

基于单细菌共焦拉曼光谱的细菌快速检测

窦雪晨[#], 蔡田雨[#], 王冠, 刘培鹏, 李抄, 杜耀华^{*}, 田丰^{*}

军事科学院系统工程研究院卫勤保障技术研究所, 天津 300161

窦雪晨, 蔡田雨, 王冠, 刘培鹏, 李抄, 杜耀华, 田丰. 基于单细菌共焦拉曼光谱的细菌快速检测[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1581-1593

Dou Xuechen, Cai Tianyu, Wang Guan, Liu Peipeng, Li Chao, Du Yaohua, Tian Feng. Rapid identification of five species of bacteria based on confocal Raman spectroscopy of single bacterial cells[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1581-1593

摘要:【背景】目前利用共焦拉曼光谱技术进行成像和成分鉴别方面的研究较多, 但如何快速检测与鉴别多种细菌方面的研究较少。【目的】基于共焦拉曼光谱技术, 建立一种在单细菌水平上实现病原微生物快速分类鉴定的方法。【方法】以大肠杆菌为研究对象, 利用共焦拉曼光谱技术在单细菌水平上进行了激发波长的优化试验, 并研究了大肠杆菌存放时间对单细菌拉曼光谱信息的影响。同时, 对白色葡萄球菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和铜绿假单胞菌进行了共焦拉曼光谱测试, 并对 5 种细菌进行单细菌拉曼光谱的归属分析, 设计共焦拉曼光谱技术结合支持向量机(support vector machine, SVM)模型学习算法, 进行了 5 种细菌的快速分类鉴别。【结果】对于单细菌拉曼光谱探测, 532、633 和 785 nm 这 3 种常见的拉曼探测波长中, 532 nm 具有更好的激发效率和光谱信噪比。结合 SVM 模型对 5 种细菌的识别分类, SVM 模型的灵敏度和特异性达到了 96.00%以上, 整体准确率为 98.25%。不同存放时间下大肠杆菌拉曼光谱的重复性和稳定性都很好, 且 SVM 模型匹配率均在 90.00%以上。【结论】单细菌拉曼光谱结合 SVM 模型可对 5 种细菌进行快速、准确的分类, 不同存放时间对大肠杆菌拉曼光谱的归类识别几乎无影响。

关键词: 共焦拉曼光谱技术; 单细菌; 分类鉴定; 线性支持向量机模型

基金项目: 国家重点研发计划(2017ZX10304403003003); 军队重点项目(20SWAQX06)

#对本文贡献相同

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2017ZX10304403003003); Military Key Projects (20SWAQX06)

#These authors equally contributed to this work

*Corresponding authors: E-mail: DU Yaohua: duyh@npec.org.cn; TIAN Feng: tianfeng62037@163.com

Received: 2021-07-14; Accepted: 2021-09-24; Published online: 2022-01-19

Rapid identification of five species of bacteria based on confocal Raman spectroscopy of single bacterial cells

DOU Xuechen[#], CAI Tianyu[#], WANG Guan, LIU Peipeng, LI Chao, DU Yaohua^{*},
TIAN Feng^{*}

Institute of Medical Support Technology, Institute of Systems Engineering, Academy of Military Sciences of Chinese PLA, Tianjin 300161, China

Abstract: [Background] Despite the extensive research on the application of confocal Raman spectroscopy in imaging and component identification, there are few studies focusing on the rapid detection and identification of a variety of bacteria. [Objective] A method for rapid classification and identification of single bacterial cells was established with confocal Raman spectroscopy. [Methods] We optimized the excitation wavelength of confocal Raman spectroscopy by using the single cells of *Escherichia coli*, and studied the influence of storage time on the Raman spectrum of *E. coli*. Furthermore, we performed confocal Raman spectroscopy tests for *Staphylococcus albus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, and *Pseudomonas aeruginosa*. We then analyzed the Raman spectra of the 5 bacterial species to design a rapid identification method combining confocal Raman spectroscopy with support vector machine (SVM) model for the 5 bacterial species. [Results] Among the three common Raman detection wavelengths of 532, 633, and 785 nm, 532 nm had the best excitation efficiency and spectral signal-to-noise ratio for the identification of single bacterial cells. The SVM model showed the sensitivity and specificity above 96.00% and the overall accuracy rate of 98.25% for the identification of these bacteria. Moreover, the Raman spectra showed good repeatability and stability for the *E. coli* stored for different time, and the matching rate of SVM model was above 90.00%. [Conclusion] Single-cell Raman spectroscopy combined with SVM model can quickly and accurately classify the five bacterial species, and different storage time has little effect on the identification of *E. coli* based on Raman spectra.

Keywords: confocal Raman spectroscopy; single bacterial cells; classification and identification; support vector machine

病原微生物作为最常见的感染性疾病源头, 严重威胁着我国乃至世界的公共卫生安全。如何在单细菌水平上实现病原菌的分类鉴定是感染性疾病预防和治疗的关键, 为解决这个问题, 众多研究人员对此进行了探索。孙丹等^[1]将微流控液滴技术与表面增强共振拉曼光谱结合用于评价单个体细胞中碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的活性。然而, 单个体细胞要比单细菌细胞大得多, 适用于体

细胞检测的方法不一定适用于单细菌, 因此实现单细菌的拉曼检测难度更大。对此, Cui等^[2]提出将表面增强拉曼光谱与¹⁵N稳定同位素探测(SERS-¹⁵N-SIP)相结合的方法, 使用¹⁵NH₄Cl对大肠杆菌(*Escherichia coli*)标记并进行单细胞表面增强拉曼光谱分析; Zhou等^[3]提出在*E. coli*单细胞表面原位合成丝状银纳米粒子(AgNPs)的方法, 可以对单个*E. coli*进行量化。虽然这些方法对单细菌拉曼光谱的探测

进行了探索, 但是未实现单细菌水平上病原菌的分类鉴定。

共焦拉曼光谱技术是将共聚焦显微技术与拉曼光谱技术相结合, 用于分析物质组分、结构等的一种有效光谱分析手段^[4-7], 能够在单细菌水平上实现病原菌的快速检测和分类鉴定。同时, 共焦显微拉曼光谱仪的空间分辨率在微米尺度, 也为生物化学分析开启了一个新维度, 能够对低至 0.5 μm 空间分辨率下的样品进行特征拉曼成像分析, 显示样品成分分布^[6,8-10]。Schlomo 等^[11]首次将表面增强拉曼技术与细菌检测结合, 发现革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌的拉曼图谱存在差异; 高玮村等^[12]利用表面增强拉曼技术实现了 5 种食源性致病菌的鉴别。然而, 这些研究不是基于单细菌水平上的检测, 其结果是多个细菌的拉曼散射光谱叠加之“和”。如果目标样本中有干扰物或多种细菌, 这些不同拉曼光谱的叠加将难以有效识别细菌种类。2017 年, Doughty 等^[13]报道了基于拉曼技术原理用于环境监测的生物气溶胶自动分析系统(aerosol Raman spectrometer, ARS), 可实现对聚苯乙烯微粒、黑炭粒子和微生物单粒子的区分检测, 验证了在单粒子水平上进行区分检测的可行性, 为后续研究单细菌的分类识别提供了应用依据。

本研究将单细菌共焦拉曼光谱技术和机器学习中的支持向量机(support vector machine, SVM)模型相结合, 在单细菌水平上开展共焦拉曼激发波长的优化, 以及白色葡萄球菌(*Staphylococcus albus*)、*E. coli*、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌(*Salmonella*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)这 5 种细菌的单细菌拉曼光谱识别分类研究, 以期实现病原微生物的非标记、广谱快速检测。

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli (ATCC 8099)、*S. aureus* (ATCC 6538)、*S. albus* (ATCC 8032)、*P. aeruginosa* (ATCC 15442) 和 *Salmonella* (CICC 21482), Merck 公司; 胰蛋白胨大豆肉汤培养基, 国家生物防护装备工程技术研究中心。

共焦拉曼光谱仪, 力航(北京)科技有限公司; 超净工作台, 苏州苏信环境科技有限公司; 台式离心机, 湖南凯达科学仪器有限公司; 恒温培养箱, 上海仙象仪器仪表有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌液的制备

分别将冷冻保存的 *E. coli*、*S. aureus*、*S. albus*、*P. aeruginosa* 和 *Salmonella* 菌株解冻后摇匀并注入胰蛋白胨大豆肉汤培养基中, 于恒温培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 培养 16 h。5 种制备完成的细菌菌液分别取 1 mL, 用去离子水洗涤(5 000 r/min, 2 min, 室温) 4 次, 洗涤后的菌液存放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。以同样方法制备存放时间为 0、12、24、36、48、60 和 72 h 的 *E. coli* 菌液。

1.2.2 单细菌共焦拉曼光谱的测定

共焦显微拉曼光谱仪由拉曼光谱仪和标准的光学显微镜耦合而成。共焦显微拉曼光谱仪能够对低至 0.5 μm 空间分辨率下的样品进行特征拉曼成像分析。共焦显微拉曼光谱技术无需对细菌细胞进行前处理, 无需侵入细菌细胞, 只需激发光束照射细菌细胞表面, 通过对所得拉曼光谱进行分析, 进而获取被测细菌物质的成分特征, 最终实现细菌种类的鉴定。

单细菌共焦拉曼光谱的具体测定流程如图 1 所示。细菌是活性很强的微生物, 活的细

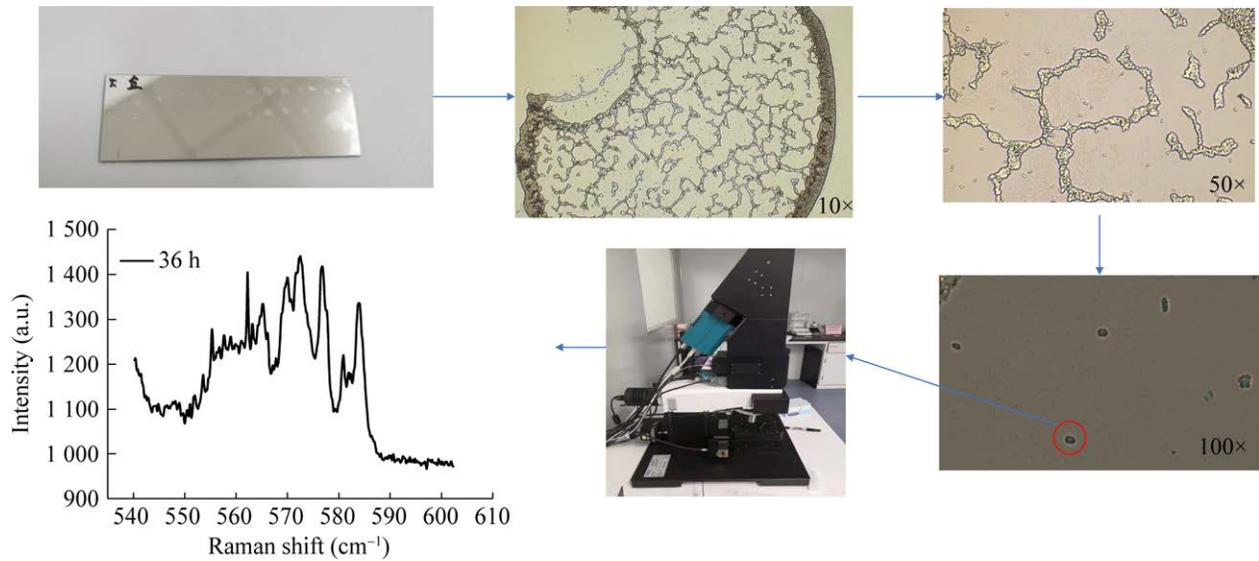


图 1 单细菌共焦拉曼光谱测定流程图

Figure 1 Flow chart of single bacteria confocal Raman spectroscopy.

菌在显微镜下是不断运动的。由于获得 1 个细菌的拉曼光谱信息需要一定的积分时间，不能在瞬时获得目标细菌的拉曼光谱信息。因此，在高倍显微镜下难以获得目标活细菌的准确拉曼光谱信息。对细菌在样品载体玻片上进行干燥固定，处理好的细菌玻片采用共焦显微镜进行细菌区域确认，使用 10×物镜聚焦寻找细菌区域，然后切换到 100×物镜下对形态完好的细菌进行拉曼光谱的测量。激发激光束通过显微镜聚焦为一个直径 0.5–1.0 μm 大小的光斑，与细菌尺度相当。因此，显微镜每聚焦一次，有且仅有一个细菌在光斑下，这就保证了拉曼光谱仪每次探测得到的是单个细菌的拉曼光谱。

1.2.3 不同激发波长的对比实验

取 1 μL 洗涤后的 *E. coli* 菌液滴加在铝基板上，干燥 15 min 后，将样品放到共焦拉曼光谱仪中，依次选择激发光源波长为 532、633 和 785 nm 的激光进行试验并采集光谱。对 3 种激发波长下的单个 *E. coli* 拉曼光谱进行统计分

析。样品采集时，共焦拉曼光谱仪参数均为激光强度 6 mW，积分时间 10 s，物镜倍数 100×。若 3 种激发波长下 *E. coli* 的拉曼光谱一致性较高，则计算各激发波长下关键特征峰的信噪比(signal to noise ratio, SNR)。信噪比即信号与噪声的比例，信噪比越大，表明细菌拉曼光谱的信号越强。拉曼光谱信噪比的定义为

$$SNR \approx I_{Ram} / \sqrt{I_{BG} + I_{Ram}} = I_{Ram} / \sqrt{I_{tot}}$$

其中， I_{Ram} 为拉曼峰信号强度， I_{BG} 为背景信号强度， I_{tot} 为拉曼峰信号总强度。

1.2.4 基于支持向量机(support vector machine, SVM)模型对细菌的识别分类

为实现细菌种类的自动鉴别，本研究建立了基于 SVM 模型的机器学习算法。SVM 建模过程如图 2 所示。

首先，在基于 SVM 的单细菌拉曼光谱数据分类模型应用前，采用最小二乘法和权重法对原始数据进行数据预处理，去除极端高强度光谱，得到 5 种细菌拉曼光谱数据集。数据预处理前后拉曼光谱对比如图 3 所示。

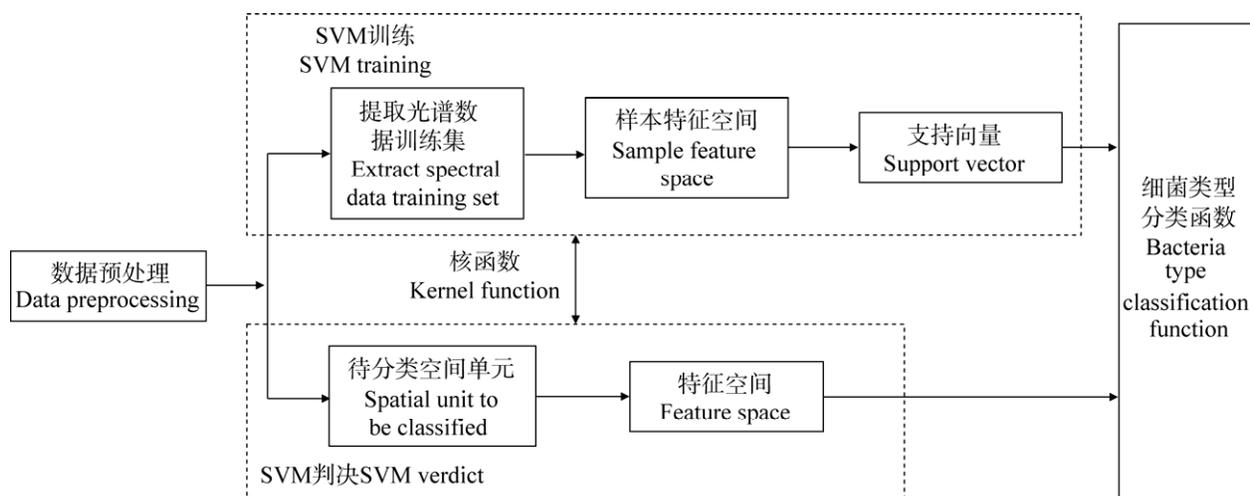


图 2 SVM 建模过程示意图

Figure 2 Schematic diagram of SVM modeling process.

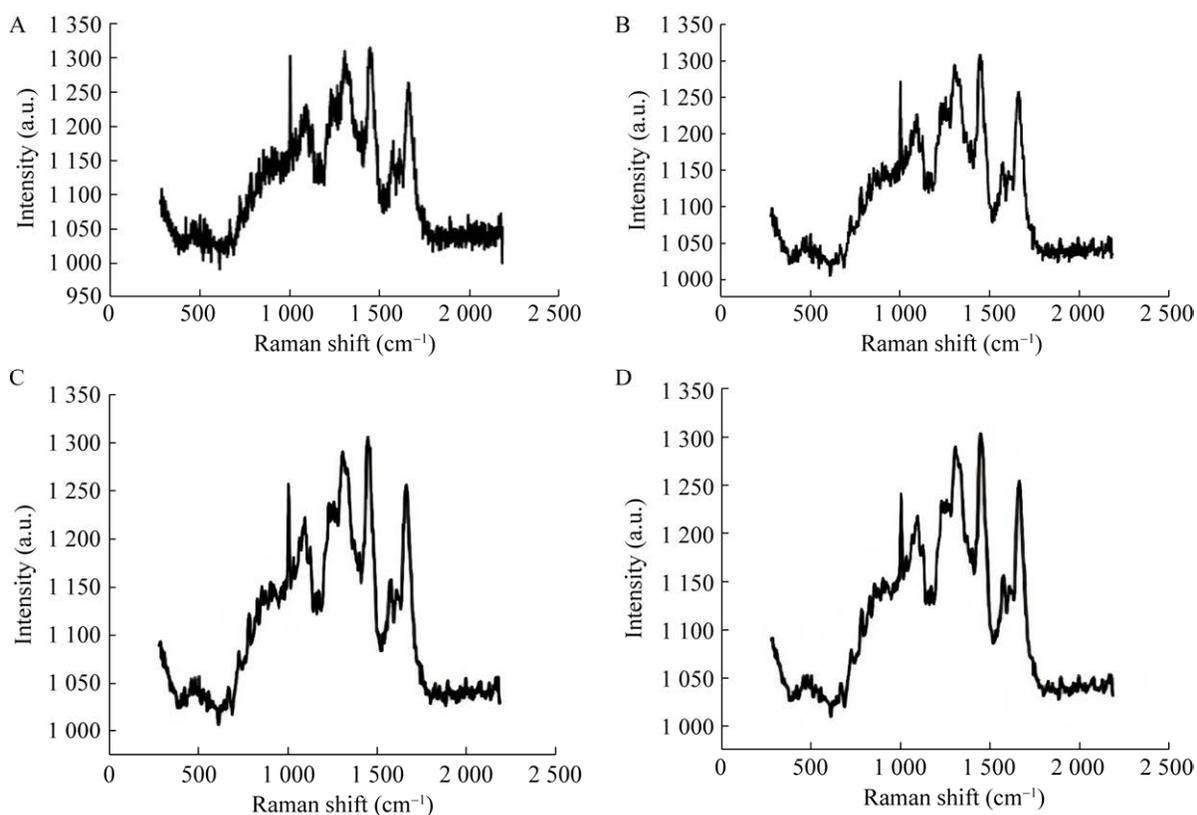


图 3 数据预处理前后拉曼光谱对比 A: 采集的原始拉曼光谱数据; B: 最小二乘法处理后的拉曼光谱; C: 权重法一次平滑后的拉曼光谱; D: 权重法二次平滑后拉曼光谱

Figure 3 Raman spectrum comparison before and after data preprocessing. A: The collected original Raman spectrum data; B: The Raman spectrum processed by the least square method; C: The Raman spectrum after the first smoothing by the weighting method; D: The second smoothing by the weighting method Raman spectroscopy.

然后, 随机将预处理后的数据划分为 75% 与 25% 两部分, 作为模型训练集与测试集。训练集用于训练 SVM 模型并调整模型的超参数, 由于高斯核具有可向无穷维拓展的特性, 所以选择高斯核作为模型的核函数, 类别权重采用自适应方法计算。最后, 采用灵敏度与特异性评价指标评价模型性能。

利用采集的拉曼光谱数据库对 5 种细菌应用 SVM 模型进行识别分类, 并探究 *E. coli* 的存放时间对其单细菌拉曼光谱信息的影响。具体如下:

(1) 采集原始数据: 将制备的 *E. coli*、*S. aureus*、*S. albus*、*P. aeruginosa* 和 *Salmonella* 的菌液分别吸取 1 μL 滴加在铝基板上, 在二级生物实验室中室温下自然干燥待测。使用共焦拉曼光谱系统进行光谱采集。

(2) 拉曼光谱仪参数设置: 拉曼光谱仪使用前首先使用硅片(Si)在 520.7 cm^{-1} 处的拉曼峰作为基准峰, 对仪器进行校正。细菌的拉曼光谱采集时使用最佳激发波长, 拉曼光谱扫描范围设置为 400–2 000 cm^{-1} 。

(3) 数据处理: 在上述参数下进行 *E. coli*、*S. aureus*、*S. albus*、*P. aeruginosa* 和 *Salmonella* 的拉曼光谱数据采集, 采用最小二乘法和权重法对原始数据进行数据预处理, 去除极端高强度光谱, 得到拉曼光谱数据库的待用数据集。

(4) 模型建立: 将待用数据集的 75% 进行训练, 剩余 25% 用作验证, 以灵敏度(sensitivity)和特异性(specificity)为评价指标对 *E. coli*、*S. aureus*、*S. albus*、*P. aeruginosa* 和 *Salmonella* 进行识别分类。

(5) *E. coli* 的存放时间对单细菌拉曼光谱信息的影响: 选取菌液存放时间为 0、12、24、36、48、60 和 72 h 的 *E. coli* 作为研究对象并制备样本, 分别吸取 1 μL 待测样本滴加在铝基板

上, 干燥待测。使用软件(仪器自带)进行光谱采集。观察拉曼光谱的重复性, 并采用 SVM 模型进行识别分类。

2 结果与分析

2.1 不同激发波长下 *E. coli* 的重复性分析

在光谱采集参数激光强度为 6 mW、积分时间为 10 s、物镜倍数为 100 \times 时, 3 种激发波长的测试结果如图 4 所示。由图 4A 可知, 在激发波长为 532 nm 的激光下, *E. coli* 的拉曼光谱重复性好。其中, 720 cm^{-1} 峰为腺嘌呤特征峰, 784 cm^{-1} 峰为 DNA 中 O–P–O 伸缩振动峰, 826 cm^{-1} 为酪氨酸呼吸振动峰, 855 cm^{-1} 峰为络氨酸特征吸收峰, 1 003 cm^{-1} 峰归属于类胡萝卜素的甲基变形 ν_3 带。1 048 cm^{-1} 峰归属于碳水化合物, 1 231 cm^{-1} 峰为由 C–N 伸缩振动和 N–H 耦合产生的酰胺 III 带特征峰, 1 340 cm^{-1} 峰为核酸特征峰, 1 448 cm^{-1} 峰为 CH_2 剪切振动峰, 1 579 cm^{-1} 峰归属于核酸嘧啶环和血红素蛋白, 1 605 cm^{-1} 峰归属于苯丙氨酸和酪氨酸的 C=C 平面弯曲, 1 662 cm^{-1} 峰为核酸特征峰。由图 4A 可知, *E. coli* 的拉曼光谱特征峰峰位及信号幅值稳定。如在激光波长为 633 nm 的激光下, *E. coli* 拉曼光谱的重复性依旧较好, *E. coli* 拉曼光谱的 855、1 003、1 048、1 231、1 340、1 448 和 1 662 cm^{-1} 特征峰峰位及信号幅值较稳定(图 4B)。在激发波长为 785 nm 的激光下, *E. coli* 拉曼光谱的重复性较差, 虽然 1 003 cm^{-1} 和 1 448 cm^{-1} 特征峰信号幅值较稳定, 但 *E. coli* 拉曼光谱的特征峰数量降低(图 4C)。如在激发波长为 532 nm 和 633 nm 的激光下, *E. coli* 拉曼光谱一致性较高; 在激发波长为 785 nm 的激光下, *E. coli* 的信号幅值高, 但特征峰峰位数量很少, 光谱质量不高(图 4D)。

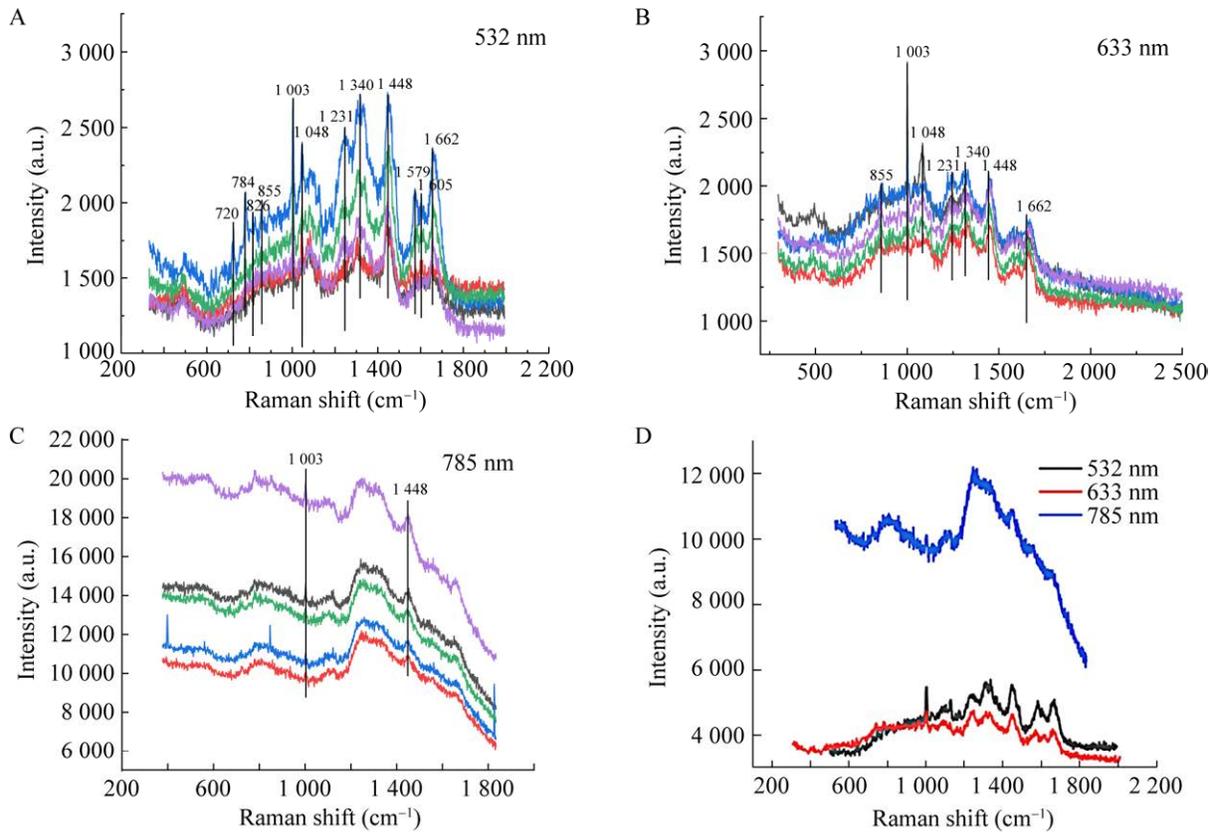


图 4 不同激发波长激光下 *Escherichia coli* 拉曼重复性测试 A: 激发波长为 532 nm 的激光下 *E. coli* 拉曼重复性测试; B: 激发波长为 633 nm 的激光下 *E. coli* 拉曼重复性测试; C: 激发波长为 785 nm 的激光下 *E. coli* 拉曼重复性测试; D: 3 种激发波长下 *E. coli* 拉曼光谱对比

Figure 4 *E. coli* Raman repeatability test under different excitation wavelength laser. A: *E. coli* Raman repeatability test under laser with excitation wavelength of 532 nm; B: *E. coli* Raman repeatability test under laser with excitation wavelength of 633 nm; C: *E. coli* Raman repeatability test under laser with excitation wavelength of 785 nm; D: Comparison of *E. coli* Raman spectra under 3 excitation wavelengths.

由图 4D 可以看出, 激发波长为 532 nm 和 633 nm 时 *E. coli* 的重复性均较好, 特征峰峰值及信号幅值稳定, 一致性较高。因此, 选取 6 个关键特征峰计算 2 种激发波长下的信噪比以选择最佳激发波长, 结果详见表 1。

由表 1 结果可知, 激发波长为 532 nm 时 SNR 整体效果较优。

2.2 5 种细菌的单细菌拉曼光谱归属分析

选择激发波长为 532 nm, 激光强度为 6 mW, 积分时间为 10 s, 进行 5 种细菌的单

表 1 不同激光强度下 *Escherichia coli* 同一特征峰的信噪比

Table 1 Signal-to-noise ratio of the same characteristic peak of *Escherichia coli* under different laser intensities

拉曼光谱峰值 Raman spectra peak (cm ⁻¹)	532 nm	633 nm
720	4.752	3.766
784	5.506	3.468
1 003	8.200	8.480
1 048	3.684	2.841
1 340	6.040	3.062
1 448	9.135	5.810

菌共焦拉曼光谱探测, 结果如图 5 所示。在 5 种细菌的单细菌拉曼光谱中, 855、1 126、1 231、1 448、1 579 和 1 662 cm^{-1} 峰是 5 种细菌共有的特征峰。其中, 855 cm^{-1} 峰为络氨酸特征吸收峰, 1 126 cm^{-1} 峰为 $\nu(\text{C}-\text{C})$ 反式构象的脂质酰基结构特征峰, 1 231 cm^{-1} 峰为由 C-N 伸缩振动和 N-H 耦合产生的酰胺 III 带特征峰, 1 448 cm^{-1} 峰为 CH_2 剪切振动峰, 1 579 cm^{-1} 峰归属于核酸嘧啶环和血红素蛋白, 1 662 cm^{-1} 峰为核酸特征峰。784 cm^{-1} 峰为 *S. albus*、*E. coli* 和 *S. aureus* 共有的可溶性蛋白特征峰, 可溶性蛋白中的 784 cm^{-1} 附近峰归属于 DNA 中 O-P-O 伸缩振动峰; 1 003 cm^{-1} 峰为 *E. coli*、*S. aureus* 和 *Salmonella* 共有特征峰, 归属于类胡萝卜素的甲基变形 ν_3 带; 1 605 cm^{-1} 峰为 *E. coli*、*S. aureus*、*Salmonella* 和 *P. aeruginosa* 共有特征峰, 归属于苯丙氨酸和酪氨酸的 C=C 平面弯曲; 1 340 cm^{-1} 峰为 *E. coli*、*S. albus* 和 *Salmonella* 共有的核酸特征峰。*S. albus* 的拉曼光谱中, 748 cm^{-1} 峰为色氨酸的对称呼吸振动峰, 1 311 cm^{-1} 峰归属于细胞色素 C。*E. coli* 的拉

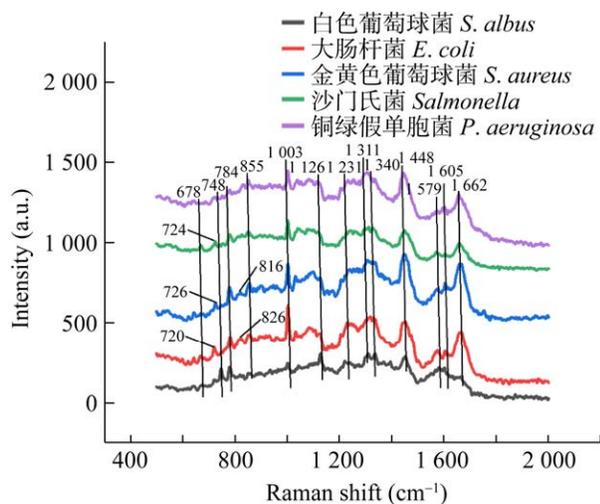


图 5 5 种细菌的单细菌拉曼光谱

Figure 5 Raman spectra of five bacteria.

曼光谱中, 720 cm^{-1} 为腺嘌呤特征峰; *S. aureus* 的拉曼光谱中, 726 cm^{-1} 峰归属于蛋白质中的 C-S 键和 CH_2 振动峰。*Salmonella* 的拉曼光谱中, 678 cm^{-1} 峰归属于 DNA 碱基中的环呼吸模式鸟嘌呤特征峰, 724 cm^{-1} 峰为腺嘌呤特征吸收峰。经过 5 种细菌的拉曼特征峰归属分析, 可以看出 5 种细菌的拉曼光谱之间存在较明显差异。

2.3 基于 SVM 模型对 5 种细菌的分类结果

为了实现 5 种细菌的快速鉴别分类, 采用 SVM 模型方法进行统计分析, *E. coli*、*S. aureus*、*S. albus*、*P. aeruginosa* 和 *Salmonella* 的拉曼光谱数据采集结果见表 2。采集数据中的 75% 数据作为细菌拉曼光谱数据库中的训练数据集, 25% 数据作为验证数据集。

由表 3 可知, SVM 模型的整体准确率在 98.25%。其中, *S. albus*、*E. coli*、*S. aureus*、*Salmonella* 和 *P. aeruginosa* 的灵敏度和特异性都非常高, 均达到了 96.00% 以上。

2.4 不同存放时间的 *E. coli* 拉曼光谱结果

(1) *E. coli* 拉曼光谱的重复性和不同存放时间下光谱对比。

将 *E. coli* 洗涤 4 次后, 滴加到铝基板上干燥后进行共焦拉曼测试, 结果如图 6 和图 7 所示。随着存放时间的增加, *E. coli* 逐渐有破损断裂的菌体出现。由于是单细菌检测, 在实验过程中需要选择完好的菌体进行测试, 避免已降解细菌对光谱信息的干扰。

表 2 拉曼光谱数据集

Table 2 Raman spectrum data set

细菌 Bacteria	光谱数量 Number of spectra
<i>S. albus</i>	434
<i>E. coli</i>	314
<i>S. aureus</i>	275
<i>Salmonella</i>	133
<i>P. aeruginosa</i>	184

表 3 SVM 模型分类结果

Table 3 Classification results of SVM model

细菌 Bacteria	<i>S. albus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Sensitivity (%)	Specificity (%)
<i>S. albus</i>	104	0	4	0	0	96.30	100.00
<i>E. coli</i>	0	77	0	1	0	98.72	99.62
<i>S. aureus</i>	0	1	67	0	0	98.53	98.54
<i>Salmonella</i>	0	0	0	33	0	100.00	99.68
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	46	100.00	100.00

如图 8 和图 9 所示, 存放时间为 0、12、24、36、48、60 和 72 h 的 *E. coli* 重复性好, 光谱一致性好。结果表明, 每个存放时间 *E. coli* 的光谱信息都比较稳定。为了观察不同存放时间 *E. coli* 之间的差异, 对每个时间的拉曼光谱进行平均处理, 获得的结果如图 10 所示。*E. coli* 的拉曼特征峰无偏移, 一致性好, 表明在共聚焦显微拉曼系统的检测下能够在激发光激发前期排除已降解的 *E. coli* 的干扰, 存放时间对目标体系的 *E. coli* 拉曼光谱信息几乎无干扰。

(2) 不同存放时间的 *E. coli* 拉曼光谱的识别分类结果。

选择 SVM 模型对不同存放时间的 *E. coli* 拉曼光谱进行分类, 采集的 *E. coli* 拉曼数据验证集见表 4, 具体结果见表 5。0、12、24、36、48、60 和 72 h 均能准确匹配到 *E. coli*, 且



图 6 存放时间 0 h 的 *Escherichia coli* 显微镜图像
Figure 6 Microscopic picture of *Escherichia coli* stored for 0 h.

匹配率均在 90% 以上。这表明了不同存放时间对 *E. coli* 拉曼光谱的归类识别几乎无影响。

3 讨论与结论

拉曼光谱技术, 尤其是表面增强拉曼光谱技术, 因其测定时间短、灵敏度高等特点一直被广泛应用于材料科学领域^[14-19]。随着对拉曼光谱的深入研究, 研究人员发现拉曼光谱具有免标记、非侵入、非破坏、快速实时、样品用量少等优势, 开始逐步应用于生物医学领域及临床医学领域^[20-22]。Brozek-Pluska 等^[23]介绍了拉曼光谱和红外光谱技术在人类乳腺组织样本中的应用进展, 表明拉曼光谱技术可为医务人员提供所需成分的完整信息。Tong 等^[24]基于拉曼光谱技术, 通过应用自适应迭代加权惩罚最小二乘法、主成分分析法和支持向量机等方法实现了血清样本中乙型肝炎病毒感染的检测。Correia 等^[25]利用拉曼光谱技术筛查前列腺特异性抗原变化的前列腺疾病患者, 同时结合偏最小二乘回归分析对可能患有前列腺癌的人进行早期诊断。这些方法都是通过采集病原菌的集群信号并对其进行分析, 从而实现相关病原菌的检测与鉴别。

虽然拉曼光谱技术的应用领域十分广泛, 但是基于单细菌拉曼光谱的细菌种类快速鉴定方面的研究仍然较少, 尤其是结合了深度学习模型进行细菌鉴别方向的研究。本研究基于

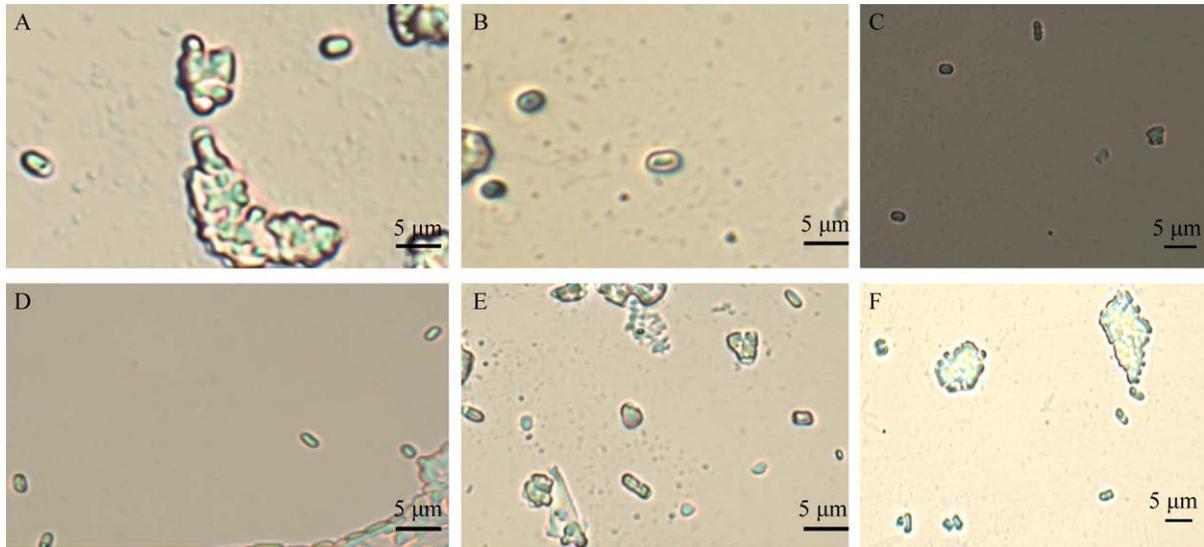


图 7 不同存放时间的 *Escherichia coli* 显微镜图像 A: 存放时间为 12 h; B: 存放时间为 24 h; C: 存放时间为 36 h; D: 存放时间为 48 h; E: 存放时间为 60 h; F: 存放时间为 72 h

Figure 7 Microscopic pictures of *Escherichia coli* stored for different times. A: Storage time is 12 h; B: Storage time is 24 h; C: Storage time is 36 h; D: Storage time is 48 h; E: Storage time is 60 h; F: Storage time is 72 h.

对单个细菌采集拉曼光谱并结合深度学习的方法, 通过构建 SVM 模型的训练集和测试集, 探究基于拉曼光谱进行单细菌鉴别的可行性。与此同时, 关于共焦拉曼技术的不同激发波长对细菌检测影响方面的研究及不同存放时间对

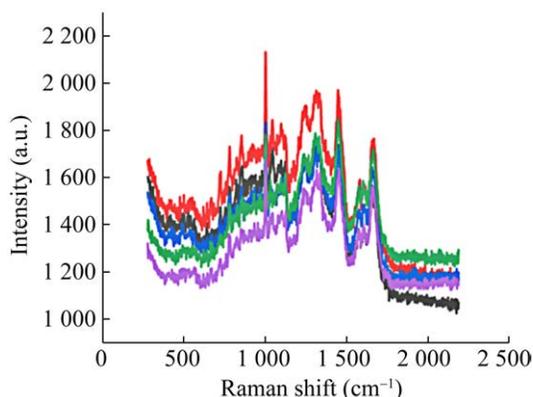


图 8 存放时间 0 h 的 *Escherichia coli* 拉曼光谱重复性测试

Figure 8 Repeatability test of Raman spectra of *Escherichia coli* stored for 0 h.

细菌拉曼光谱影响方面的研究也较为少见^[26]。

本研究首先以 *E. coli* 为研究对象, 进行了 532、633 和 785 nm 这 3 种激发波长下的拉曼光谱对比分析实验。实验结果表明, 在 532 nm 激发波长下, *E. coli* 拉曼光谱的重复性良好, 其特征峰峰位和信号幅值稳定; 在 633 nm 激发波长下, *E. coli* 拉曼光谱的重复性依旧良好, 特征峰峰位和信号幅值比较稳定, 但特征峰信噪比相对 532 nm 激发波长较差; 在 785 nm 激发波长下, *E. coli* 拉曼光谱的重复性较差, 其信号幅值比较稳定, 但特征峰数量明显降低, 导致光谱分辨率不高。因此, 532 nm 激发波长下 *E. coli* 拉曼光谱的性能最优。

其次, 对 *S. albus*、*E. coli*、*S. aureus*、*Salmonella*、*P. aeruginosa* 等 5 种细菌进行了无增减的拉曼光谱采集, 建立了 SVM 模型后对 5 种细菌进行鉴别, 验证了基于单细菌共焦拉曼技术进行细菌快速鉴定的可行性。由分类结

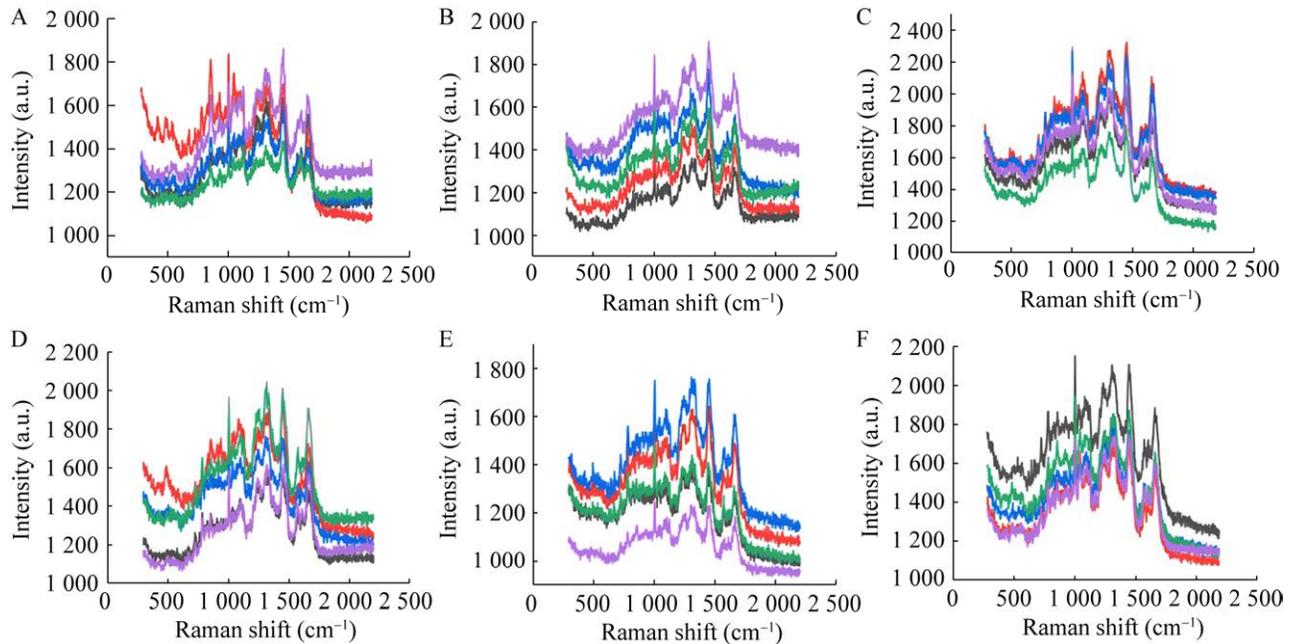


图 9 不同存放时间的 *Escherichia coli* 拉曼光谱重复性测试 A: 存放时间为 12 h; B: 存放时间为 24 h; C: 存放时间为 36 h; D: 存放时间为 48 h; E: 存放时间为 60 h; F: 存放时间为 72 h

Figure 9 Repeatability test of Raman spectra of *Escherichia coli* stored for different time. A: Storage time is 12 h; B: Storage time is 24 h; C: Storage time is 36 h; D: Storage time is 48 h; E: Storage time is 60 h; F: Storage time is 72 h.

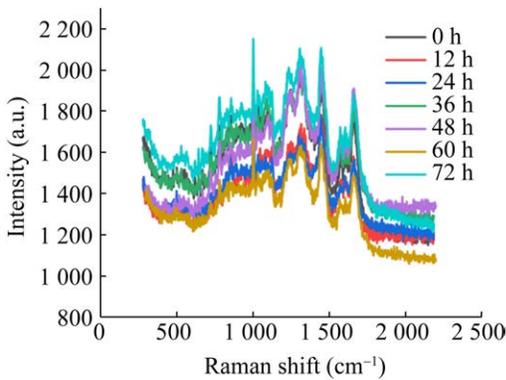


图 10 不同存放时间的 *Escherichia coli* 拉曼光谱
Figure 10 Raman spectra of *Escherichia coli* with different storage time.

果可知, *Salmonella*、*P. aeruginosa* 的灵敏度达到了 100%, *S. albus*、*E. coli*、*S. aureus* 的灵敏度达到了 96% 以上; *S. albus* 和 *P. aeruginosa* 的特异性达到了 100%, *E. coli*、*S. aureus* 及

表 4 不同存放时间的 *Escherichia coli* 拉曼光谱数据集

Table 4 Raman spectrum data sets of *Escherichia coli* with different storage time

存放时间 Storage time (h)	光谱数量 Number of spectra
0	28
12	20
24	23
36	20
48	22
60	21
72	32

Salmonella 的特异性均达到了 98% 以上。由于 5 种病原菌采集的拉曼光谱数量较少, 测试集和训练集数据有限, *S. albus*、*E. coli*、*S. aureus* 的灵敏度及 *E. coli*、*S. aureus* 和 *Salmonella* 的特异性都存在一定的优化空间。

表 5 不同存放时间的 *Escherichia coli* 拉曼光谱 SVM 模型识别结果Table 5 Recognition results of *Escherichia coli* Raman spectrum SVM model with different storage time

存放时间 Storage time (h)	<i>S. albus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>P. aeruginosa</i>	匹配率 Match rate (%)
0	0	26	1	1	0	92.86
12	0	18	1	1	0	90.00
24	0	21	2	0	0	91.30
36	0	18	1	0	1	90.00
48	0	20	0	1	1	90.91
60	0	19	0	0	2	90.48
72	0	29	1	1	1	90.63

最后, 对不同保存时间的 *E. coli* 拉曼光谱进行重复性测试和对比。结果表明, *E. coli* 的拉曼特征峰无偏移, 表明不同存放时间对 *E. coli* 的拉曼光谱信息几乎无干扰。经过 SVM 模型验证, 0、12、24、36、48、60 和 72 h 均能准确匹配到 *E. coli*, 并且匹配率均在 90% 以上, 表明不同存放时间对 *E. coli* 拉曼光谱的归类识别几乎无影响。

综上所述, 基于单细菌共焦拉曼光谱探测技术可以实现非标记、无增强的单细菌拉曼散射光谱探测, 未来可应用于样本浓度低、样本量少的细菌快速检测中, 实现在环境、人体等少量采样条件下即可检测细菌种类。结合 SVM 模型可以实现细菌种类的快速鉴别, 未来可通过对多种细菌建立丰富的拉曼光谱库, 并进行持续拉曼光谱采集和自主学习, 从而实现在复杂环境下、混合采样后多未知采样细菌种类的快速鉴别。

REFERENCES

- [1] 孙丹, 曹方浩, 丛丽丽, 徐蔚青, 陈奇丹, 徐抒平. 基于微流控液滴的单细胞拉曼分析技术[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(S1): 225-226
Sun D, Cao FH, Cong LL, Xu WQ, Chen QD, Xu SP. The Raman analysis for single cell based on microfluidic droplet[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2018, 38(S1): 225-226 (in Chinese)
- [2] Cui L, Yang K, Zhou GW, Huang WE, Zhu YG. Surface-enhanced Raman spectroscopy combined with stable isotope probing to monitor nitrogen assimilation at both bulk and single-cell level[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(11): 5793-5800
- [3] Zhou HB, Yang DT, Mircescu NE, Ivleva NP, Schwarzmeier K, Wieser A, Schubert S, Niessner R, Haisch C. Surface-enhanced Raman scattering detection of bacteria on microarrays at single cell levels using silver nanoparticles[J]. Microchimica Acta, 2015, 182(13/14): 2259-2266
- [4] 高鹏亚, 苏英会, 孙晖, 滕中秋, 吴长德, 史芸, 袁洪福, 刘洋, 徐雪芳. 显微共聚焦拉曼技术在细菌分类鉴定中的应用[J]. 疾病监测, 2021, 36(1): 74-81
Gao PY, Su YH, Sun H, Teng ZQ, Wu CD, Shi Y, Yuan HF, Liu Y, Xu XF. Application of micro confocal Raman technique in classification and identification of bacteria[J]. Disease Surveillance, 2021, 36(1): 74-81 (in Chinese)
- [5] Pahlow S, Meisel S, Cialla-May D, Weber K, Rösch P, Popp J. Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2015, 89: 105-120
- [6] Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Raman spectroscopy of biological tissues[J]. Applied Spectroscopy Reviews, 2007, 42(5): 493-541
- [7] 吕前辉, 王小华, 沈爱国, 胡继明. 拉曼光谱技术在现场快检分析领域中的应用[J]. 分析测试学报, 2019, 38(5): 612-617
Lü QH, Wang XH, Shen AG, Hu JM. Application of Raman spectroscopy techniques in on-site fast detection[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2019, 38(5): 612-617 (in Chinese)
- [8] Butler HJ, Ashton L, Bird B, Cinque G, Curtis K, Dorney J, Esmonde-White K, Fullwood N, Gardner B, Martin-Hirsch P, et al. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials[J]. Nature Protocols:

- Recipes for Researchers, 2016, 11(4): 664-687
- [9] Li J, Wang C, Shi L, Shao L, Fu P, Wang K, Xiao R, Wang S, Gu B. Rapid identification and antibiotic susceptibility test of pathogens in blood based on magnetic separation and surface-enhanced Raman scattering[J]. *Microchim. Acta*, 2019, 186(7): 475
- [10] Fedosov IV, Tuchin VV. European conference on biomedical optics[EB/OL]. 2001. DOI: 10.1117/12.446678
- [11] Schlomo E, Burt VB, Jozsef C. Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacteria coated by silver[J]. *Proceedings of SPIE, CA: the International Society for Optical Engineering*, 1999, 3602: 164
- [12] 高玮村, 李博, 王习文, 李乾学, 李楠, 李志萍, 夏志平. 基于表面增强拉曼技术快速检测 5 种食源性致病细菌[J]. *吉林农业大学学报*, 2017, 39(6): 733-737
Gao WC, Li B, Wang XW, Li QX, Li N, Li ZP, Xia ZP. Quick detection of five foodborne pathogenic bacteria based on surface enhanced Raman spectroscopy[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2017, 39(6): 733-737 (in Chinese)
- [13] Doughty DC, Hill SC. Automated aerosol Raman spectrometer for semi-continuous sampling of atmospheric aerosol[J]. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 2017, 188: 103-117
- [14] Huang YP, Huang SC, Wang XJ, Bodappa N, Li CY, Yin H, Su HS, Meng M, Zhang H, Ren B, et al. Shell-isolated tip-enhanced Raman and fluorescence spectroscopy[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2018, 57(25): 7523-7527
- [15] Kiefer W. Recent advances in linear and nonlinear Raman spectroscopy II[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2008, 39(12): 1710-1725
- [16] Nafie LA. Recent advances in linear and nonlinear Raman spectroscopy. Part IV[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2010, 41(12): 1566-1586
- [17] Medeiros FEO, Araújo BS, Ayala AP. Raman spectroscopy investigation of the thermal stability of the multiferroic CuCl_2 and its hydrated form[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2018, 99: 1-6
- [18] Portesi C, De Visentin D, Durbiano F, Abete MC, Rizzi M, Maurino V, Rossi AM. Development of a rapid micro-Raman spectroscopy approach for detection of NIAS in LDPE pellets and extruded films for food packaging applications[J]. *Polymer Testing*, 2019, 80: 106098
- [19] Chen JX, Zhong ZX, Su ZH, Li ZP, Weng ZF, Luo SY. Analysis of defects in biaxially oriented polypropylene films by micro-Fourier transform infrared and Raman spectroscopies[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 48(10): e20134-e20138
- [20] Tanwar S, Paidi SK, Prasad R, Pandey R, Barman I. Advancing Raman spectroscopy from research to clinic: translational potential and challenges[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 260: 119957
- [21] Bratchenko LA, Khristoforova YA, Moryatov AA, Bratchenko IA. Raman spectroscopy based diagnosis of dermatofibrosarcoma protuberans: case report[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2021, 35: 102351
- [22] Brozek-Pluska B, Dziki A, Abramczyk H. Virtual spectral histopathology of colon cancer-biomedical applications of Raman spectroscopy and imaging[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 303: 112676
- [23] Brozek-Pluska B, Kopec M, Surmacki J, Abramczyk H. Histochemical analysis of human breast tissue samples by IR and Raman spectroscopies. Protocols discussion[J]. *Infrared Physics & Technology*, 2018, 93: 247-254
- [24] Tong DN, Chen C, Zhang JJ, Lv G, Zheng XX, Zhang ZX, Lyu X. Application of Raman spectroscopy in the detection of hepatitis B virus infection[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2019, 28: 248-252
- [25] Correia NA, Batista LTA, Nascimento RJM, Cangussú MCT, Crugeira PJL, Soares LGP, Silveira Jr L, Pinheiro ALB. Detection of prostate cancer by Raman spectroscopy: a multivariate study on patients with normal and altered PSA values[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2020, 204: 111801
- [26] Singh N, Kumar P, Riaz U. Applications of near infrared and surface enhanced Raman scattering techniques in tumor imaging: a short review[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 222: 117279