

傅立叶变换红外光谱技术对 5 种沙门氏菌的快速分类鉴定

杨丽君^{1,2} 李兆杰¹ 宋晓华¹ 王静^{1*} 刘玉敏¹ 崔凤杰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: 【目的】建立沙门氏菌属内鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、亚利桑那沙门氏菌、波斯坦沙门氏菌 5 种菌的傅立叶变换红外(Fourier transform infrared, FT-IR)光谱数据库及 FT-IR 分类鉴定方法。【方法】应用 FT-IR 技术对 5 种沙门氏菌进行指纹图谱数据采集,应用化学计量学分析方法对光谱进行分析。【结果】建立了 5 种沙门氏菌的标准 FT-IR 光谱数据库,用于 FT-IR 技术对 5 种可疑目标沙门氏菌进行鉴定;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,均可成功将 5 种沙门氏菌进行区分。【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,是一种区分 5 种沙门氏菌的有效方法。

关键词: 傅立叶变换红外光谱, 沙门氏菌, 主成分分析, 分级聚类分析, 分类, 鉴定

Rapid differentiation and identification of five species of *Salmonella* by FT-IR spectroscopy

YANG Li-Jun^{1,2} LI Zhao-Jie¹ SONG Xiao-Hua¹ WANG Jing^{1*}
LIU Yu-Min¹ CUI Feng-Jie¹

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

(2. Yantai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai, Shandong 264200, China)

Abstract: [Objective] To establish a standard fourier transform infrared (FT-IR) spectral library and a FT-IR method of differentiation and identification of five species of *Salmonella*, viz *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella arizonae* and *Salmonella potsdam*. [Methods] FT-IR fingerprint absorption spectra of five species of *Salmonella* were collected and analyzed by chemometric methods. [Results] A standard FT-IR spectral library was created and could be used to compare with those of the target *Salmonella* and identify them; two cluster models of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were established and could differentiate and identify well the five species of *Salmonella*. [Conclusion] As a rapid, easy-to-use and accurate technique, FT-IR spectroscopy is an effective tool to differentiate and identify five species of *Salmonella* studied here.

Keywords: Fourier transform infrared spectroscopy, *Salmonella*, PCA, HCA, Differentiation, Identification

傅立叶变换红外(Fourier transform infrared, FT-IR)光谱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^[1],因此可以区分生化信息上的差别。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,可成功实现对微生物的分类鉴定。1991年 Naumann 等在 Nature 杂志中指出傅立叶变换红外光谱法具有判别、分类和鉴别微生物的能力^[2]。

猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)、亚

利桑那沙门氏菌(*Salmonella arizonae*)、波斯坦沙门氏菌(*Salmonella potsdam*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)和肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)是沙门氏菌属中常见的几种菌,传统方法区分各种沙门氏菌需要进行大量的生化试验和血清学试验,费时费力。因此非常有必要建立一种能快速、有效区分几种菌的方法。近几年基于 PCR 技术的分子生物学分类、鉴定及检测微生物的方法发展迅速,其优势在于快速、特异性高,如根据细菌 16S rDNA 的高度保守性,通过扩增 16S rDNA 可实现对目标菌的快速分类鉴定^[3-5],但是该方法试验耗材价格昂贵,同时对操作者的专业要求较高。FT-IR 技术是一种横跨

物理光谱学、化学计量学、微生物学等学科的崭新技术, 不仅快速、高效、廉价, 而且对操作者的专业要求较低, 比较适于推广应用。

目前, FT-IR 技术在细菌属内种水平上的分类鉴定已有不少报道, 如 Miguel Gómez M.A. 等^[6]对布氏杆菌属(*Brucella*)内细菌在种水平上进行了较好的分类鉴定, Rebuffo-Scheer C.A. 等^[7]对分枝杆菌属(*Mycobacteria*)内细菌在种水平上进行了较好的分类鉴定, Dziuba B. 等^[8]对乳杆菌属内细菌在种水平上进行了较好的分类鉴定。本研究应用傅立叶变换红外(Fourier transform infrared, FT-IR)光谱技术, 结合化学计量学运算, 探讨 FT-IR 技术对 5 种沙门氏菌的分类鉴定情况。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

1.1.1 菌种: *S. choleraesuis* CMCC 50109、*S. arizonae* CMCC 47010 购自国家微生物菌种保藏中心(CMCC); *S. potsdam* CICC 21500、*S. enteritidis* CICC 21482 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC); *S. typhimurium* ATCC 14028 购自美国模式培养物集存库(ATCC)。从 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 接种到营养肉汤中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18–24 h, 备用。

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; 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 设备和材料

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; CR 22G III 离心机, 日本日立公司; $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温恒湿培养箱, 3 M 公司; $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥箱, 3 M 公司; VERTEX 70 型傅立叶变换红外光谱仪, 德国布鲁克公司。

1.3 FT-IR 技术对 5 种沙门氏菌的分类鉴定

(1) 样品制备

用无菌接种环挑取 *S. choleraesuis*、*S. arizonae*、*S. potsdam*、*S. typhimurium* 和 *S. enteritidis* 活化肉汤培养物各一环, 分别接种于盛有营养肉汤的大试管中, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18–24 h, 用核酸蛋白分析仪测定并记录菌液浓度。

分别吸取各肉汤培养物 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 超纯水悬浮混匀。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 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中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} ^[9–12], 光谱分辨率 4 cm^{-1} , 64 次光谱累计求平均^[8]。

(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, 取 10 个有效数据。

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 4 000–600 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。

将上述处理后的各菌 977.9–1 805.3 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5种沙门氏菌 FT-IR 光谱的主成分聚类分布图和树状聚类分布图。

2 结果

2.1 平均光谱

对采集并处理后的5种沙门氏菌的光谱取平均, 得到各菌的平均光谱, 见图1。光谱经基线校正、矢量归一化处理, 光谱间的差异仍然难以肉眼区分, 需借助计算机进行区分。一般来讲, 亲缘关系较远的细菌差异较大, 这种差异可能会直观的体现在光谱上, 因此可以直接通过肉眼观察光谱的差异即可对细菌进行区分。而且, 根据每个波数或每段波数范围所对应的细菌成分或结构, 如多糖、蛋白质、肽、脂肪酸、磷酸化合物、酰胺带等, 可以将细菌的差异通过光谱分析直接具体到细菌生物大分子组成或其结构上^[13]。这对于分析细菌间不同的物质结构具有重要意义。但对于亲缘关系较近的细菌, 光谱间的差异就很难用肉眼区分, 需借助计算机对其进行分析。

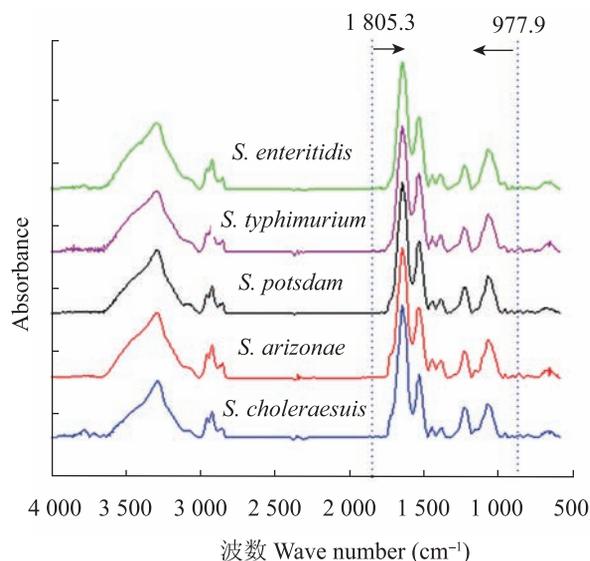


图1 5种沙门氏菌的平均 FT-IR 光谱
Fig. 1 Average FT-IR spectra of five species of *Salmonella*

2.2 FT-IR 光谱数据库的建立

利用 OPUS 6.5 软件, 首先对沙门氏菌属内5种菌的 FT-IR 光谱进行透过率-吸光度转化, 然后进行基线校正, 对 4 000–600 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, 即建立了沙门氏菌属内 *S. choleraesuis*、*S. arizonae*、*S. potsdam*、*S. typhimurium* 和 *S. enteritidis* 5种菌的 FT-IR 光谱数据库。这为未知可疑目标菌的分类鉴定提供了重要的归类数据库。例如, 我们得到一株可疑目标菌的光谱数据, 通过计算机及化学计量学运算, 将其与数据库光谱进行归类分析, 相同光谱聚为一类, 因此就可对该菌的分类鉴定情况作出初步判断。FT-IR 光谱数据库的建立会大大推动 FT-IR 技术在细菌分类、鉴定及检测中的发展和应用。

2.3 主成分分析(PCA)

PCA 分析是首先将多个变量通过线性变换选出相对较少个对 PCA 分析具有较大贡献的综合变量, 然后根据需要从中取出几个较少的综合变量尽可能地反应原来变量的信息的统计方法。主成分(Principal component, PC)即是多个变量通过线性变换选出的相对较少个对 PCA 分析具有较大贡献的综合变量。PCA 分析将每一条光谱与其他光谱比较, 将相同光谱归类, 绘出散点图, 每一散点代表一条光谱, 将不同细菌光谱归类情况直观的体现在二维或三维空间里。本研究通过对沙门氏菌属内5种菌的光谱数据进行 PCA 分析, 选取主成分1 (PC1)、主成分2 (PC2)和主成分3 (PC3)作为聚类依据, 得到主成分聚类三维分布图, 见图2。由图2可知, 5种菌光谱各自分别聚类成簇, 说明5种沙门氏菌光谱之间存在一定差异性, 证明 PCA 分析可以将沙门氏菌属内 *S. choleraesuis*、*S. arizonae*、*S. potsdam*、*S. typhimurium*、*S. enteritidis* 5种菌进行较好聚类。对于可疑目标菌, 将其光谱与上述5种菌标准光谱

进行 PCA 分析, 观察其在聚类三维分布图中是否与某种细菌聚类簇聚为一簇, 便可对可疑目标菌的分类鉴定情况作出初步判断。

3 个主成分 PC1、PC2 和 PC3 权重见图 3。权重图说明了每个波数变量数据对主成分的贡献大小, 据此可以推测哪一段光谱区域为整个光谱的变化贡献较大。也就是说, 权重值较大(正值或负值)的主成分所对应的光谱区域对细菌分类鉴定的贡献也较大。由图 3 可知, 在 $977.9\text{--}1\,805.3\text{ cm}^{-1}$ 波数范围内, 各波数对应的 3 个主成分权重值均较大, 其中 PC1 各波数所对应的权重值总体较大, PC2 和 PC3 次之, 反映出 3 个主成分对聚类的贡献大小。3 个主成分对于聚类的贡献率为 85.1% (分别为 50.9%、22.6% 和 11.6%), 说明 PC1、PC2 和 PC3 3 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。据文献报道^[8], $1\,800\text{--}1\,500\text{ cm}^{-1}$ 波数范围为蛋白质或多肽的酰胺 I 带和酰胺 II 带的特征吸收区, $1\,500\text{--}1\,200\text{ cm}^{-1}$ 波数范围为蛋白质、脂肪酸和磷酸化合物的特征吸收区, $1\,200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ 波数范围为多糖的特征吸收区。因此, 结合我们的分析结果, 确定 $977.9\text{--}1\,805.3\text{ cm}^{-1}$ 波数范围的光谱作为反映整个光谱变异性的主要光谱区域。

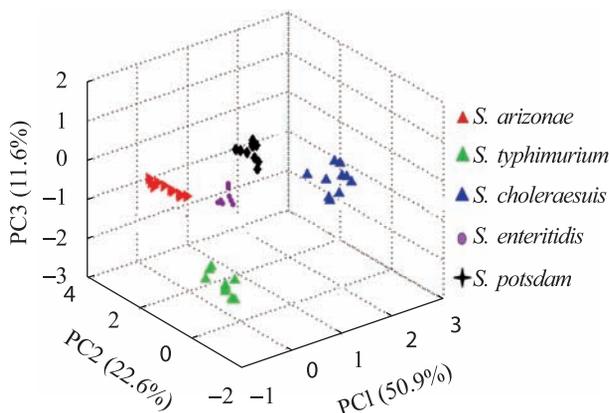


图 2 5 种沙门氏菌 PCA 聚类分布图
Fig. 2 PCA cluster results of FT-IR spectra of five species of *Salmonella*

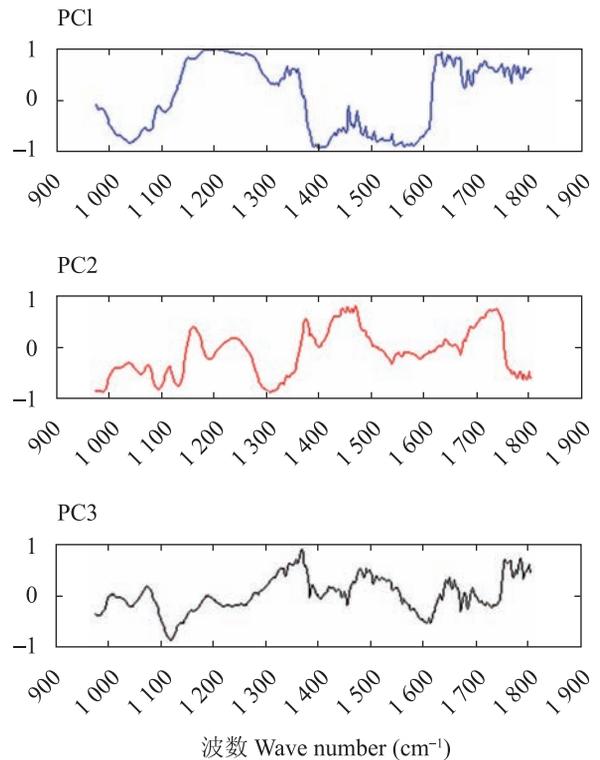


图 3 PC1、PC2、PC3 权重图
Fig. 3 Loading plots of PC1, PC2 and PC3 obtained from PCA analysis of FT-IR spectra of five species of *Salmonella*

2.4 分级聚类分析(HCA)

对 5 种沙门氏菌的光谱数据进行 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, 5 种菌各自分别聚为一类, 说明 5 种沙门氏菌光谱之间存在一定差异性, 证明 HCA 分析可以将 5 种沙门氏菌进行较好聚类。对于可疑目标菌, 将其光谱与上述 5 种菌标准光谱进行 HCA 分析, 观察其在聚类树状图中是否与某种细菌聚为一类, 并计算未知光谱与数据库中标准光谱的距离, 便可对可疑目标菌进行鉴别。

3 讨论

尽管目前关于 FT-IR 技术对微生物在属、种乃至亚种水平上的分类鉴定的报道有不少, 但仅

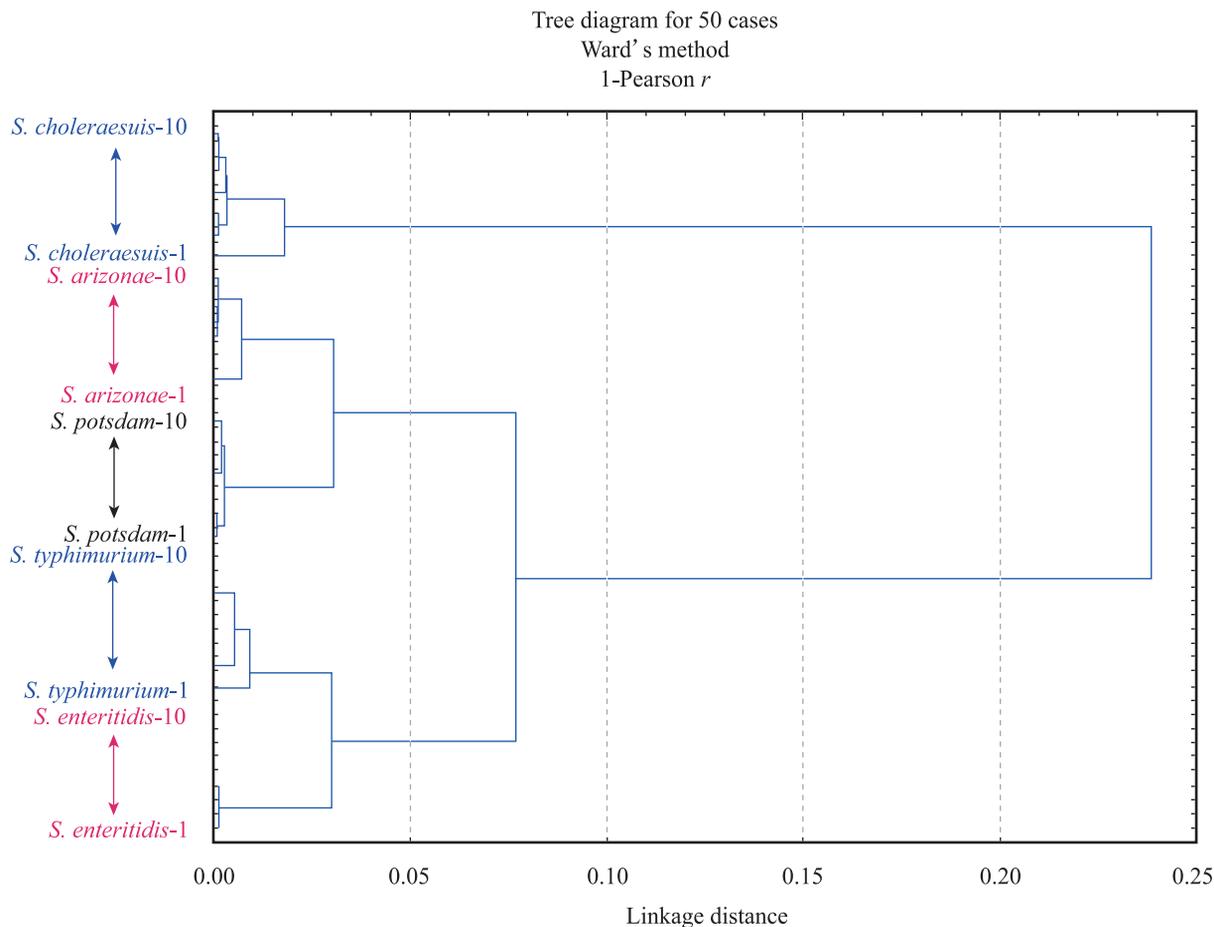


图 4 5 种沙门氏菌 HCA 聚类树状图

Fig. 4 HCA cluster results of FT-IR spectra of five species of *Salmonella*

涉及方法的建立和分类鉴定能力的证明, 尚未有建立光谱数据库的报道。本文通过对沙门氏菌属内 5 种菌的 FT-IR 光谱进行处理, 得到了 *S. choleraesuis*、*S. arizonae*、*S. potsdam*、*S. typhimurium*、*S. enteritidis* 5 种菌的 FT-IR 光谱数据库, 用以未知可疑目标菌的分类鉴定。方法为: 首先获得可疑目标菌的 FT-IR 光谱, 根据数据库内光谱的处理方法对其进行预处理, 然后将数据与数据库合并, 利用 PCA 或 HCA 分析方法对合并后的光谱数据重新进行聚类分析, 根据聚类结果便可对可疑菌作出分类鉴定的初步判断。

本研究应用 PCA 或 HCA 分析方法均能对沙门氏菌属内 5 种菌进行较好分类。PCA 和 HCA

作为两种不同的聚类方法, 各有优势, 在微生物分类鉴定时可以结合运用^[14-15]。在对沙门氏菌属内 5 种菌光谱进行 PCA 分析时我们发现, 以主成分 1 (PC1)和主成分 2 (PC2)作为聚类依据, 得到主成分聚类二维平面分布图, 难以将 5 种沙门氏菌光谱进行分类。当增加主成分 3 (PC3), 得到主成分聚类三维空间分布图时, 却可以很好将 5 种菌光谱进行分类, 说明在 PCA 分析中, 能对微生物进行较好分类做出主要贡献的, 可能是 2 个主成分, 也可能是 3 个或是更多个, 因此在运用 PCA 分析方法对微生物进行分类鉴定时, 应尝试各种主成分的组合。理论上 PCA 分析可以在不降低光谱差异的前提下, 减少数据维数至直观的二

维或三维图,但在减少数据维数的同时就可能会使在多维空间能较好分类的数据点在二维或三维里发生交叉或重叠,导致不能成功分类。这种情况在对多种细菌进行区分时容易发生。但HCA分析就不存在类似问题,HCA用光谱间的距离作为分类的判定依据,用树状图直观的体现在平面上。

本研究一方面建立了 *S. choleraesuis*、*S. arizonae*、*S. potsdam*、*S. typhimurium*、*S. enteritidis* 5种沙门氏菌菌的标准 FT-IR 光谱数据库,用以未知可疑目标菌的分类鉴定;另一方面,建立了基于PCA和HCA两种聚类分析模型,成功将5种沙门氏菌进行区分。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,是一种区分上述5种沙门氏菌的有效方法。

参 考 文 献

- [1] Naumann D. Some ultrastructural information on intact, living bacterial cells and related cell-wall fragments as given by FT-IR[J]. *Infrared Physics and Technology*, 1984, 24: 233-238.
- [2] Naumanan D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterization by FT-IR spectroscopy[J]. *Nature*, 1991, 351: 6321-6381.
- [3] 鲁辛辛, 黄艳飞, 田晓波. 细菌 rDNA 分类鉴定的方法学研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(5): 435-437.
- [4] 张洁, 徐桂花, 尤丽琴. 16S rDNA 序列分析法鉴定乳酸菌[J]. *农产品加工*, 2009(4): 47-49.
- [5] 王宏萍, 张继伦, 吴文娟, 等. 使用16S rDNA 序列分析鉴定副溶血性弧菌[J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(9): 2034-2036.
- [6] Miguel Gómez MA, Bratos Pérez MA, Martín Gil FJ, et al. Identification of species of *Brucella* using fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55(1): 121-131.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Beattie SH, 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 Microbiology Letters*, 1998, 164(1): 201-206.
- [10] 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.
- [11] Lin M, Al-Holy M, Chang SS, et al. Rapid discrimination of *Alicyclobacillus* strains in apple juice by fourier transform infrared spectroscopy[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 105(3): 369-376.
- [12] Rodriguez-Saona LE, Khambaty FM, Fry FS, et al. Rapid detection and identification of bacterial strains by fourier transform near-infrared spectroscopy[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(2): 574-579.
- [13] 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.
- [14] 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): 238-241.
- [15] 岳田利, 王军, 袁亚宏, 等. 基于 FT-NIR 的微生物快速鉴定方法研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(11): 2945-2949.