

小型荧光激光雷达测量六种典型生物战剂模拟物二维荧光光谱

杨 辉¹, 马修兵², 孙彦飞¹, 王铁栋¹, 庆 丰¹, 赵雪松³

1. 中国人民解放军陆军炮兵防空兵学院, 安徽 合肥 230031

2. 安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230031

3. 中国科学院安徽光学精密机械研究所, 安徽 合肥 230031

摘 要 对成团泛菌(*Pan*)、金黄色葡萄球菌金黄色种(*Sta*)、球芽孢杆菌(*BG*)和大肠杆菌(*EH*)四种生物战剂模拟物进行了培养和生长曲线测定, 四种菌的代时分别为 0.99, 0.835, 1.07 和 1.909 h; 设计研制了近场小型荧光测量激光雷达, 266 和 355 nm 波长分别用于测量生物战剂模拟物氨基酸段和 NADH 段二维荧光光谱; 在可控的荧光测量腔室, 测得了分辨率为 4 nm 的营养态细菌液态气溶胶以及牛血清(BSA)、卵清蛋白(OVA)两种毒素类模拟物液态气溶胶的二维荧光光谱; 二维荧光光谱数据表明, *Pan*, *Sta*, *BG*, *EH*, BSA 和 OVA 气溶胶, 在氨基酸段的荧光谱形与标准荧光组分色氨酸较为一致, FWHM 为 60 nm, 受培养生化环境、细菌内部荧光组分及比例的影响, 荧光分子激发态与基态间的能量差增大, 荧光谱带均存在不同程度的蓝/紫移; 在 *Pan*, *Sta*, *BG* 和 *EH* 营养细菌气溶胶中均检出了较弱的 NADH 荧光组分, 且水、氮等的拉曼散射不能完全扣除, 光谱锯齿严重, FWHM 为 100 nm; 二阶求导后的二维荧光光谱表明, 荧光谱的高阶处理和分辨识别是可行的。

关键词 生物战剂; 模拟物; 近场荧光激光雷达; 导数荧光光谱

中图分类号: TN247 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)03-0802-05

引 言

生物战剂在大气中的散布能对军民用设施和人员造成极大的危害, 目前缺乏切实有效的探测和识别手段^[1]。对生物战剂的遥测和先期预警, 避免和减少人员、设施和装备伤亡, 尤为重要。在光学生物战剂遥感领域, UV-LIF 在探测和识别方面发展迅速。原则上, 蛋白质、病毒、细菌和其他生物有机物, 至少含有一种以上的荧光团, 可以在特定紫外光的激励下发射出荧光, 且这些生物物质发出的荧光, 与其所含生物荧光团的特定分子结构、外部环境或溶质的物化特性等密切相关, 因而在荧光谱特征方面表现出极大的差异性^[2-3]。

成团泛菌 *Pantoea agglomerans* (*Pan*) 原名草生欧氏杆菌是植物体上常见的附生菌, 是土拉杆菌的模拟物; 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (*Sta*) 是一种重要的条件致病菌, 广泛分布于自然界, 可以引起人和动物的软组织感染, 并可导致生命威胁的肺炎、菌血症及包括心内膜炎、脓毒性关节炎、骨髓炎等的严重并发症, 还能引发食物中毒及中毒

性休克综合症等, 占社区和医院感染源的 60% 和 80%; 大肠杆菌 *Escherichia coli* (*EH*) 广泛分布于自然界, 包括腐生菌、寄生菌和人和动物的病原菌, 多数是人和动物肠道正常菌群的重要成员, 1949 年—1969 年的 20 年间, 美国军方在狄特里克堡试验场、道格威试验场和陆军化学中心等 34 个非公共场大约进行了 108 次曲霉菌和大肠杆菌模拟生物战剂测试; 球芽孢杆菌 *Bacillus globigii* (*BG*) 是炭疽杆菌的非致病性模拟物, 其孢子形态形状与炭疽杆菌极为相近, 休眠孢子可以抵御多数苛刻恶劣的外部环境, 在环境适宜时则迅速生长。2000 年前后的数十年, 加拿大国防部, 就一直持续地将球芽孢杆菌作为炭疽杆菌进行研究。成团泛菌、大肠杆菌为革兰氏阴性杆菌, 球芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性球菌。

数十年来, 大多数学者都将工作聚焦在生物战剂光学(如荧光, 磷光)遥测领域, 极少对生物战剂模拟物的选择、培养及荧光光谱等方面的研究进行报道^[4-8]。本工作对成团泛菌、金黄色葡萄球菌、球芽孢杆菌和大肠杆菌四种常见的细菌类生物战剂模拟物^[9]的培养和荧光光谱测定, 以及两种毒素类生物战剂模拟物的荧光光谱测定情况进行了报道, 对

收稿日期: 2017-06-26, 修订日期: 2017-12-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(41375026)资助

作者简介: 杨 辉, 1974 年生, 中国人民解放军陆军炮兵防空兵学院副教授 e-mail: sanpedroman@163.com

光谱特征进行了分析,并讨论了光谱指纹特征的抽取方法,为生物战剂荧光光谱特征数据库的建立,打下了基础。

1 材料及荧光测量平台

1.1 生物战剂模拟物

选取了四种典型细菌类生物战剂模拟物和两种毒素类生物战剂模拟物,其中,细菌类模拟物为成团泛菌、金黄色葡萄球菌金黄色亚种 *Staphylococcus aureus subsp. Aureus*(*Sta*)、大肠杆菌(大肠埃希氏菌)和球芽孢杆菌,毒素类模拟物为牛血清 BSA 和卵清蛋白 OVA。BSA 和 OVA 均来自 Sigma Aldrich,成团泛菌、金黄色葡萄球菌金黄色亚种、大肠杆菌(大肠埃希氏菌)和球(芽孢)杆菌均购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,编号分别为 CGMCC 1.4006, CGMCC 1.128, CGMCC 1.2812 和 CGMCC 1.1202。

1.2 菌种复壮与培养

用浸过 75%酒精的脱脂棉严格消毒冷冻管,在超净台(名牌之星,型号 SW-CJ-1D)无菌环境中旋开装有复溶液的滴瓶盖,取约 1 mL 复溶液,加入到冷冻管中,轻轻振荡,使冻干菌株溶解呈悬浮状。用无菌吸管吸取菌悬液,转移到复溶液滴瓶中。做好标识,在 HNY-2102C 立式恒温振荡培养箱(天津欧诺)中适宜温度下培养。成团泛菌和大肠杆菌的培养基为 LB 培养基,金黄色葡萄球菌和球芽孢杆菌的培养基为 TSB 培养基,配制好后用高压蒸汽灭菌 17 min。TSB, LB 培养基的 pH 测定和调节由 pH 计(Sartorius,型号 PB-10)完成。成团泛菌和球芽孢杆菌的培养温度为 30 °C,金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的培养温度为 37 °C。

1.3 荧光测量平台

荧光物质在紫外激光的激励下,会辐射出宽谱荧光,不便于类型的识别。为提高类型辨识能力,激光器输出的 3 倍频 355 nm、4 倍频 266 nm 波长激光,分别用于氨基酸荧光分子、NADH 和维生素 B 荧光的荧光和偏振测量,355 和 266 nm 两个波长的激光能量脉宽均为 5 ns,脉冲能量约为 5 mJ,重复频率为 10 Hz。荧光信号由 400 mm 口径的牛顿型望远镜收集,并由光谱仪进行分析,其分辨率为 2/4 nm。荧光的探测范围为 250~650 nm,探测距离不小于 20 m。图 1 为近场激光雷达的荧光测量原理图。

2 四种菌的生长曲线测定

2.1 样品准备和测定方法

在振荡培养箱里,对成团泛菌、金黄色葡萄球菌、球芽孢杆菌和大肠杆菌等四种典型细菌类生物战剂模拟物进行了 28 h 的平行培养。然后,在超净台中按无菌操作进行菌液准备,即取已经划过线的固体培养基,用无菌牙签沾取少量的菌体置于含有约 50 mL 的液体 TSB 或 LB 培养液中,放置于 30 °C/37 °C 恒温振荡培养箱内,每隔 2H 分别吸取成团泛菌、金黄色葡萄球菌、球芽孢杆菌和大肠杆菌营养肉汤培养液 1 mL,并用 10 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液稀释成菌悬液,用 UV1102 紫外可见分光光度计测定四种菌液在 600 nm 波

长上的吸光度,用 0.9% 无菌氯化钠溶液作为空白参比,记录四种菌液的吸光度值 OD。OD 测量均重复三次,直至菌液 OD 值达到平稳状态。

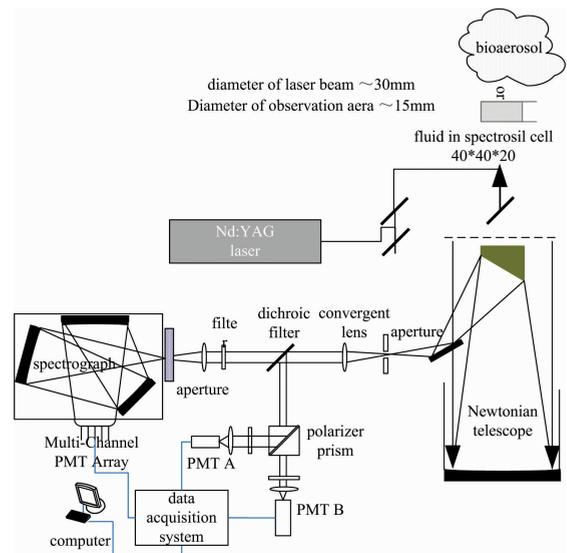


图 1 近场激光雷达荧光测量示意图

Fig. 1 Schema of short range LIF lidar setup

2.2 吸光度测量结果及讨论

从细菌复活后的芽孢态开始,分别对各菌不同生长时期的吸光度值进行了三次重复测定,得到了各菌的生长曲线。由图 2 可知,

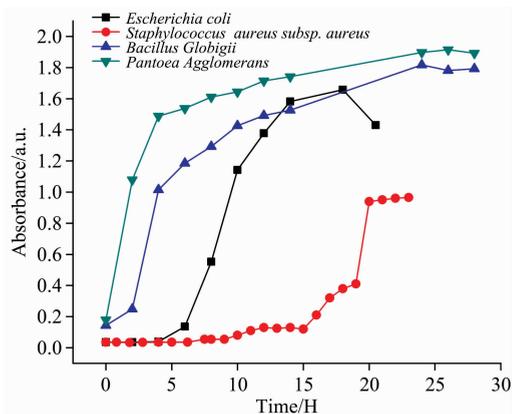


图 2 四种典型细菌类生物战剂模拟物生长曲线

Fig. 2 Growth curve of 4 typical bioagents simulants

(1) 在设定的培养条件下,四种菌的生长阶段较为明显,主要有萌发期、对数生长期、平稳期和衰亡期。其中,球芽孢杆菌和成团泛菌两种菌的萌发期较短,可能是菌种培养环境与现有培养环境相近,在培养初期溶氧和酸碱度都较为适宜,菌种极快地适应了新环境并对数生长;球芽孢杆菌和成团泛菌的对数生长期持续约 4 h,从第 4 小时后到第 24 小时结束为过渡平稳期,之后进入稳定平稳期。金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的萌发期相对较长,约为 15 小时和 6 小时;金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的对数生长期分别为 2 和 6 h。成团泛菌、金黄色葡萄球菌、球芽孢杆菌和大肠杆菌的代时分别

为 0.99, 0.835, 1.07 和 1.909 h。

(2)只有大肠杆菌有明显的衰亡期,在约 5 h 的平衡期后,大肠杆菌进行营养和空间的竞争,有些大肠杆菌死亡,吸收率随即开始衰减,其整个生命周期呈“J”型;说明细菌的培养生长曲线受遗传性、接种量和培养条件等因素的影响,会有所变化。

3 荧光光谱测量

3.1 液态气溶胶制备

BSA 和 OVA 气溶胶配制:在超净台用去离子水 ddH₂O 稀释,得到的溶液浓度约为 1.0×10^6 和 5.0×10^6 个 \cdot mL⁻¹,摇匀后 4 °C 静置 10 min,荧光待测。

成团泛菌、金黄色葡萄球菌、球芽孢杆菌营养态细菌气溶胶配制:在超净台分别汲取过夜培养(约 24 h)后的 Pan, Sta 和 BG 菌液 5 mL,注入 15 mL 生理盐水的离心管中,在 $7\,500\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速下离心 10 min 两次,去掉上清液,再分别加入 10 mL 生理盐水,摇匀后 4 °C 静置 10 min,荧光待测。

大肠杆菌营养态细菌气溶胶配制:在超净台分别汲取 15 h 培养后的菌液 5 mL,注入 15 mL 生理盐水的离心管中,在 $7\,500\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速下离心 10 min 两次,去掉上清液,再分别加入 10 mL 生理盐水,摇匀后 4 °C 静置 10 min,荧光待测。

3.2 荧光测量方法

荧光测量在距离激光雷达约 20 m 的喷雾型测量腔中进行。气溶胶室长 15 m,尺度为 2.0 m \times 2.0 m。两端配有活动门,挂起时可以关闭,放下时打开。测量方法:(1)室门关闭,将选定的 BSA、OVA、成团泛菌、金黄色葡萄球菌、球芽孢杆菌和大肠杆菌营养态气溶胶,在数秒时间内利用气流式雾化器和风扇,充分混合均匀,并保留 10 s 以确保室内具有良好的各向同性;(2)然后打开腔前门,用激光雷达完成荧光测量;(3)激光雷达数据采集结束后,打开后门,在数分钟内清空测量腔中的气溶胶;(4)测量腔中气溶胶清空并紫外线灭菌后分别测量同等浓度超纯水和生理盐水的荧光背景信号,作为参比扣除。

3.3 雷达回波的小波去噪和平滑

在激光回波检测中使用的去噪方法有匹配滤波、平滑滤波等;当信号波形已知时,匹配滤波方法能够有效地实现信号检测,是输出信噪比最大化意义上的线性滤波器,但对于非平稳的回波信号其性能会大幅下降。尤其是,滑动平均滤波只相当于低通滤波器,中值滤波降噪优势是消除孤立的噪声,当信噪比很低时,改善信噪比性能有限^[9-10]。

荧光信号较 MIE 散射信号低数个数量级,为尽可能地保留信号光谱的特征,不能采用常规的平滑降噪处理,对激光雷达的原始 PRR 信号,采用了分解级数为 4 的 Daubechies (db4)小波基,与滑动平均方法比较而言,利用该小波去噪可以更好地保留了激光雷达回波信号的峰值特征。

3.4 2D 荧光发射谱和二阶导数荧光发射谱

根据生长曲线,大肠杆菌取 15 h 菌液,其他三种则是 24

h 菌液,在荧光测量腔中进行荧光和背景测量。去除信号中的拉曼和瑞利散射信号后,经归一化,得到了如图 3 所示的各模拟物液态气溶胶的二维荧光发射谱。经与色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的本征二维荧光光谱对比分析后,可得到以下结论:

(1)BSA, OVA 以及成团泛菌、金黄色葡萄球菌、球芽孢杆菌和大肠杆菌营养态细菌气溶胶的二维荧光谱分布、谱形与色氨酸一致性较高,荧光谱的半高宽 FWHM 为 60 nm,说明其主要成份为色氨酸,酪氨酸和苯丙氨酸的荧光贡献基本为 0;

(2)相对于色氨酸的 280/350 nm 本征荧光峰,其他所有模拟物的荧光发射中心波长均存在不同程度的紫移,其中 OVA 和 BSA 的荧光发射波长分别紫移了 18 和 12 nm,荧光峰位于 280/332 和 280/338 nm;金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、球芽孢杆菌的荧光发射波长紫移了 10, 16, 8 和 16 nm,荧光峰位于 280/340, 280/336, 280/342 和 280/334 nm;

(3)仅利用单个或数个激发波长得到的发射谱,要区分和识别不同生物物质,较为不易。而将光谱进行高阶处理,如求解二阶导数,得到二阶导数谱,以将光谱曲线的差异放大。对荧光光谱求二阶导数后,光谱谱带变窄,二阶导数光谱的极小值对应荧光光谱峰值,在定量测量上表现出很高的灵敏性^[11]。图 3(b)示出了三种液态生物气溶胶和标准荧光组分色氨酸的二阶导数谱,可见二阶导数的最小值,与图 3(a)中的荧光峰值位置一致。此外,二阶求导后的谱曲线变得非常杂散,不平滑,这主要是由于被测物浓度低,受背景影响较大所致。

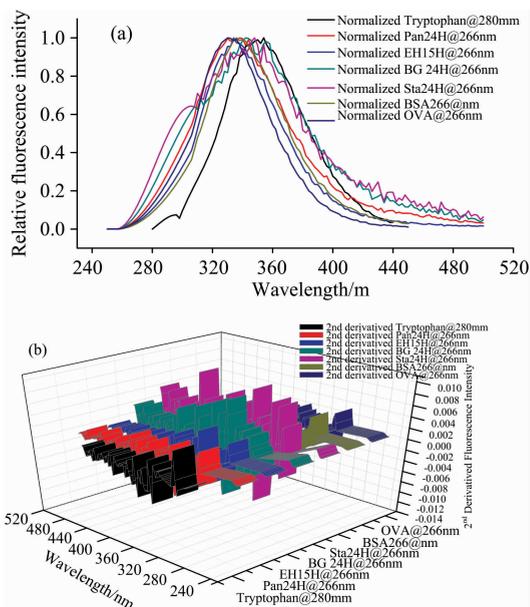


图 3 BSA, OVA 和典型生物战剂模拟物氨基酸段荧光光谱

(a): 原始谱; (b): 二阶导数谱

Fig. 3 Fluorescence spectra of BSA, OVA and typical bioagents simulants

(a): Original; (b): 2nd derivative

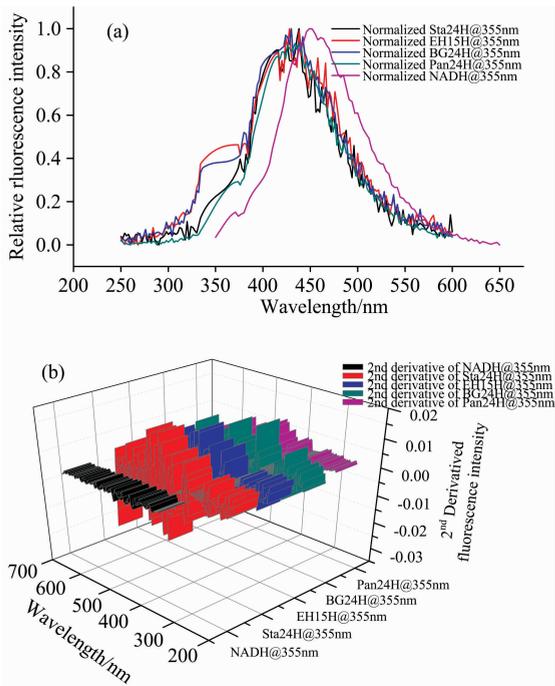


图 4 4 种模拟物 NADH 段荧光光谱

(a): 原始谱; (b): 二阶导数谱

Fig. 4 Fluorescence spectra of typical bioagents simulants within the NADH segment

(a): Original; (b): 2nd derivative

NADH 是反应细胞呼吸和新陈代谢活动的标志之一。图 4 示出了经降噪平滑和归一化处理后的 4 种典型生物战剂模拟物和标准荧光组分 NADH 在 NADH 荧光段的荧光谱曲线, 由图 4(a)可知:

(1) 所有菌的荧光谱谱形与 NADH 标准荧光谱的谱形较为一致, FWHM 约为 100 nm;

(2) 由于 NADH 组分含量低, 加之荧光效率低, 强度弱, 故除标准荧光组分 NADH 的谱曲线较为光滑外, 其他模拟物的荧光谱线的噪声波动较大, 荧光谱线不平滑, 在中心波长附近, 存在宽度较窄的小尖峰, 尤其是在大于中心波长 450 nm 的谱段, 波动较大, 毛刺严重;

(3) 与氨基酸段的荧光类似, 所有营养态细菌的荧光谱

较标准 NADH 荧光谱, 存在较为一致的紫移, 紫移了约 25 nm;

(4) 由于荧光信号较弱, 大肠杆菌、球芽孢杆菌营养态模拟物的荧光谱中还存在强度约为荧光强度一半的瑞利散射信号, 强度约为荧光强度 90% 的 387 nm 氮拉曼信号和 403 水拉曼信号残留;

(5) 与氨基酸段荧光谱类似见图 4(b), 二阶导数荧光谱放大了四种营养态细菌二维荧光谱曲线的差异。

4 结 论

在实验室内场进行了成团泛菌、金黄色葡萄球菌、球芽孢杆菌和大肠杆菌四种生物战剂模拟物的培养和生长曲线测定, 利用搭建的近场荧光测量激光雷达和配套的荧光测量腔, 测量得到了生物战剂模拟物营养态的二维荧光光谱, 分辨率为 4 nm。

四种菌的生长曲线与相关文献存在一些差异, 主要是受培养环境, 如温度波动、培养基和 pH 值等因素的影响;

四种营养态细菌成团泛菌、金黄色葡萄球菌、球芽孢杆菌和大肠杆菌, 以及 BSA 和 OVA, 在氨基酸段的荧光谱形与标准荧光组分色氨酸较为一致, 但受培养生化环境的影响, 荧光峰值均存在不同程度的蓝移/紫移, 其原因主要是细菌内部荧光团的疏水性增加, 极性变小, $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁中, 荧光团分子中的基态 n 电子与极性溶剂形成氢键, 使基态能量降低, 激发态与基态间的能量差变大, 导致荧光谱带的蓝移/紫移。仅从峰形上对不同物质在氨基酸段的二维荧光谱进行分辨是极为困难的, 将荧光谱进行了二阶求导, 增大了谱形和分布的差异程度, 利用数据统计方法可以较好地进行分辨识别, 下一步拟对二维荧光谱进行支持向量机建模, 对荧光谱应用更高阶的谱特征参量进行识别。

经培养后的成团泛菌、金黄色葡萄球菌、球芽孢杆菌和大肠杆菌营养态细菌气溶胶存在 NADH 荧光峰, 但 NADH 荧光强度较低, 导致不能有效地扣除水、氮等物质的拉曼散射分量和瑞利散射分量。同时, 受激光器能量、测量腔背景、气温气压等外部因素, 以及四种营养态菌体内生化成份的影响, NADH 段的荧光峰波动较大, 与标准 NADH 荧光谱在谱形、中心波长等参量上有较大差异。

References

- [1] Orlando Cenciarelli, Silvia Rea, Mariachiara Carestia, et al. Defence S&T Technical Bulletin, 2013, 6(2): 111.
- [2] Joshi D, Kumar D, Maini A K, et al. Spectrochimica Acta Part A Molecular & Biomole., 2013, 112(4): 446.
- [3] Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Edition. Science Press, 2006, 13(2): 029901.
- [4] Rustad G, Skogan G, Øystein Farsund. Biomedical Optics Express, 2012, 3(11): 2964.
- [5] Thrush E, Saliccioli N, Brown D M, et al. Appl. Opt., 2012, 51(12): 1836.
- [6] Deepak Kumar, Ramesh C Sharma, Anil K Maini. Spectroscopy Letters, 2013, 46(2): 147.
- [7] Gupta L, Kumar S, Sharma R C, et al. Journal of Scientific & Industrial Research, 2012, 71: 800.
- [8] Ho J. Analytica Chimica Acta, 2002, 457(1): 125.
- [9] ZHANG Xian-da(张贤达). Modern Signal Processing(现代信号处理). Beijing: Tsinghua University Press(北京: 清华大学出版社), 2002.
- [10] Yin Qiwei, Liu Zhishen, Liu Binyi. Journal of Atmospheric and Environmental Optics, 2011, 6(4): 260.

- [11] CHANG Jian-hua, DONG Qi-gong(常建华, 董绮功). BOPU YUANLI YU JIEXI(波谱原理及解析). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2001. 54.

2D Fluorescence Spectra Measurement of 6 Kinds of Bioagents Simulants by Short-Range Lidar

YANG Hui¹, MA Xiu-bing², SUN Yan-fei¹, WANG Tie-dong¹, QING Feng¹, ZHAO Xue-song³

1. PLA Army Academy Artillery and Air Defence, Hefei 230031, China

2. School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230031, China

3. Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China

Abstract Four kinds of bioagents simulants, *Pantoea agglomerans* (*Pan*), *Staphylococcus aureus subsp. Aureus* (*Sta*), *Bacillus globigii* (*BG*) and *Escherichia coli* (*EH*) were cultured and the strains growth curves were obtained, and the generation time were 0.99, 0.835, 1.07 and 1.909 h respectively. Two wavelengths at 266 and 355 nm of a designed short range fluorescence lidar were engaged for the measurements of two dimensional fluorescence spectra in the amino acid band and NADH band of the biological warfare agents, respectively. The simulants were diffused homogeneously inside a controlled fluorescence measurement chamber and interrogated by the lidar. The 2 dimensional fluorescence spectra of four kinds of vegetative bacteria, BSA and OVA (as simulant of toxin agents) were obtained with resolution of 4 nm. The fluorescence spectra of *Pan*, *Sta*, *EH* and *BG*, BSA and OVA were consistent with the standard fluorescent component tryptophan in the amino acid band with FWHM of 60 nm, but the central wavelength of the fluorescence spectra of these simulants blue/purple shifted obviously as affected by the external biochemical environment, concentration and ratio of different bacterial internal fluorophores, so the energy level between the excited state and the ground state of the fluorescence molecule increased. Accordingly, weak NADH fluorescence spectra with 100 nm FWHM inside the four vegetative bacteria aerosols were also detected, but Raman scattering contribution of water and nitrogen could not be effectively extracted. The second-order derivative fluorescence spectra of the four simulants showed that the high-order processing and recognition of the fluorescence spectrum was feasible.

Keywords Bioagents; Simulants; Short range fluorescence lidar; Derivative fluorescence spectra

(Received Jun. 26, 2017; accepted Dec. 21, 2017)