

傅立叶变换红外光谱技术对 3种李斯特氏菌的快速分类鉴定

杨丽君^{1,2}, 李兆杰¹, 王静¹, 王骏^{*3}, 胡巧茹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; 3. 山东出入境检验检疫局, 山东 青岛 266001)

摘要: 为建立李斯特氏菌属内单核细胞增生李斯特氏菌、绵羊李斯特氏菌、英诺克李斯特氏菌 3 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, 作者应用 FT-IR 技术对 3 种李斯特氏菌进行指纹图谱数据采集, 建立了 3 种李斯特氏菌的标准 FT-IR 导数谱数据库, 同时结合化学计量学分析方法, 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。结果表明, 两种聚类模型均可成功将 3 种李斯特氏菌进行区分, FT-IR 光谱数据库可用于 FT-IR 技术对 3 种可疑李斯特氏菌进行鉴定。FT-IR 分析方法简便、快速、易操作, 结果重现性好, 是一种区分 3 种李斯特氏菌的有效方法。

关键词: 傅立叶变换红外光谱; 李斯特氏菌; 主成分分析; 分级聚类分析; 分类; 鉴定

中图分类号: Q 31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)02—0169—05

Rapid Differentiation and Identification of Three Species of *Listeria* by FT-IR Spectroscopy

YANG Li-jun^{1,2}, LI Zhao-jie¹, WANG Jing¹, WANG Jun^{*3}, HU Qiao-ru¹, LIU Yu-min¹, CUI Feng-jie¹

(1. Weihai Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Weihai 264205, China; 2. Yantai Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai 26400, China; 3. Shandong Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266001, China)

Abstract: To establish a standard fourier transform infrared (FT-IR) spectral library and a FT-IR method of differentiation and identification of three species of *Listeria*, viz *Listeria monocytogenes*, *Listeria iuanuii* and *Listeria innocua*, FT-IR fingerprint absorption spectra of three species of *Listeria* were collected, and a standard spectral derivatives library was created. Combined with chemometrics methods, two cluster models of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were established. It was found that three species of *Listeria* could be well differentiated and identified, and the standard spectral derivatives library created could be used to

收稿日期: 2012-04-11

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科研项目(2010IK151; 2012IK179)。

作者简介: 杨丽君(1969—), 女, 山东威海人, 理学硕士, 高级工程师, 主要从事微生物学方面的研究。E-mail: lizhaojie8102@yahoo.cn

* 通信作者: 王骏(1978—), 男, 山东青岛人, 理学硕士, 工程师, 主要从事光谱及化学检验方面的研究。E-mail: hunterlee_81@163.com

compare with those of target *Listeria* and identify them. As a rapid, easy-to-use and accurate technique, FT-IR spectroscopy is an effective tool to differentiate and identify three species of *Listeria* studied here.

Keywords: Fourier transformation infrared spectroscopy, *Listeria*, PCA, HCA, differentiation, identification

傅立叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared, 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^[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]。

单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, *L. monocytogenes*)、绵羊李斯特氏菌 (*Listeria ivanuii*, *L. ivanuii*)、英诺克李斯特氏菌 (*Listeria innocua*, *L. innocua*) 是李斯特氏菌属中常见的几种菌, 传统方法区分各种李斯特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, 如基于细菌的特异性基因对目标菌的快速分类鉴定^[3]。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 M A Miguel Gómez 等^[4]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, Ceccilia A Rebuffo-Scheer 等^[5]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, Bartłomiej Dziuba 等^[6]对乳杆菌属内细菌在种水平上进行了较好的分类鉴定。作者应用傅立叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 技术, 结合化学计量学运算, 探

讨 FT-IR 技术对李斯特氏菌属内 3 种李斯特氏菌的分类鉴定情况。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种 *L. monocytogenes*, *L. ivanuii* 和 *L. innocua*: 购自美国模式培养物集存库 (ATCC), 从 -70 °C 接种到营养肉汤中, 37 °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 MΩ; 0.9 g/dL 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 设备与材料

ZnSe 窗片: 透过波长 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±1) °C 恒温恒湿培养箱: 3M 公司; 45 °C 干燥箱: 3M 公司; VERTEX70 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 样品制备 用无菌接种环挑取 *L. monocytogenes*, *L. ivanuii* 和 *L. innocua* 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±1) °C 培养 18~24 h, 并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 g 离心 5 min, 吸弃上清液, 加入 1 mL 无菌生理盐水悬浮洗涤, 5 000 g 离心 5 min, 再加入 1 mL 超纯水悬浮洗涤, 5 000 g 离心 5 min, 超纯水重复洗涤两次。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 °C 干燥箱中烘干至无水分的干燥菌斑。

1.3.2 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CO₂的吸收光谱干扰)。实验参数为:波段范围4 000~600 cm⁻¹[7-10],光谱分辨率4 cm⁻¹,64次光谱累计求平均[6]。

1.3.3 光谱处理及数据分析 每种菌至少做6次试验,每次做3个重复,取平均值。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波数范围光谱首先进行一阶导数(平滑点选择9点)运算得到导数谱,再对导数谱进行矢量归一化处理,得到归一化后的导数谱。将归一化后的导数谱转化为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3种李斯特氏菌FT-IR光谱的主成分聚类分布图和树状聚类分布图。

2 结果与讨论

2.1 平均光谱及FT-IR导数谱数据库的建立

利用OPUS 6.5软件,首先对李斯特氏菌属内3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波数范围光谱首先进行一阶导数(平滑点选择9点)运算得到导数谱,再对导数谱进行矢量归一化处理,得到归一化后的导数谱,即建立了李斯特氏菌属内*L. monocytogenes*、*L. ivanuii*和*L. innocua*3种菌的FT-IR导数谱数据库。对各菌处理后的导数谱取平均,即得到各菌的平均光谱,见图1。处理后,光谱间的差异仍然难以用肉眼区分,需借助计算机进行区分。

2.2 主成分分析(PCA)

对李斯特氏菌属内3种菌的光谱数据进行PC分析,以主成分1(PC1)和主成分2(PC2)作为聚类依据,得到主成分聚类分布图,见图2。由图2可知,PC分析可以将*L. monocytogenes*、*L. ivanuii*、*L. innocua*3种李斯特氏菌进行较好聚类。PC1和PC2对于聚类的贡献率分别为42.7%、32.9%,说明PC1和PC2代表了样品中绝大多数的信息,采用前2个主成分建立的聚类分析模型是具有代表性的,两主成分PC1和PC2权重见图3,权重较大的波段对定量分

析模型的贡献也较大。

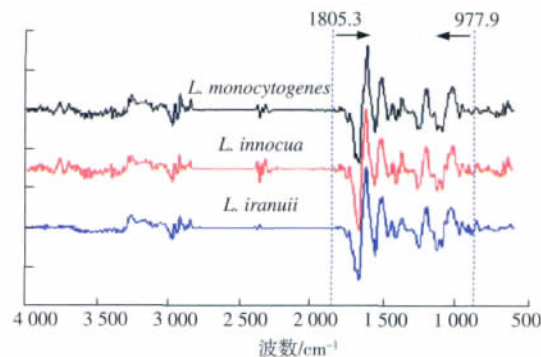


图1 3种李斯特氏菌的平均FT-IR导数谱

Fig. 1 Average FT-IR spectral derivatives of three species of *Listeria*

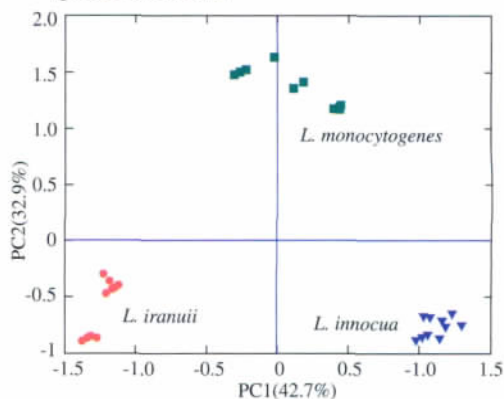


图2 3种李斯特氏菌PCA聚类分布图

Fig. 2 PCA cluster results of FT-IR spectra of three species of *Listeria*

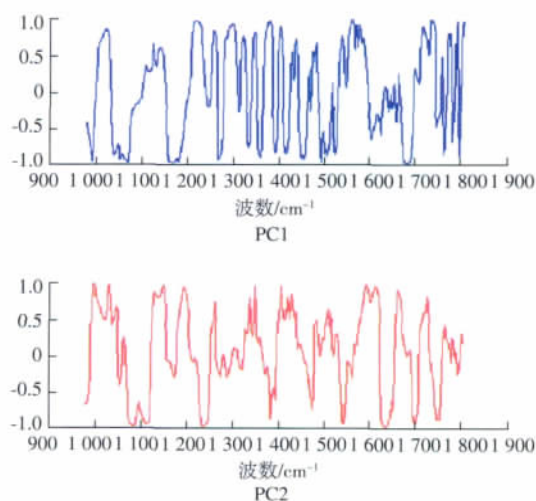


图3 PC1、PC2图

Fig. 3 Loading plots of PC1 and PC2 obtained from PCA analysis of FT-IR spectra of three species of *Listeria*

2.3 分级聚类分析(HCA)

对3种李斯特氏菌的光谱数据进行HC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。由图可知, HC 分析可以将 3 种李斯特氏菌进行较好聚类。

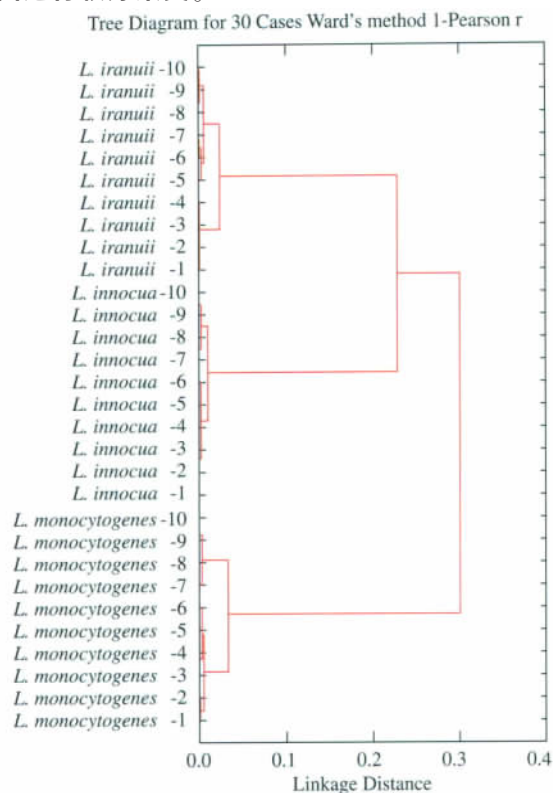


图 4 3 种李斯特氏菌 HCA 聚类树状图
Fig. 4 HCA cluster results of FT-IR spectra of three species of *Listeria*

3 结 语

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。作者通过对李斯特氏菌属内 3 种菌的 FT-IR 光谱进行处理, 得到了 *L. monocytogenes*、*L. iuanuii*、*L. innocua* 3 种李斯特氏菌的 FT-IR 导数谱数据库, 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 方法对合并后的导数谱数据进行聚类分析, 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 方法均能对李斯特氏菌属内 3 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^[12-13]。PCA 可以在不降低光谱差异的前提下, 减少数据维数^[11]。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, 常用的距离为皮尔森积矩相关系数和欧氏距离, 算法一般为 Ward's 和 UPGMA, 算法不同, 得到的光谱簇间距离也不同^[12]。

本研究一方面建立了 *L. monocytogenes*、*L. iuanuii*、*L. innocua* 3 种李斯特氏菌的标准 FT-IR 导数谱数据库, 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 3 种李斯特氏菌进行区分。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 3 种李斯特氏菌的有效方法。

参考文献:

- [1] Naumann, D. Some ultrastructural information on intact, living bacterial cells and related cell-wall fragments as given by FTIR[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): 81.
- [3] 翁仕强, 赵勇, 潘迎捷, 等. 基于特异性基因的副溶血性弧菌快速分离鉴定[J]. *食品与生物技术学报*, 30(3): 417-421.
WENG Shi-qiang, ZHAO Yong, PAN Ying-jie, et al. Rapid isolation and identification method based on specific gene for *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 30(3): 417-421. (in chinese)
- [4] Miguel Gómez M A, Bratos Pérez M A, Martín Gil F J, et al. Identification of species of *Brucella* using Fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003(55): 121-131.
- [5] Rebuffo-Scheer C, Carolin Kirschner, Maren Staemmler, et al. Rapid species and strain differentiation of non-tuberculous mycobacteria by Fourier-Transform Infrared microspectroscopy[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007(68): 282-290.
- [6] 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): 183-189.

- [7] Beattie S H, 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):201-206.
- [8] 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**, 1991a(137):69-79.
- [9] Lin M, Al-Holy M, Chang S S, et al. Rapid discrimination of *Alicyclobacillus* strains in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2005(105):369-376.
- [10] Rodriguez-Saona L E, Khambaty F M, Fry F S, et al. Rapid detection and identification of bacterial strains by Fourier transform nearinfrared spectroscopy[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2001(49):574-579.
- [11] 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, 11(30):2945-2949.
YUE Tian-li, WANG Jun, YUAN Ya-hong, et al. Rapid identification of microorganisms based on Fourier transform near infrared spectroscopy[J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, 2010, 11(30):2945-2949. (in Chinese)
- [12] 任玉林, 郇春亭, 逯家辉, 等. 近红外漫反射光谱的主成份分析[J]. **光谱学与光谱分析**, 1996, 16(6):31.
REN Yu-lin, BING Chun-ting, LU Jia-hui, et al. Principal component analysis of near-infrared diffuse reflectance spectra[J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, 1996, 16(6):31. (in Chinese)

会议信息

会议名称(中文): 美国毒理学会第五十二届年会

会议名称(英文): SOT 2013

所属学科: 病毒与免疫学, 医学免疫学, 生理学与病理学, 药学, 公共卫生与预防医学

开始日期: 2013-03-10

结束日期: 2013-03-14

所在国家: 美国

具体地点: 德克萨斯州圣安东尼奥

主办单位: 美国毒理学会

摘要截稿日期: 2012-10-03

参会报名截止日期: 2013-02-15

联系人: Tina Giovanini

联系电话: 703.438.3115 ext. 1454

E-MAIL: tina@toxicology.org

会议网站: <http://www.toxicology.org/AI/MEET/AM2013/>

会议名称(中文): 2013 年微生物前沿研究国际会议

会议名称(英文): 2013 International Conference on Advances in Microbiology Research(ICAMR)

所属学科: 动植物微生物学, 细胞生物学, 生物技术与生物工程, 病毒与免疫学, 医学免疫学

开始日期: 2013-04-19

结束日期: 2013-04-21

所在城市: 北京市 东城区

主办单位: Society for Applied Microbiology American Society for Microbiology International Association on Management Science and Engineering Technology(IAMSET)

[组织结构] 会议主席: Prof. Roger W. Chan, University of Texas, Southwestern Medical Center, USA

全文截稿日期: 2012-09-25

论文录用通知日期: 2012-10-10

[会务组联系方式] 联系人: Contact Organization Committee

联系电话: +86-371-5562 6594

E-MAIL: icamr2013@163.com

会议网站: <http://www.easyeditor.org/icamr/>