

制糖企业空气细菌的拉曼光谱分析

Raman spectroscopic analysis of bacteria from air of sugar mill

黎海红 李明 黄世文

LI Hai-hong LI Ming HUANG Shi-wen

广西壮族自治区职业病防治研究院职业卫生评价所 广西 南宁 530021

摘要 :目的 了解糖厂空气微生物的分布特点和多样性程度 ,探索新的空气微生物检测方法。方法 采集分离自糖厂甘蔗喂料口、甘蔗渣堆场等作业岗位的 12 个细菌菌株的单细胞拉曼光谱 ,并应用化学计量学进行分析。结果 糖厂车间空气富含各种细菌 ,从源自吡啶二羧酸钙的 1 017/cm 峰或成对出现的源自类胡萝卜素的特征基团的 1 155~1 160/cm 和 1 520~1 529/cm 峰 ,可以快速判断空气细菌中含有产芽孢细菌和产类胡萝卜素细菌 ;主成分分析可以将不同菌株归类为不同的类群 ,即使在不同的培养条件下 ,依然可以得到相似的结果 ;单细胞分析显示 ,多数菌株的细胞信号较弱而且细胞间相对均一 ,但部分菌株的信号极强且胞内物质含量极不均匀 ,显示出极大的异质性。结论 单细胞拉曼光谱可以用于检测空气细菌 ,依据特征拉曼峰可以快速判别细菌类型 ,对于含有特殊光谱的细菌极易检出 ,但在缺少大型数据库和参照菌株下 ,难以直接鉴别菌株的分类地位或者是否属于病原菌。

关键词 拉曼光谱 ;单细胞分析 ;空气细菌 ;制糖企业

中国图书资料分类号 R117

文献标识码 A

文章编号 :1004-1257(2018)18-2507-06

DOI:10.13329/j.cnki.zyyjk.2018.0702

Raman spectroscopic analysis of bacteria from air of sugar mill

LI Hai-hong, LI Ming, HUANG Shi-wen

Occupational Health Evaluation Institute, Guangxi Zhuang Autonomous Region Institute for Prevention and Treatment of Occupational Diseases, Nanning Guangxi, 530021, China

Abstract [Objective] To clarify the distribution characteristics and diversity of airborne microorganisms in the workshop of sugar mill, and explore novel methods for detecting airborne microbes. **[Methods]** Raman spectroscopy was used to characterize the bacteria from the workshop of crushing plant and bagasse yard, and chemometrics was employed to analyse the spectra of single bacterial cells. **[Results]** The air of these workshops was rich in bacteria. Spore bacteria and carotenoid bacteria could be distinguished quickly from the typical 1 017/cm peak which derived from dipicolinic acid of bacterial spore, or the paired peaks of 1 155-1 160/cm and 1 520-1 529/cm of carotenoid. Combining with principal component analysis, different strains could be classified as different groups. Even the strains were cultured with different culture conditions, similar results could be obtained. Single-cell analysis showed that the Raman signals of most strains were weak and cells were relatively homogeneous, but some strains had very strong signals and showed highly heterogeneous intracellular substances. **[Conclusion]** The bacteria can be characterized by single cell Raman spectroscopy, and special types of bacteria can be identified quickly based on the characteristic Raman bands derived from the specific components of cells. However, it is difficult to directly identify the taxonomic status of strains or whether they belong to pathogenic bacteria in the absence of large databases and reference strains.

Key words: Raman spectroscopy; Single-cell analysis; Airborne bacteria; Sugar mill

相对于传统的生物研究方法,拉曼光谱是一种实时、无损、快捷和灵敏的分析手段,在研究含水活细胞或者完整的生物材料时具有实时、快速、无损分析的独特优势。单个细胞的拉曼光谱包含了核酸、蛋白质、多糖和脂类物质等反映细胞固有特性的信息,是细胞基

因型、表型和生理状态的表现,在生物学、医学领域的应用日益广泛和深入^[1-5]。在微生物单细胞分析领域,也进行了一系列探索性研究,包括物种鉴定、判别^[6-7],细胞生理机能及代谢分析^[8-10]。因此,本文将拉曼光谱应用于制糖企业空气细菌的研究,应用单细胞拉曼光谱分析来自制糖企业空气的 12 个细菌菌株,以期了解糖厂空气微生物的分布特点和多样性程度,探索新的空

基金项目 广西医疗卫生适宜技术开发与推广应用项目(S2016073)

作者简介 黎海红,女,主任医师,主要从事职业卫生工作。

气微生物检测方法。

1 材料与方法

1.1 菌株分离与培养 2017年2—4月,选择有代表性的3家制糖企业进行作业场所空气中微生物检测。微生物检测方法参考GB/T 18204.3-2013《公共场所卫生检测方法第3部分:空气微生物》^[11]中的自然沉降法。在1个工作日内不同时间采样,每个作业点采样3次。每个采样点设置1个对照(不打开培养基上盖,检查培养基本身是否无菌)。对LB(酵母蛋白胨)细菌培养基平皿培养3天,倒置于37℃的培养箱中。每天观察1次,记录菌落数量、形态、颜色等数据。对LB菌落分纯物进行镜检,确定个体形态和革兰氏染色。

随机选择涂板分离的12个菌株,经LB平板活化培养24h后,挑取单菌落,①转入新的LB平板继续培养72h,或②接入50ml LB液体培养基,200 rpm/min振荡培养过夜,以2%接种量转入新的LB液体培养基,200 rpm/min振荡培养36~48h。上述培养过程均为30℃。

1.2 实验系统及光谱数据采集

1.2.1 光谱系统 本研究采用的单细胞拉曼光谱系统和文献[1-3]基本相同,由广西科学院生物物理与环境科学研究中心搭建。采用Tiger激光器(德国Saccher Lasertechnik公司)产生功率为100 mW左右的激光,导入TE2000U倒置显微镜(日本Nikon公司),俘获并激发单个细胞的拉曼散射信号,散射信号经聚焦后导入LS785光谱仪(美国Acton公司),光谱信号成像于-70℃风冷的PIXIS 400BR电荷耦合器件(美国普林斯顿仪器公司)上。

1.2.2 光谱数据采集 取固体平板培养72h的单菌落或者液体振荡培养36h的培养物用无菌水洗2次,经5 000倍稀释,吸取300 μl置于检测样品槽中,用倒置显微镜100倍油镜随机寻找目标细胞,用光镊俘获并提升至石英片上方10 μm左右。采集拉曼光谱时,激光在聚焦点的功率调整为30 mW左右,信号累积时间为45 s,每个实验样品收集50个左右细胞的拉曼光谱,并在细胞附近以相同条件收集3~5个背景拉曼光谱。

1.3 数据处理 将实验采集到的光谱数据转成ASCII格式,进行扣除背景和响应曲线的校正,其算法为 $S_{act}(v)=[S_{acq}(v)-S_{bg}(v)]/R(v)$ [其中 $S_{act}(v)$ 为样品的实际光谱, $S_{acq}(v)$ 为带背景的光谱, $S_{bg}(v)$ 为背景光谱, $R(v)$ 为实验系统的响应曲线]接着采用MATLAB编写的程序对数据进行平滑去噪,绘图处理均在软件Origin 8.5中进行。采用软件The Unscrambler 9.7做主成分分析。

2 结果

2.1 单个细菌的拉曼光谱分析 对3个糖厂的甘蔗堆场、甘蔗落料口、压榨机分别进行采样,获得54个样品,共分离到细菌菌株约200株,随机选择12个菌株进行拉曼光谱分析。振荡培养的12株菌的单个细胞的平均拉曼光谱,其中4-5、2-3和3-6菌株的光谱信号仅是实际测量值的25%或者50%,显示这几个菌株的细胞光谱显著强于其他菌株。在4-5、3-6和1-1菌株中,有2个不同于其他菌株的峰,分别位于1 155~1 157/cm和1 520~1 529/cm,且是成对出现。除此之外其他菌株的平均光谱基本类似,是否属于不同类别的细菌,通过主成分分析加以判别。见图1。

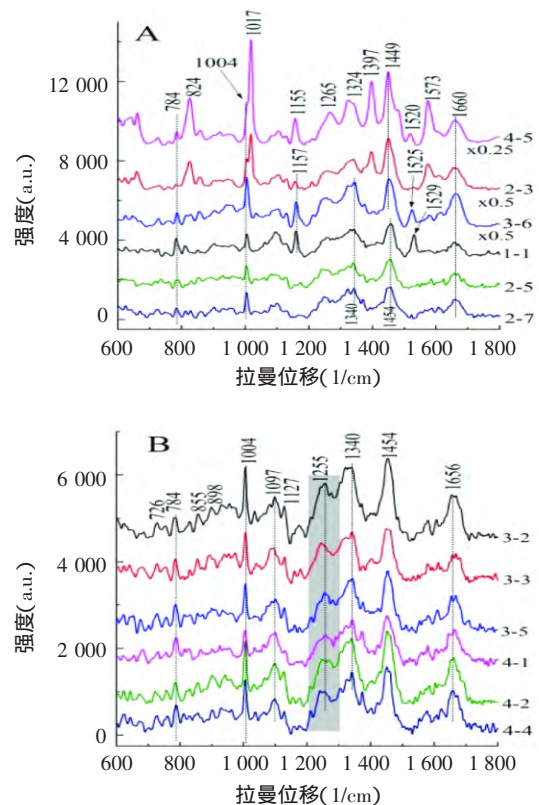
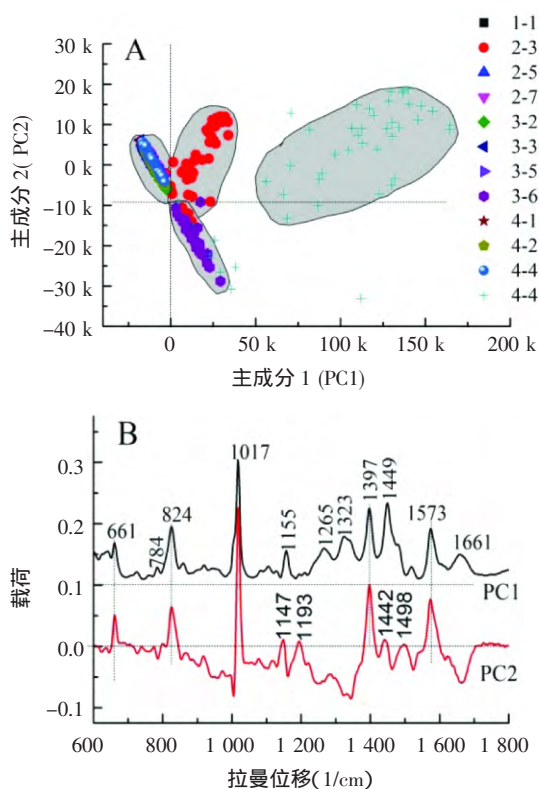


图1 12株菌的平均单细胞光谱

2.2 不同菌株的群体分析 主成分分析(PCA)是一种简化数据集的技术,既可以达到降维的目的,又保留了对方差贡献最大的特征,是常用的光谱特征信息的提取方法,在多元校正、多元分辨、模式识别等很多领域都得到了广泛应用。12株振荡培养的细菌同时进行主成份分析,12株菌分布于4个明显的区域,其中4-5菌株分布很广,多数处于主成分1(PC1)的正分值区域,少量细胞与3-6菌株重合,2-3菌株和3-6菌株则分别处于另2个区域,多数细胞在主成分2(PC2)分值上可以区分。考察影响PC1和PC2分值的载荷发现,影

响 PC1 分值的主要因素是来自芽孢 CaDPA 特征峰和蛋白质、核酸的拉曼峰,显示 4-5 菌株的信号极强且芽孢间的 CaDPA 含量极不均匀,细胞光谱分散在很大的区域,也有部分细胞尚未形成芽孢,而 2-3 菌株的信号较弱而且细胞间相对均一,影响 PC2 的峰与 CaDPA 特征峰有些相似。见图 2。



注:A—PC1-PC2分布 B—载荷

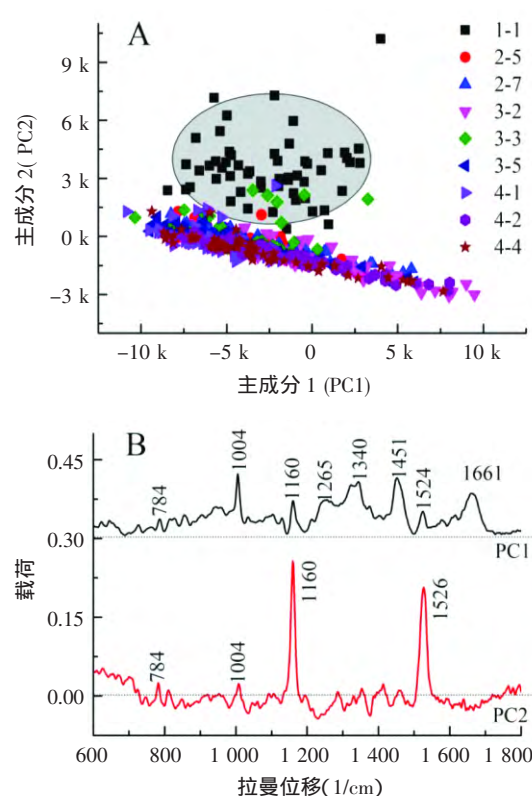
图2 12株菌的拉曼光谱主成分分析

当把 4-5、2-3 和 3-6 等菌株排除,余下的 9 个菌株做进一步的 PCA,发现 1-1 菌株的细胞在 PC2 分值可以区分,而影响 PC2 分值的主要拉曼峰是来自类胡萝卜素的 1 157/cm 和 1 525/cm 峰,显然 1-1 菌株是 1 个产类胡萝卜素的菌株。见图 3。

进一步把 1-1 菌株排除,余下的 8 个菌株的平均拉曼光谱基本类似,但进一步的 PCA 处理还是显示不同的类群,主要体现在 PC2 分值上,4-1 和 4-4 的细胞相对集中分布在正分值一侧,2-5、3-2 和 3-3 菌株的细胞相对集中分布在负分值一侧,而 2-7、3-5 和 4-2 则相对集中在中间位置。见图 4。

2.3 不同培养条件下的细胞光谱分析 对比了 3 个菌株分别在固体平板和液体振荡培养的细胞拉曼光谱,由于生长条件不同,光谱的整体强度和部分拉曼峰的强度有所不同,但差异光谱显示,胞内生物大分子的组成并没有明显的不同,见图 5。3-2、3-3 和 4-1 菌株在 2 种不同培养条件下的主成分分析见图 6,在固体培养

中 3-2 和 3-3 菌株分布在同一区域,而在液体培养中 3 个菌株分布于相对独立的空间,影响 PC1 和 PC2 分值的主要拉曼峰在两种培养条件下基本类似,见图 6 B、D,说明同一菌株在不同培养条件下胞内主要成分类似,虽然菌株 4-1 在固体培养中异质性大,在液体培养中相对均一,而 3-2 和 3-3 菌株刚好相反。

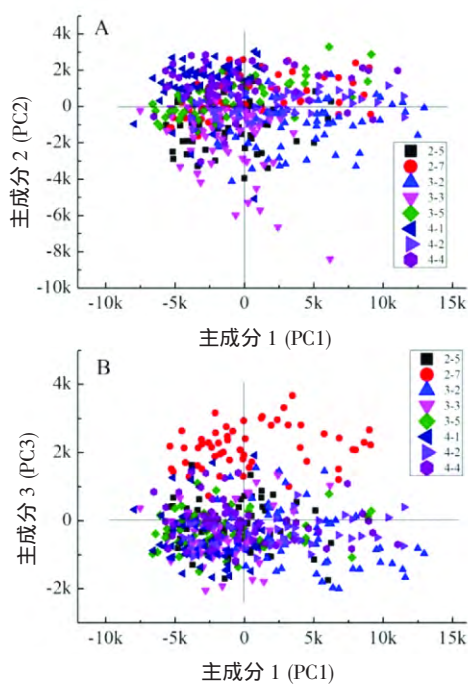


注:A—PC1-PC2分布 B—载荷

图3 9株菌拉曼光谱主成分分析

3 讨论

图 1 光谱基本上表征了细菌的主要成份,主要的拉曼峰来自胞内的几类生物大分子,其中 726、784 和 1 097/cm 峰源自胞内核酸物质,1 004/cm 源自蛋白质的苯丙氨酸,1 127/cm 来自糖类物质,1 200~1 280/cm 区域源自蛋白质的酰胺 III,1 454/cm 来自脂类和蛋白质的甲基基团,1 650~1 665/cm 来自蛋白质酰胺 I^[12]。菌株 4-5 和 2-3 还有 661、824、1 017、1 397 和 1 573/cm 等峰,这些峰是典型的 2,6-吡啶二羧酸钙(CaDPA)的特征峰^[13],是细菌芽孢特有的物质^[14],由此可以判断这 2 个菌株是芽孢细菌。此外,在 4-5、3-6 和 1-1 菌株中,有 2 个不同于其它菌株的峰,分别位于 1 155~1 157/cm 和 1 520~1 529/cm,且是成对出现,这是类胡萝卜素的特征峰,分别对应的是类胡萝卜素的=C=C=和-C=C=基团的伸展振动^[15],说明这 3 个菌株胞内含类胡萝卜素,但后一基团的峰分别位于 1 520、1 525 和 1 529/cm,显示这 3 个菌株所产类胡萝卜素并不相同^[16]。



注:A—PC1-PC2分布,B—载荷

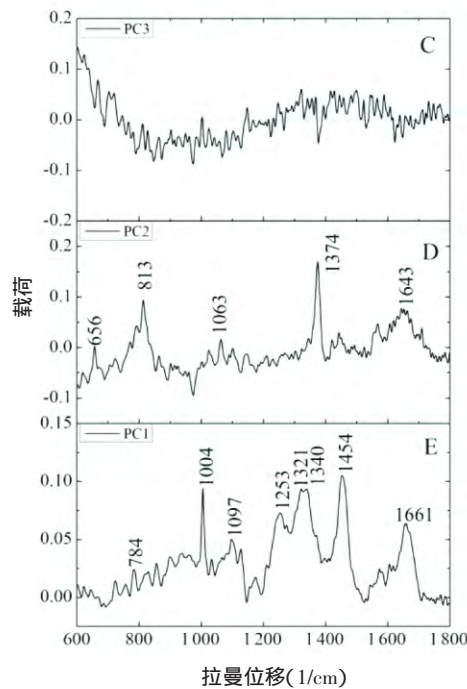


图4 8株菌拉曼光谱主成分分析

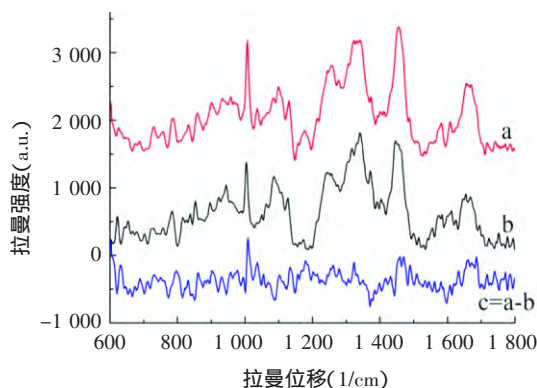


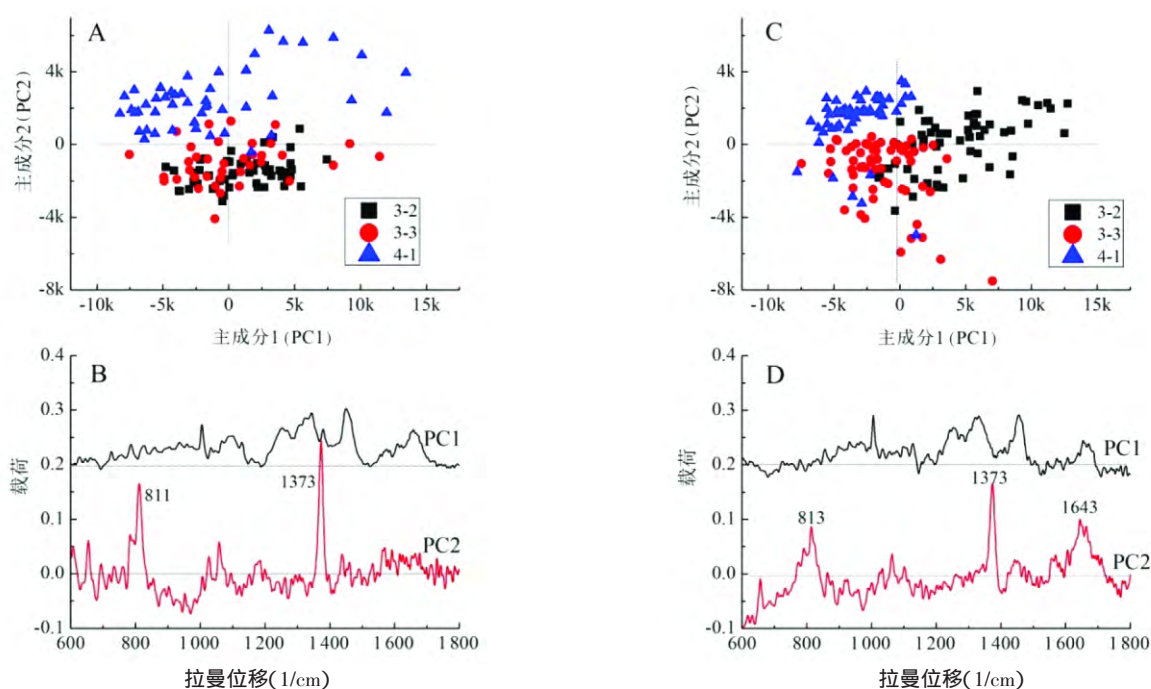
图5 菌株3-2在液体培养(a)和固体平板(b)下的平均拉曼光谱及其差异光谱(c)

从以上结果可以得到以下几个方面的信息。①由于糖料蔗和蔗渣都是富含糖分的物质,空气中除了以往报道的真菌和放线菌外,还有丰富的细菌物种。从细胞的拉曼光谱可以初步判断,在随机选择的12个菌株里有两个菌株是产芽孢细菌,有3个菌株是产细胞色素类胡萝卜素细菌。②单细胞拉曼光谱基本反映了细菌胞内主要成份的真实组成,特别是对胞内含有特殊物质如类胡萝卜素、吡啶二羧酸等检测特别灵敏,对产这类物质的细菌极易检出。③通过主成分分析可以将部分细菌菌株区分为不同的类群,主要影响因素是拉曼光谱的总体信号强度、特殊物质的特征峰以及生物大分子的含量(体现在某些拉曼峰的强弱)。在12个菌株中,4-4菌株由于富含CaDPA而且含量很高,其细胞主要分布在PC1的50~175 k的区域,而且细胞分布发

散;而对于不产特殊物质、胞内主要组成接近、光谱曲线类似的菌株,也有可能区分。④同一菌株在固体、液体2种不同培养条件下其细胞光谱显示不同的信号强度,但胞内主要组成基本相似,不同菌株在2种不同培养条件下经化学计量学分析得到类似的结果,影响判别的因子基本相同。

拉曼光谱是一种分子振动光谱,与红外光谱明显受水分子的严重干扰不同,而水分子的拉曼散射极其微弱,因此,采用拉曼光谱来研究生物材料有先天优势。拉曼光谱可以同时覆盖50~4000波数的区间,这一区间包含了绝大多数生物细胞中有机物及无机物分子基团的响应。拉曼光谱在显微分析中有着较高的分辨率,其特征谱带明晰独立,可用于物质的定性和定量分析。对样品的要求简单,无需对样品做任何预处理,可提供简单、可重复、且无损伤的物质内部构成份分析。特别是引入表面增强、针尖增强、等离子体增强以及同位素标记等技术后,克服了拉曼信号较弱的短板,提高了灵敏度,令拉曼光谱在生物医学领域的应用更为深入和广泛^[4]。本研究通过激光俘获单个细胞,获得比常规的共焦拉曼光谱法更为完整的整个细胞的拉曼光谱信息^[17]。

通过单个细胞的拉曼光谱可以获知细菌的主分、生理状态等信息,因此有不少通过拉曼光谱进行细菌分类、识别和判别的研究报告^[18-20],特别是引入数据挖掘后,明显提高其判别能力,获知更多的细胞信息^[21-22]。这



注:A,B—固体培养;C,D—液体培养

图6 固体和液体培养条件下3-2、3-3和4-1菌株的主成分分析(A,C)及其载荷(B,D)

些研究表明,拉曼光谱对于快速无损鉴别单个细菌(细胞)是可行而且有效的,前提条件是建立足够优秀的基本数据库和应用优质的统计算法,而建立一个新的数据库必须包括相关的物种,甚至相近的菌株、物种及属。更大的挑战是细菌的生长条件比如培养基组成、培养温度、培养时间等均有可能影响到细胞光谱。即使如此,从自然环境分离的菌株,并不是总能鉴别出来,因为未知菌株可能并不属于数据库中某一已知的物种。

4 结 论

应用单细胞拉曼光谱分析了来自糖厂甘蔗喂料口、甘蔗渣堆场等作业岗位的12个细菌菌株。光镊俘获的单个细胞的拉曼光谱表征了细菌的基本特征,典型的光谱特征显示,糖厂空气中含有丰富的细菌物种,既有产芽孢细菌,也有类胡萝卜素细菌,对于含有特殊光谱的细菌极易检出,结合化学计量学分析可以将部分细菌菌株区分为不同的类群,即使是在2种不同培养条件下依然可以得到相似的结果,但是在缺少大型数据库和参照菌株下难以直接判别菌株的分类地位或者是否属于某种病原菌。

志谢 本文在试验设计和数据处理方面得到了广西科学院王桂文研究员的大力帮助,特此致谢

作者声明 本文无实际或潜在的利益冲突

参考文献

[1] PETRY R, SCHMITT M, POPP J. Raman spectroscopy—a prospective

tool in the life sciences[J]. Chemphyschem, 2003, 4(1): 14–30.

- [2] BRAUCHLE SCHENKE –LAYLAND K. Raman spectroscopy in biomedicine – non-invasive in vitro analysis of cells and extracellular matrix components in tissues[J]. J Biophotonics, 2013, 8(3): 288–297.
- [3] CHAN J W. Recent advances in laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS) for label-free analysis of single cells[J]. J Biophotonics, 2013, 6(1): 36–48.
- [4] SMITH R, WRIBHT K L, ASHTON L. Raman spectroscopy: an evolving technique for live cell studies[J]. Analyst, 2016, 141(12): 3590–3600.
- [5] GERMOND A, KUMAR V, CHIMURA T et al. Raman spectroscopy as a tool for ecology and evolution[J]. J R Soc Interface, 2017, 14(201): 70–174.
- [6] HUANG WE, LI M, JARVIS RM et al. Shining light on the microbial world: the application of Raman microspectroscopy[J]. Adv Appl Microbiol, 2010, 70(70): 153–186.
- [7] REDDING B, SCHWAB M, PAN YL. Raman Spectroscopy of Optically Trapped Single Biological Micro-Particles[J]. Sensors, 2015, 15(8): 19021–19046.
- [8] TAO Z, ZHANG P, QIN Z et al. Poly(3-hydroxybutyrate) anabolism in Cupriavidus necator cultivated at various carbon-to-nitrogen ratios: insights from single-cell Raman spectroscopy[J]. J Biomed Opt, 2016, 21(9): 97005.
- [9] 覃赵军, 彭立新, 竺利波, 等. 碳源浓度影响微生物 PHB 合成代谢的单细胞拉曼光谱分析[J]. 中国激光, 2015, 42(3): 0315003.
- [10] 覃赵军, 赖钧灼, 彭立新, 等. 拉曼光谱分析有机氮源促进乙醇发酵的机制[J]. 分析化学, 2014, 42(10): 1471–1477.
- [11] 中华人民共和国国家标准. 公共场所卫生检测方法 第3部分 空气微生物 GB/T 18204.3–2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013: 1–5.
- [12] PUPPELS GJ, DE MIL FF, OTTO C et al. Studying single living cells

- and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy[J]. Nature, 1990, 347(6290): 301-303.
- [13] CHEN D, HUANG SS, LI YQ. Real-time detection of kinetic germination and heterogeneity of single *Bacillus* spores by laser tweezers Raman spectroscopy[J]. Anal Chem, 2006, 78(19): 6936-6941.
- [14] SETLOW P. Spore resistance properties[J/OL]. Microbiol Spectr, 2014, 2(5): TBS-0003-2012. [2018-04-24]. <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012>. DOI: 10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012.
- [15] TAO Z, WANG G, XU X, et al. Monitoring and rapid quantification of total carotenoids in *Rhodotorula glutinis* cells using laser tweezers Raman spectroscopy[J]. FEMS Microbiol Lett, 2011, 314(1): 42-48.
- [16] de Oliveira VE, Neves Miranda MA, Soares MC, et al. Study of carotenoids in cyanobacteria by Raman spectroscopy[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2015, 150(1): 373-380.
- [17] TAO Z, PENG L, ZHANG P, et al. Probing the kinetic anabolism of poly-beta-hydroxybutyrate in *Cupriavidus necator* H16 using single-cell Raman spectroscopy[J/OL]. Sensors, 2016, 16(8): 1257. [2018-04-24]. <http://www.mdpi.com/1424-8220/16/8/1257>. DOI: 10.3390/s16081257.
- [18] KEMMLER M, RODNER E, ROSCH P, et al. Automatic identification of novel bacteria using Raman spectroscopy and Gaussian processes[J]. Anal Chim Acta, 2013, 794(17): 29-37.
- [19] PAHLOW S, MEISEL S, CIALLA-MAY D, et al. Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy[J/OL]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 89: 105-120. [2018-04-24]. http://xueshu.baidu.com/s?wd=paperuri%3A%28ccd9da50305c3046e4e0e612ff8590c0%29&filter=sc_long_sign&tn=SE_xueshusource_2kduw22v&sc_vurl=http%3A%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2Fpubmed%2F25895619&ie=utf-8&sc_us=18381695292084343132. DOI: 10.1016/j.addr.2015.04.006.
- [20] STROLA SA, BARITAUX JC, SCHULTZ M, et al. Single bacteria identification by Raman spectroscopy[J]. J Biomed Opt, 2014, 19(11): 111610.
- [21] SUN S, WANG X, GAO X, et al. Condensing Raman spectrum for single-cell phenotype analysis[J/OL]. BMC Bioinformatics, 2015, 16 Suppl 18: S15. [2018-04-24]. <https://link.springer.com/article/10.1186%2F1471-2105-16-S18-S15>. DOI: 10.1186/1471-2105-16-S18-S15.
- [22] REN L, SU X, WANG Y, et al. QSpec: online control and data analysis system for single-cell Raman spectroscopy[J/OL]. PeerJ, 2014, 2: e436. [2018-04-24]. <https://peerj.com/articles/436/>. DOI: 10.7717/peerj.436.

收稿日期 2018-03-12 修回日期 2018-05-28 责任编辑 张军

科技论文中“讨论”层次书写的要求

DOI:10.13329/j.cnki.zyyjk.2018.0727

讨论虽然不是文章最重要的部分,但却是最难写的部分,许多作者会感到无从下笔。概括讲,讨论的内容为:(1)本研究的原理和概念,所用材料和方法的优缺点。(2)对所得结果的分析与评价,从结果引出的推理和结论,尚待解决的问题与展望。(3)对本研究的结果进行理论概括,提出新观点,新假设。(4)对各种不同的观点和学说进行比较和评价,提出今后探索的方向。(5)一定要紧扣本研究的结果,突出新发现和新观点。(6)避免不必要地重复前面部分已论述过和过去文献已报道过的内容,不要重复已在引言和结果中已详述过的数据或其他资料。(7)分析本文结果与他人结果的异同以及各自的优缺点和不足,尤其不能仅仅说本研究或调查与他人的报告“相一致”“相符合”或“不一致”就此驻笔,应该讨论为什么一致或不一致。(8)讨论的最后部分是结论,但如得不出肯定的结论,不要勉强,可以不写结论。

有时还需要讨论,如全部或部分地证实、否定或怀疑前人对某些问题讨论的准确性,或是在前人研究的基础上有新发现,或前人从未涉及到的新成果,或前人虽曾有但为后人所忽略的再次发现。

——本刊编辑部