR 技术的优势在于:(1) 缩短鉴定时间。FT-IR 技术以目标细菌的单克隆培养物为光谱采集对象,在几分钟或十几分钟内即可给出结果,无需进行大量费时繁琐的生化试验,较传统生化方法至少节省几天甚至十几天的时间。(2) 操作简单,适应范围广。FT-IR 技术样品制备非常简单,只需将细菌培养物离心洗涤后置于窗片即可读取数据。方法适应于所有可培养的微生物。(3) 节约成本。FT-IR 技术可大大节约传统生化方法中的试剂耗

材成本。(4) 分辨率高。FT-IR 技术以微生物菌体的分子基团特征的振动吸收谱带为判定依据,能敏锐地探测分子基团及其周围环境的变化,整个判定过程完全靠仪器和化学计量学运算,排除了主观误判的可能性,因此分辨率和精确度较传统生化方法都有大大提高。

目前,关于 FT-IR 技术用于微生物分类鉴定的报道越来越多^[10-13]。在分类水平上,FT-IR 技术可实现微生物在属或种,甚至亚种水平上的分类。Wenning M.等^[14]应用 FT-IR 技术在属和种水平上对乳酸菌进行了分类。Rebuffo-Scheer 等^[15]对放线菌在种和亚种水平进行了分类。Davis R.等^[16]对李斯特杆菌在亚种和不同血清型水平上进行了区分。目前大部分的研究对象为细菌、酵母菌、真菌和藻类。不同微生物在光谱上的差别无法用肉眼分辨,需要运用统计学处理方法,并结合不同的化学计量学方法。本研究以两株不同来源的大肠杆菌为研究对象,应用 FT-IR 技术采集指纹图谱,结合化学计量学运算,旨在捕捉两株菌在光谱上的细微差别,探讨 FT-IR 技术对两株不同株型(Strain)大肠杆菌鉴别情况,为 FT-IR 技术对细菌的鉴别能力提供更多实验证明。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种: 大肠杆菌 44102 和 44113 均来自作者单位菌种库,从-70 °C 接种到营养肉汤中,37 °C

培养 18–24 h, 备用。

两株菌在大肠杆菌选择型平板 EMB 上的菌落特征有明显不同: 菌株 44102 的菌落特征为边缘欠整齐, 直径 2 mm–3 mm, 菌落扁平, 具黑色中心, 外周有金属光泽但不够明亮; 菌株 44113 的菌落特征为圆形光滑, 直径 1 mm–2 mm, 菌落扁平, 边缘整齐, 菌落具有黑色中心, 外周有明亮的金属光泽。44102 较 44113 相比, 菌落稍大, 金属光泽区域更大, 但不够明亮, 可能是由两株菌的某种代谢物质不同所致。但生化特征“IMViC (靛基质、甲基红、VP 试验、柠檬酸盐)”均为“+、+、-、-”, 为典型大肠杆菌。

1.1.2 试剂: 超纯水, Millipore 仪器 Milli Q 生产, 电阻 18.2 M Ω ; 0.9%生理盐水; 无水乙醇, 分析纯级别; 伊红美兰平板(EMB), 营养肉汤, 购自北京陆桥生物科技有限公司, 按说明书配置。

1.2 设备与材料

ZnSe 窗片, 透过波长是 7 800–440 cm^{-1} , 透过率大于 68%, 直径 25 mm, 厚度 2 mm; 核酸蛋白分析仪, Bio-Rad 公司; CR22G III 离心机, 日本日立公司; 36 $^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温恒湿培养箱和 45 $^{\circ}\text{C}$ 干燥箱, 3M 公司; VERTEX 70 型傅立叶变换红外光谱仪, 德国布鲁克公司。

1.3 方法

1.3.1 FT-IR 技术对两株大肠杆菌的分类鉴定:

(1) 样品制备

用无菌接种环挑取两株大肠杆菌 44102 和 44113 活化肉汤培养物各一环, 分别划线接种于 EMB 平板, 36 $^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18–24 h 后, 用无菌接种环从 EMB 平板上挑取大肠杆菌典型菌落, 接种于盛有 15 mL 营养肉汤的大试管中, 36 $^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18–24 h, 用核酸蛋白分析仪测定并记录菌液浓度。

吸取 44102 和 44113 肉汤培养物各 1 mL 于 1.5 mL 离心管中, 5 000 \times g 离心 5 min, 吸弃上清,

加入 1 mL 无菌生理盐水悬浮洗涤, 5 000 \times g 离心 5 min, 再加入 1 mL 超纯水悬浮洗涤, 5 000 \times g 离心 5 min, 超纯水重复洗涤 2 次。最后用 50 μL 纯水悬浮混匀, 用微量移液器分别吸取 10 μL 细菌悬液于 ZnSe 窗片中心位置, 45 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至无水分的干燥菌斑。

(2) 光谱采集

将载有样品的 ZnSe 窗片置于 VERTEX70 型傅立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 CO_2 的吸收光谱干扰)。实验参数为: 波段范围 4 000–600 cm^{-1} [17–20], 光谱分辨率 4 cm^{-1} , 64 次光谱累计求平均 [17]。

(3) 光谱处理及数据分析

每种菌至少做 10 次试验, 每次做 3 个重复, 取平均。

利用 OPUS 6.5 软件(VERTEX70 自带的扫描分析软件), 对光谱依次进行如下处理: 透过率-吸光度转化、基线校正(消除基线漂移)、矢量归一化。最后将处理后的光谱数据转化为 DPT 数据点格式, 进而转化为 Excel 数据格式。

将上述处理后的各菌 1 100–1 490 cm^{-1} 波数范围光谱数据分别导入 Matlab 6.5 和 Statistica 6.0 软件, 分别进行主成分分析(Principal component analysis, PCA)和分级聚类分析(Hierarchical cluster analysis, HCA), 得到 *E. coli* 44102 和 44113 两种菌光谱的主成分聚类分布图和树状聚类分布图。

2 结果

2.1 细菌浓度

两株 *E. coli* 的 OD_{600} 及浓度见表 1。36 $^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 静置培养 18–24 h 后, 两种菌的浓度基本一致。

2.2 光谱采集

对采集并处理后的两株菌的光谱取平均, 得

表 1 细菌 OD_{600} 和浓度
Table 1 OD_{600} and concentration of *E. coli* 44102 and 44113

Bacteria	OD_{600}	Concentration (CFU/mL)
<i>E. coli</i> 44102	0.86	4.3×10^8
<i>E. coli</i> 44113	0.81	4.1×10^8

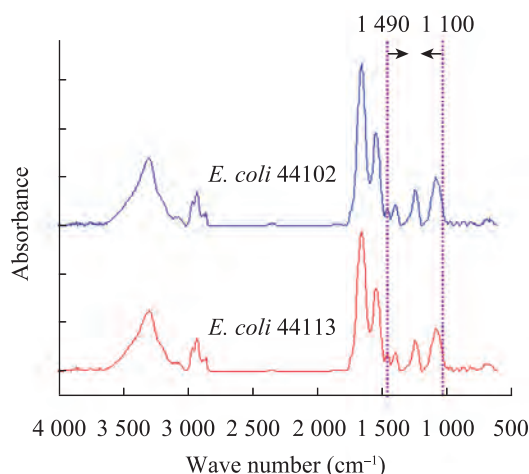


图 1 *E. coli* 44102 和 44113 平均光谱

Fig. 1 Average FT-IR spectra of *E. coli* 44102 and 44113

到各菌的平均光谱, 见图 1。光谱经基线校正、矢量归一化后, 光谱间的差异仍然难以用肉眼区分。

2.3 数据分析

2.3.1 主成分分析(PCA): 对 *E. coli* 44102 和 44113 两株菌的光谱数据进行 PCA 分析, 分别以主成分 1 (PC1)和主成分 2 (PC2)作为聚类依据, 以主成分 2 (PC2)和主成分 3 (PC3)作为聚类依据, 得到两种主成分聚类分布图, 见图 2。由图 2 可知, 两种 PCA 分析方法均可以将两株 *E. coli* 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 72.2%、10.7%和 6.1%, 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“PC1+PC2”和“PC2+PC3”建立的两种聚类分析模型是具有代表性的, 3 个主成分 PC1、PC2、PC3 权重见图 3, 权重较大的波段

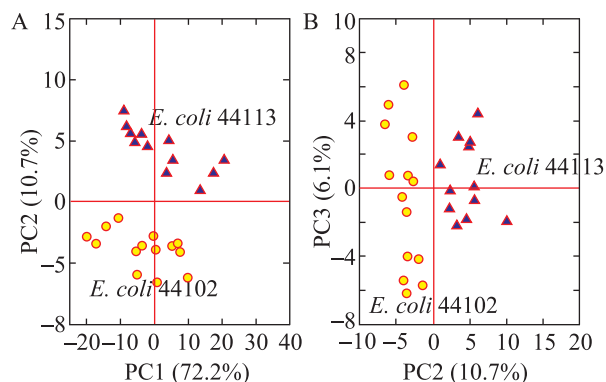


图 2 *E. coli* 44102 和 44113 PCA 聚类分布图

Fig. 2 PCA cluster results of FT-IR spectra of *E. coli* 44102 and 44113

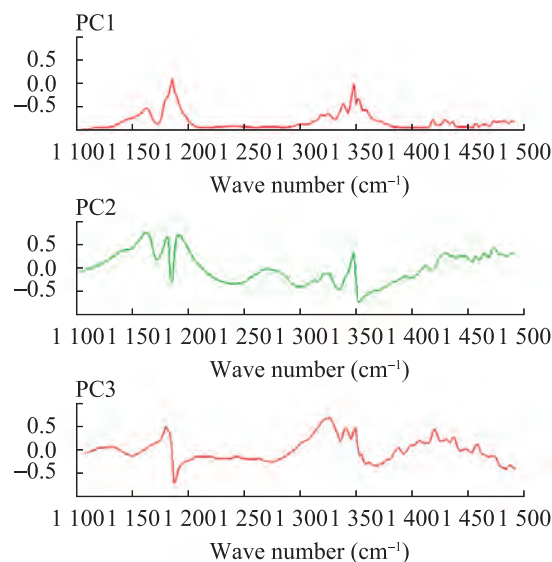


图 3 PC1、PC2 和 PC3 权重图

Fig. 3 Loading plot of PC1, PC2 and PC3 obtained from PCA analysis of FT-IR spectra of *E. coli* 44102 and 44113

对定量分析模型的贡献也较大。

2.3.2 分级聚类分析(HCA): 对 *E. coli* 44102 和 44113 两种菌的光谱数据进行 HCA 分析, 利用皮尔森积矩相关系数(Ward's method, Pearson r), 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 分析可以将两株 *E. coli* 进行较好聚类。

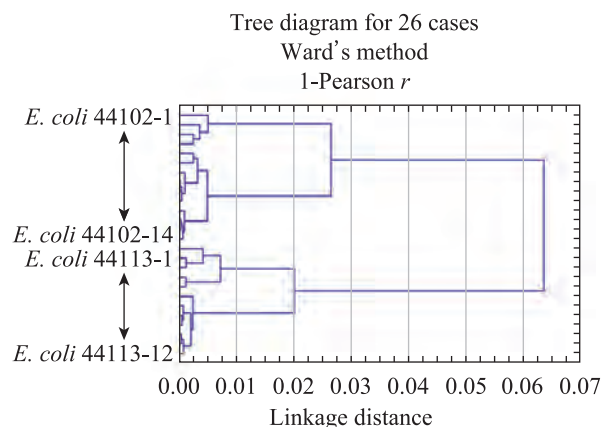


图4 *E. coli* 44102 和 44113 HCA 聚类树状图

Fig. 4 HCA cluster results of FT-IR spectra of *E. coli* 44102 and 44113

3 讨论

分子中的原子处于不断的振动当中, 振动频率落在红外线频率范围之内($300\text{--}4\,000\text{ cm}^{-1}$)。振动的模式由分子中原子的数量和化学键构成所决定。对于多原子分子, 由于多个化学键的存在, 存在多个振动模式, 因此在红外吸收光谱上将出现多个红外吸收频带。对于不同原子组成的分子或是含有不同分子组成的有机体, 其化学键的振动模式就会有差别, 在红外吸收光谱上的吸收频带就会有差异。FT-IR 技术通过读取微生物所有组成成分的化学键的振动情况, 提供整个微生物菌体生化组成成分的光谱定量信息。以微生物菌体分子基团特征的 FT-IR 指纹图谱为基础, 实现对微生物的分类、鉴定。因此, 理论上, 只要微生物间组成成分存在差别, 并且这种差别被 FT-IR 技术识别到, 微生物就能被较好区分。

3.1 光谱采集和光谱处理

细菌的 FT-IR 光谱具有很强的指纹特征, 细菌菌体间的细微差别可能就会被光谱捕捉到, 通过合适的化学计量学运算便可将其进行较好分类。细菌特征指纹图谱区域包含在 $4\,000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ 波数范围内^[17-20], 不同细菌所对应的特征指纹图

谱区域不同。因此在对细菌进行鉴别时, 寻找能区分细菌的特征指纹图谱区域至关重要。目前常用于区分微生物的指纹图谱区域主要有 $1\,200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ (多糖吸收区域)、 $1\,500\text{--}1\,200\text{ cm}^{-1}$ (混合吸收区域, 包括蛋白质、脂肪酸、磷酸化合物等)、 $1\,800\text{--}1\,500\text{ cm}^{-1}$ (蛋白质和肽段的酰胺吸收区域)^[17,21]。本研究首先采集两株 *E. coli* $4\,000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ 波数红外光谱, 经过反复试验, 最终选择 $1\,100\text{--}1\,490\text{ cm}^{-1}$ 波数范围光谱用于区分两株 *E. coli*, 数据分析证明此范围光谱能成功区分两株 *E. coli*。

光谱的预处理对于细菌的成功区分也非常重要。基线校正可以消除基线漂移的影响; 归一化处理可以消除样品量不同带来的光谱差异, 一般按最强吸收带(酰胺 I 带, $1\,640\text{ cm}^{-1}$)进行归一化处理, 或者在给定光谱区域里归一化至相同程度; 求一阶、二阶导数光谱, 以减少基线变异, 增强分辨率^[22]。对于原始光谱, 一般都需要进行基线校正和归一化处理, 而求导数处理在区分亲缘关系较近的细菌时往往能得到较好结果。本研究对光谱进行基线校正和矢量归一化处理后, 便可通过化学计量学分析实现对两株 *E. coli* 的成功区分。

3.2 数据分析

不同来源的同种细菌称为不同株型(Strain), 其细菌典型的生物学特征相同, 但可能因为生长环境不同, 致使某些代谢物质发生变化。*E. coli* 44102 和 44113 均具备典型 *E. coli* 生化反应特征, 但其菌落特征却不同, 很可能是两株菌的某种代谢物质不同所致。传统生化方法难以区分两株 *E. coli*, 而 FT-IR 技术很可能就会捕捉到这种差别, 作为对其分类的重要依据。这充分显示出了 FT-IR 在微生物鉴别中的巨大优势。但是, 鉴于 FT-IR 技术区分微生物的原理及其高灵敏性, 一些影响微生物生长代谢的因素均可能会影响 FT-IR 对其的鉴别结果, 如培养时间、营养状况、

培养基 pH、培养温度等;另外,样品的前处理也可能会对结果产生较大影响。因此,微生物生长条件的标准化及规范统一的样品前处理是 FT-IR 技术成功区分微生物的关键。

本研究采用 PCA 和 HCA 两种无监督型统计方法对 *E. coli* 44102 和 44113 两株菌光谱进行分析。PCA 可以在不降低光谱差异的前提下,减少数据维数^[22]。本研究分别以 PC1 和 PC2、PC2 和 PC3 为 PCA 分析依据,均能实现对两株 *E. coli* 的分类(图 2)。PCA 分析中的 Loading plot 可以突出光谱中每个变量(波数)对于每个主成分的贡献。如图 2 和图 3 所示,在 1 100–1 490 cm^{-1} 波数范围内,PC1 和 PC2 占有光谱总变异性的百分比为 82.9% (72.2%和 10.7%),PC2 和 PC3 占光谱总变异性的百分比为 16.8% (10.7%和 6.1%),说明在 1 100–1 490 cm^{-1} 波数范围内光谱的变量为反映总的光谱变量的主要因素。然而主成分往往有多种,因此在 PCA 分析时,主成分的选择和组合对于成功进行分类鉴定非常重要。

在无监督型法中,最为常用的是 HCA,通常用来估计光谱之间的相似性,选择合适算法并描绘树状分支图对微生物进行判定。HCA 用光谱间的距离作为判定依据,光谱间的距离可反映细菌亲缘关系的远近,因此 HCA 可以实现对细菌和真菌、不同种属、革兰氏阴性和阳性菌等不同分类范围微生物的鉴别^[15,17,21]。常用的距离为皮尔森积矩系数和欧式距离。本研究利用皮尔森积矩系数成功实现了两株 *E. coli* 的区分(图 4)。

由此可见,应用傅立叶变换红外光谱技术可以对两株不同来源的 *E. coli* 在光谱上的细微差别进行有效鉴别,而光谱的细微差别反映出两株细菌在成分上的细微不同。这为 FT-IR 技术用于细菌在株(Strain)水平上的鉴别能力提供了有力证据,也说明 FT-IR 技术结合化学计量学运算在细菌鉴别中的巨大优势,将成为细菌分类鉴定的一

个重要工具。

参 考 文 献

- [1] Greensteet JE, Norris KP. The existence of differences between the infrared absorption spectra of bacteria[J]. *Spectrochimica Acta*, 1957(9): 177–182.
- [2] Goulden JDS, Sharpe ME. The infrared absorption spectra of *lactobacilli*[J]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1958(19): 76–86.
- [3] Naumann D, Fijala V, Labischinski H, et al. The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using fourier transform infrared spectroscopic and multivariate statistical analysis[J]. *Journal of Molecular Structure*, 1988(174): 165–170.
- [4] Naumanan D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterization by FT-IR spectroscopy[J]. *Nature*, 1991, 351(6321): 81–82.
- [5] Naumann, D. Some ultrastructural information on intact, living bacterial cells and related cell-wall fragments as given by FTIR[J]. *Infrared Physics and Technology*, 1984, 24: 233–238.
- [6] Helm D, Labischinski H, Schallehn G, et al. Classification and identification of bacteria by fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1991, 137(1): 69–79.
- [7] 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]. *Journal of Microbiological Methods*, 1991, 14(2): 127–142.
- [8] Horbach I, Naumann D, Fehrenbach FJ. Simultaneous infections with different serogroups of *Legionella pneumophila* investigated by routine methods and fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1988, 26(6): 1106–1110.
- [9] Kirschner C, Maquelin K, Pina P, et al. Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(5): 1763–1770.

- [10] Wortberg F, Nardy E, Contzen M, et al. Identification of *Yersinia ruckeri* from diseased salmonid fish by fourier transform infrared spectroscopy[J]. Journal of Fish Diseases, 2012, 35(1): 1–10.
- [11] Brandes Ammann A, Brandl H. Detection and differentiation of bacterial spores in a mineral matrix by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and chemometrical data treatment[J]. BMC Biophysics, 2011, 4: 4–14.
- [12] Ergin C, Vuran ME, Gök Y, et al. Evaluation of *Malassezia* species by fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy[J]. Mikrobiyoloji Bulteni, 2011, 45(4): 707–715.
- [13] Santos C, Fraga ME, Kozakiewicz Z, et al. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts[J]. Research in Microbiology, 2010, 161: 168–175.
- [14] Wenning M, Büchl NR, Scherer S. Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks[J]. Biophotonics, 2010, 3(8/9): 493–505.
- [15] Rebuffo-Scheer CA, Kirschner C, Staemmler M, et al. Rapid species and strain differentiation of non-tuberculous mycobacteria by fourier transform Infrared microspectroscopy[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 68(2): 282–290.
- [16] Davis R, Mauer LJ. Subtyping of *Listeria monocytogenes* at the haplotype level by fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and multivariate statistical analysis[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 150(2/3): 140–149.
- [17] Dziuba B, Babuchowski A, Nalecz D, et al. Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis[J]. International Dairy Journal, 2007, 17(3): 183–189.
- [18] Amiali NM, Mulvey MR, Sedman J, et al. Epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by fourier transform infrared spectroscopy[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 69(1): 146–153.
- [19] Al-Qadiri HM, Lin M, Cavinato AG, et al. Fourier transform infrared spectroscopy, detection and identification of *Escherichia coli* O157: H7 and *Alicyclobacillus* strains in apple juice[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 111(1): 73–80.
- [20] Orsini F, Ami D, Villa A, et al. FT-IR microspectroscopy for microbiological studies[J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 42(1): 17–27.
- [21] Beekes M, Lasch P, Naumann D. Analytical applications of fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research[J]. Veterinary Microbiology, 2007, 123(4): 305–319.
- [22] 蔡飞, 陆峰. 傅立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]. 药学实践杂志, 2002, 20(4): 238–240.