

激光诱导荧光光谱快速检测食源性致病菌

刘宇¹, 李增威², 邓志鹏¹, 张庆贤^{1*}, 邹立扣^{2*}

1. 成都理工大学, 地学核技术四川省重点实验室, 四川 成都 610059

2. 四川农业大学资源学院, 四川 成都 611130

摘要 近年来,由微生物污染引起的食品安全问题对人类健康构成威胁。微生物的快速检测对食品安全具有重要意义。目前,微生物快速检测技术存在操作困难,成本高的不足。激光诱导荧光光谱(LIFS)具有灵敏度高、操作方便、设备相对便宜等优点,为微生物的快速检测提供了一种潜在技术。利用便携式405 nm激光激发三种常见食源性致病菌(粪肠球菌、鼠伤寒沙门氏菌和铜绿假单胞菌)的荧光,并利用微光纤光谱仪检测光谱。通过调节激光器功率(10~100 mW)得到粪肠球菌的荧光强度,验证了激光器功率(Power, P)与细菌荧光强度的关系,结果表明最佳激光器功率范围为50~80 mW。测量了在激光器功率 $P=50$ mW时细菌样品的荧光光谱,并讨论了细菌种类和荧光光谱之间关系。结合文献分析粪肠球菌在528 nm处出现黄酮的荧光峰,铜绿假单胞菌中的原卟啉发射634 nm荧光峰。实验结果表明:(1)铜绿假单胞菌在634和703 nm处的荧光峰,可作为直接识别特征;(2)基于多元统计,将粪肠球菌和鼠伤寒沙门氏菌的光谱划分为9个特征区,采用动态聚类法得到粪肠球菌和鼠伤寒沙门氏菌的识别率均达到100%。结果表明,激光诱导荧光光谱法可有效检测铜绿假单胞菌、粪肠球菌和鼠伤寒沙门氏菌。相较于其他微生物快速检测技术,LIFS方法操作方便,检测速度快,识别率高,对食源性致病菌的快速检测具有重要的应用价值。

关键词 激光诱导荧光光谱法;粪肠球菌;鼠伤寒沙门氏菌;铜绿假单胞菌;动态聚类算法

中图分类号: O433.2 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2021)09-2817-06

引言

随着生活水平不断提高,人们对食品安全越来越重视,从而暴露出各种食品污染问题,其中,食源性微生物污染的问题与人们的生活息息相关。微生物检测技术是保证食品安全的基础技术,其核心在于高效、快速地检测微生物。我国常用的传统微生物检测技术主要是显微镜检测法和平板培养法,它在一段时间内为我国的微生物检测实践提供了丰富的经验,但其效率低下、流程冗长,无法满足快速发展的食品安全检测需求,因此相继提出各种微生物快速检测技术。3M公司和RCP Scientific Inc公司提出即用纸片法,可检测大肠杆菌(*Escherichia coli*)等常见菌种的计数及菌落总数,此法大大提升了工作效率,但实验成本较高。随着色谱和光谱检测技术被应用于微生物检测, Kim等利用流式细胞术(FCM),高效、快速地鉴定了球芽孢杆菌(*Bacillus globigii*)、大肠杆菌(*E. coli*)和草生欧文氏菌(*Erwinia herbico-*

la)^[1];高雯瑄等研究总结了PCR技术在沙门氏菌(*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等六种食源性致病菌的定量检测应用^[2]。这些高效的检测技术具有良好的重复性和准确性,但仪器和实验操作对研究者的要求较高。从光谱化学分析的角度, Shelly等通过荧光谱鉴定了生长介质中的假单胞菌^[3];Giana等基于410和430 nm激光激发的荧光光谱分析,研究了粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、大肠杆菌(*E. coli*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的检测方法^[4]; Arabia等利用266和405 nm激光,获得液相细菌光谱指纹图谱,识别了金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)^[5]; Bhatta等通过乳杆菌(*Lactobacillus*)、酵母菌(*Saccharomyces*)的荧光光谱研究了它们的特性^[6]。这些研究显示了激光诱导荧光(laser-induced fluorescence spectrometry, LIFS)应用在细菌菌株识别和定量技术的潜力, LIFS是一种快速、简单又经济有效的快速识别细菌方法。

论文提出利用荧光光谱特征对不同的细菌样品进行快速

收稿日期: 2021-01-02, 修订日期: 2021-04-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671954), 四川省科技厅应用基础项目(2020YJ0338)资助

作者简介: 刘宇, 1995年生, 成都理工大学核技术与自动化工程学院硕士研究生 e-mail: 1607432919@qq.com

* 通讯作者 e-mail: shinecore@163.com; zoulikou@sicau.edu.cn

识别和表征,以 405 nm 激光作为激发光源,搭建了一套激光诱导荧光光谱的检测系统,以三种常见致病细菌为样本(一种革兰阳性菌粪肠球菌(*E. faecalis*),两种革兰阴性菌包括鼠伤寒沙门氏菌(*S. Typhimurium*)和铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)),对三种细菌的菌液样本进行荧光激发,分析了三种细菌样本的荧光光谱特性差异。对粪肠球菌和鼠伤寒沙门氏菌的荧光光谱分段处理,提取 9 个特征量,用于动态聚类算法(dynamic clustering algorithm, DC)识别,实现了对粪肠球菌和鼠伤寒沙门氏菌的快速检测。

1 实验部分

1.1 测量原理

根据分子荧光效应和光谱分析原理^[7],当光致分子受到紫外光照射,荧光基团吸收能量,辐射出频率更低的荧光,每种物质因其独一无二的结构,荧光效应都有其特定吸收波长和发射波长,表现出不同的荧光光谱特性。

细菌中含有各种具有固有荧光基团的生物分子^[8],由于荧光基团含量、细菌结构或者理化成分存在差异,不同细菌在激光诱导下产生的荧光光谱有所差别,可根据荧光特性进行细菌的分类识别。

1.2 系统与参数

实验系统由 405 nm 激光模块、荧光探头模块、荧光光谱采集模块、控制模块、控制和能谱处理软件模块组成^[9],如图 1 所示。

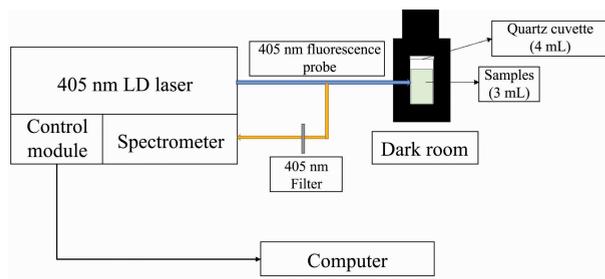


图 1 便捷式 405 nm 激光诱导荧光检测仪系统结构图

Fig. 1 Structure of portable 405 nm laser-induced fluorescence detector

工作时,激光器光源发射出 405 nm 激光,经荧光探头用聚焦透镜将激发光聚焦到待激发样品,激光能量激发荧光分子,进而发生能级跃迁并发出荧光,利用同一聚焦透镜同时收集荧光。探头内置 405 nm 滤光片组,将反射回来的激发光滤除并保留荧光信号,由光谱仪采集荧光信号并由软件进行处理。其中,激光器与光谱仪的参数列在表 1、表 2。

表 1 激光器参数

Table 1 Parameters of the laser

技术指标	参数
波长/nm	405
电压/mV	2 000
功率/mW	5~100
分辨时间/ns	500

表 2 光谱仪性能参数

Table 2 Parameters of the spectrometer

技术指标	参数
探测器	HamantsS10420
结构	背薄式, 2D
像素值	14 μm^2
探测器有效面积/mm	28.672 水平 \times 0.896 垂直
积分时间	8 ms~10 s
信噪比	450:1

1.3 试剂耗材

实验材料由四川农业大学应用微生物学实验室(四川,成都)提供,包括细菌菌株(粪肠球菌、鼠伤寒沙门氏菌、铜绿假单胞菌),TSA 培养基,TSB 培养基,氯化钠(分析纯),50 mL 离心管,超纯水等。

1.4 细菌培养

用接种环将甘油管中的菌株在 TSA 平板上划线,37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 20 h;用接种环挑取 TSA 平板上的单菌落接种到 50 mL TSB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 20 h;培养完成后将菌液 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,倒去培养基。用 30 mL 0.9% 生理盐水洗涤细菌,离心倒去生理盐水,重复三次,以充分洗去 TSB 培养基的残留。最后用 0.9% 生理盐水制成细菌悬液,并在 600 nm 处调节菌液浓度为 1.5OD。为了避免杂菌污染,整个过程在超净工作台完成。

1.5 测定

将装有细菌悬液的试管充分震荡后,用移液枪在试管中部吸取 3 mL 菌液转移到石英比色皿(容量为 4 mL),盖上比色皿盖子防止细菌污染仪器。为了避免其他光源的影响,将比色皿的光面垂直激光发射方向放置到暗室,利用 405 nm 激光诱导荧光检测系统对菌液样本进行荧光激发与采集,如图 2 所示。

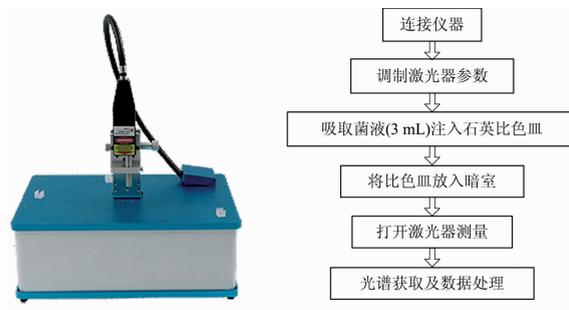


图 2 仪器与操作流程图

Fig. 2 The instrument and operation flow chart

2 结果与讨论

2.1 激光器功率验证

在单位时间内,激光器功率越高,代表的激光器输出能量越高,对一些深色物质容易因为能量太高而被“烧焦”,而一些弱荧光信号的物质需要更高的功率激发荧光信号^[7],设

置合适的激光器功率对采集的荧光信号至关重要。选用鼠伤寒沙门氏菌菌液样本验证分析荧光光谱强度(Intensity)与激光器功率(Power)的关系。根据图 3(b)发现,随着激光器功率上升,细菌的荧光强度随之上升。在功率 10~100 mW 范围内,细菌样本的荧光强度与激光器功率呈良好的线性关系,拟合优度 $R^2=0.997$ 。

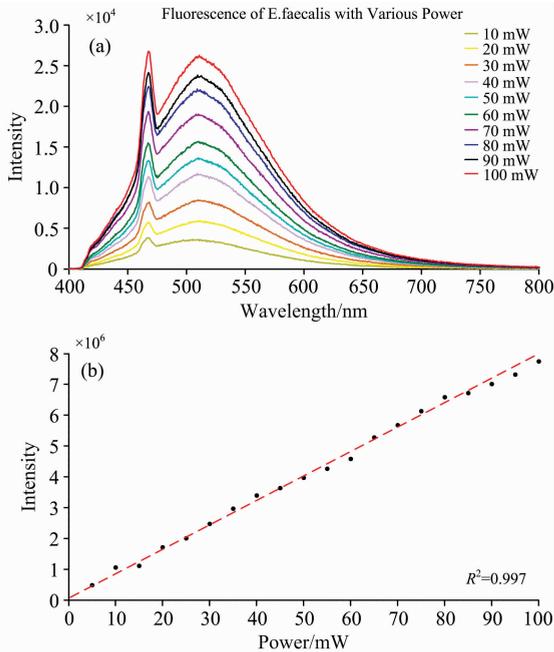


图 3 $P=10\sim 100\text{ mW}$, $c=1.5\text{ OD}$, 粪肠球菌的荧光谱图 (a); 荧光强度与功率的线性关系图 (b)

Fig. 3 $P=10\sim 100\text{ mW}$, $c=1.5\text{ OD}$, the fluorescence spectra of *E. faecalis* (a); and Relationship between Intensity and Power (b)

为了避免功率过低光谱噪声大、功率过高引起“烧灼”,影响细菌的荧光效果,建议选用 50~80 mW 的激光器功率,本实验采用 50 mW。

2.2 光谱分析

在 $P=50\text{ mW}$, $\lambda=405\text{ nm}$ 激光下诱导荧光,光谱仪将采集到的荧光光谱进行平滑和峰值归一化处理,光谱范围设置为 400~800 nm,得到如图 4 所示的荧光光谱图,细菌样本的峰值特征在表 3 列出。

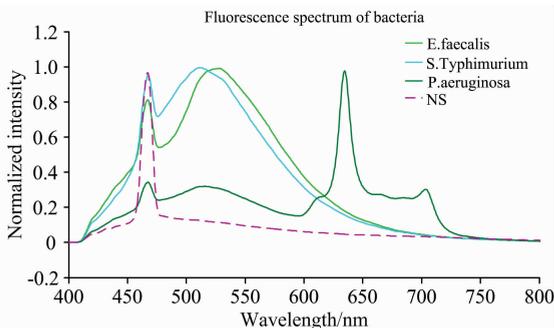


图 4 细菌样本的荧光谱图

Fig. 4 Fluorescence spectra of bacteria samples

表 3 $P=50\text{ mW}$, $\lambda=405\text{ nm}$ 时,细菌样本的峰值波长和相对强度

Table 3 $P=50\text{ mW}$, $\lambda=405\text{ nm}$, peak wavelength and relative intensity of bacteria samples

No.	致病菌种类	峰值数目	峰值波长 /nm	峰值归一化强度
1	<i>E. faecalis</i> (粪肠球菌)	2	467	0.833 7
			528	1
2	<i>S. Typhimurium</i> (鼠伤寒沙门氏菌)	2	467	0.962 5
			514	1
3	<i>P. aeruginosa</i> (铜绿假单胞菌)	4	467	0.348 6
			516	0.319 7
			703	0.304 8
4	NS(生理盐水)	1	467	1

实验发现,鼠伤寒沙门氏菌、粪肠球菌和铜绿假单胞菌显示出独特的荧光光谱。细菌具有的荧光基团大致相同,主要由卟啉(Porphyrin)、辅酶(Coenzyme)、NADH(NADPH)和黄素(Flavins)等组成^[8],但荧光基团含量、细菌生物体结构以及不同细菌吸收激光能量的程度都存在差异,形成了独特的细菌荧光光谱图。同为革兰阴性菌,鼠伤寒沙门氏菌和铜绿假单胞菌发射出的荧光在 515 nm 附近,此外,铜绿假单胞菌的荧光光谱还分别在 634 和 703 nm 显示出荧光峰,且 634 nm 处荧光峰峰值对应光谱峰值最大值,而革兰阳性菌粪肠球菌的光谱在 530 nm 才出现荧光峰。资料表明革兰阳性菌细胞壁较厚(约 20~80 nm),肽聚糖是其重要成分,而革兰阴性菌细胞较薄(约 10 nm),除了肽聚糖,还包含其他复杂成分,如脂多糖、脂蛋白等^[10]。前人的研究表明不同荧光基团对应特定的荧光峰,如表 4 所示。溶剂生理盐水(NS)的荧光峰出现在 $\lambda=467\text{ nm}$,对应—OH 荧光基团^[11];Koenig 等研究指出,黄酮类发出绿色荧光(530 nm)^[8],由此认为粪肠球菌在 528 nm 附近的荧光峰可能对应着黄酮类基

表 4 具有较高荧光量子效率的荧光基团及其最大吸收和发射波长^[12]

Table 4 List of intrinsic fluorophores with relatively high fluorescence quantum efficiency along with their absorption and emission maxima^[12]

Chromophore (发光团)	Absorption /nm	Fluorescence /nm
Tryptophan (色氨酸)	220, 280, 288	320~350
Tyrosin(酪氨酸)	220, 275	305
NADH, NADPH (还原性辅酶, 还原酶)	260, 340	470
Flavins(黄素)	260, 370, 450	530
ATP(三磷酸酰胺)	260	300~500
Coproporphyrin (粪卟啉)	398, 497, 531, 565, 620	622
Protoporphyrin (原卟啉)	406, 505, 540, 575, 630	633

团的荧光发射,而铜绿假单胞菌在 634 nm 的荧光峰则可能对应着原卟啉基团的荧光响应(633 nm)。

2.3 细菌识别

实验发现,利用 $P=50\text{ mW}$, $\lambda=405\text{ nm}$ 的激光,诱导出铜绿假单胞菌的荧光峰,分别在 634 和 707 nm 处产生异于其他两种细菌的荧光峰,显示出较强的独特性,根据该荧光特性,可以直接实现对铜绿假单胞菌的特异性识别。粪肠球菌和鼠伤寒沙门氏菌的荧光光谱图除本底荧光峰,仅包含一个较宽的荧光峰,峰位也大致相同,无法直接进行识别,但细菌荧光峰与溶剂荧光峰的相对强度比和荧光峰上升、下降的梯度都存在区别,考虑两种差异,论文基于多元分析方法,提出 LIFS 结合动态聚类的方法识别细菌种类,具体实验操作步骤为:分别配置浓度为 1.5OD 的粪肠球菌和鼠伤寒沙门氏菌液样本各 60 组,在 $P=50\text{ mW}$, $\lambda=405\text{ nm}$ 激光条件下进行激发荧光,获得荧光光谱 120 组;如图 5 所示,对 459~586 nm 之间光谱划分为 9 个特征区域,以 a1(溶剂的荧光峰)作为标准进行标准化处理得到 9 个特征量(Characteristic value),由此得到 120 组包含 9 个特征量的标准化数据(聚点, Point),见表 5,随机将 120 组聚点按照 7:3 的比例分为训练集和测试集。

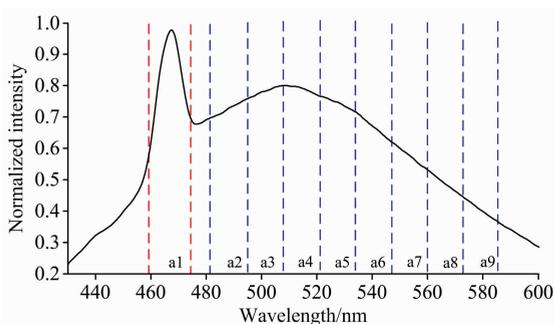


图 5 划分特征区域

Fig. 5 Division of characteristic areas

表 5 特征区域和特征量

Table 5 Characteristic areas and values

No.	特征区域	特征量	标准化
1	459, 473	a1	1
2	482, 495	a2	a2/a1
3	495, 508	a3	a3/a1
4	508, 521	a4	a4/a1
5	521, 534	a5	a5/a1
6	534, 547	a6	a6/a1
7	547, 560	a7	a7/a1
8	560, 573	a8	a8/a1
9	573, 586	a9	a9/a1

实验中,在训练集中随机选取两组聚点作为初始聚点;分别计算其他聚点与初始标准聚点的欧氏距离[式(1)];按照最短距离原则,将距离最近的聚点与初始标准聚点合并(对特征量求平均值)作为二代标准聚点;重复如上步骤,直到进行完全聚类,得到最终的标准聚点[图 6(a)].将测试集

的样本聚点与标准聚点按照最短距离进行聚类判断[图 6(b)],实现对未知细菌的识别,得到识别结果(表 6)。

$$d_{\text{Euclid}} = \sqrt{\sum_{k=1}^9 (x_k - y_k)^2} \quad (1)$$

式(1)中, x_k 为标准聚点的特征量的值, $k=1:9$; y_k 为测试集的特征量的值。

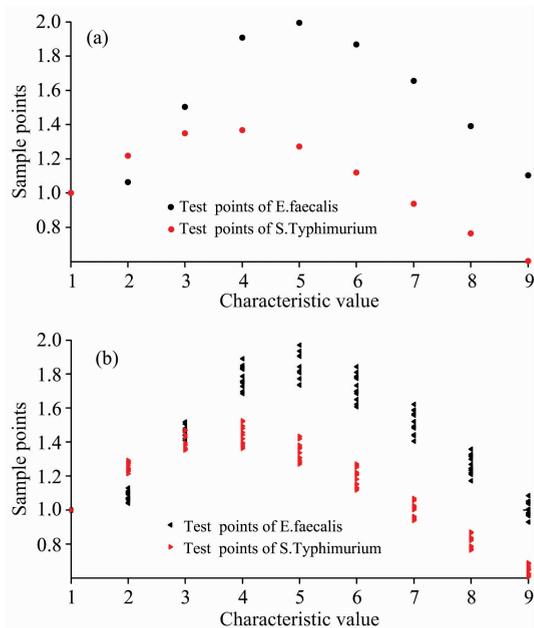


图 6 训练集标准聚点(a)、测试集样本聚点(b)

Fig. 6 The standard cluster point of training set (a), sample cluster points of test set (b)

表 6 动态聚类对粪肠球菌、鼠伤寒沙门氏菌的识别率

Table 6 Correct recognition rate of *E. faecalis* and *S. Typhimurium* by DC

No.	细菌种类	测试集数据	正确识别数据	错误识别数据	未识别数据	识别率/%
1	粪肠球菌	18	18	0	0	100
2	鼠伤寒沙门氏菌	18	18	0	0	100

对测试集数据进行识别,粪肠球菌和鼠伤寒沙门氏菌的识别率皆为 100%,无识别错误和未识别数据,说明 LIFS 结合动态聚类分析对三种常见食源性致病菌快速检测的可行性。本研究检测方法费用较低,无需大量的生化实验准备及耗材^[1-2],仪器成本较低;识别速度快,铜绿假单胞菌实现了即时识别,粪肠球菌和鼠伤寒沙门氏菌数据处理耗时 10 min 左右,优于 FCM 法(约 3 d)^[1]、PCR 反应体系(2 d)^[2]等;同时,三种细菌都实现了 100%识别,该法识别率高。

利用便捷式 405 nm 激光诱导荧光检测系统实现了对三种常见食源性致病菌的无接触检测,检测速度快,识别效率高,但目前所做的工作仅限于对样品荧光光谱特征进行研究,没有讨论微生物在培养、制样及照射过程中涉及到的生物化学变化等,这些将值得更深入的分析讨论。

3 结 论

利用便捷式 405 nm 激光诱导荧光检测系统,对粪肠球菌、鼠伤寒沙门氏菌、铜绿假单胞菌等常见食品污染致病菌诱导荧光,发现三种细菌的荧光光谱各有差异。简单验证了激光器功率与细菌荧光强度的关系,得出最佳激光器功率范围为 50~80 mW。在 $P=50$ mW, $\lambda=405$ nm 激光诱导下,铜绿假单胞菌的荧光光谱在 $\lambda=634$ nm 和 $\lambda=703$ nm 产生有

别于其他两种细菌的荧光峰,可以据此对铜绿假单胞菌进行直接识别。基于动态聚类的思想,采集粪肠球菌,鼠伤寒沙门氏菌 120 组荧光数据并随机分为训练集 84 组、测试集 36 组,对荧光图谱划分 9 个特征区域进行特征量聚类识别,得出粪肠球菌和鼠伤寒沙门氏菌的识别率为 100%,实现对粪肠球菌和鼠伤寒沙门氏菌的快速识别。经实验验证,激光诱导荧光光谱法操作简单,检测速度快,效率高,结合动态聚类的思想,为实际微生物快速检测讨论设计了一种新的测试方法。

References

- [1] Kim Y, Jett J H, Larson E J, et al. Cytometry, 1999, 36(4): 324.
- [2] GAO Wen-xuan, GAN Zhi-lin, CHEN Ai-liang, et al(高雯暄,甘芝霖,陈爱亮,等). Journal of Food Safety & Quality(食品安全质量检测学报), 2020, 11(24): 9440.
- [3] Shelly D C, Quarles J M, Warner I M. Clinical Chemistry, 1980, 26(8): 1127.
- [4] Héctor Enrique Giana, Landulfo Silveira, Renato Amaro Zangaro, et al. Journal of Fluorescence, 2003, 13(6): 489.
- [5] Arabi D S, Abdel-Salam Z A, Goda H A, et al. Journal of Luminescence, 2018, 194: 594.
- [6] Hemant Bhatta, Ewa M Goldys, Robert P Learmonth. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(1): 121.
- [7] Jeanne L McHale. Molecular Spectroscopy(分子光谱). Beijing: Science Press(北京:科学出版社), 2003. 151.
- [8] Koenig K, Schneckenburger H. Journal of Fluorescence, 1994, 4(1): 17.
- [9] ZHANG Ling-ling, CHEN Yuan, WANG Cai-xia, et al(张玲玲,陈媛,王彩霞,等). Applied Laser(应用激光), 2019, 39(6): 1035.
- [10] WANG Jing-yan, ZHU Sheng-geng, XU Chang-fa, et al(王镜岩,朱圣庚,徐长法,等). Biochemistry(生物化学). Beijing: Higher Education Press(北京:高等教育出版社), 2002. 51.
- [11] YAO Meng, WANG Hai-shui(姚蒙,王海水). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2020, 40(Suppl.): 27.

Fast Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria by Laser-Induced Fluorescence Spectrometry

LIU Yu¹, LI Zeng-wei², DENG Zhi-peng¹, ZHANG Qing-xian^{1*}, ZOU Li-kou^{2*}

1. Key Laboratory of Geosciences and Nuclear Technology, Chengdu University of Technology, Chengdu 610059, China
2. College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract In recent years, food safety accidents by microbial contamination is a considerable threat to health. The rapid detection of microorganisms is of great significance to food safety. At present, the rapid microorganism detection technology is a difficult operation and high cost. Laser-induced fluorescence spectrometry (LIFS), with the advantages of high sensitivity, convenient operation, relatively cheap equipment, could provide a potential technique for rapid detection of microorganisms. In this paper, we use a portable 405 nm laser to excite fluorescence of three common foodborne pathogenic bacteria (*Enterococcus faecalis*, *Salmonella Typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*), and a fiber spectrometer to detect the spectra. By adjusting the laser power (10~100 mW) to get the fluorescence intensity of *Enterococcus faecalis*, the relationship between the laser power and bacterial fluorescence intensity has been verified, and the result showed the optimal laser power range of 50 to 80 mW. In this experiment, the fluorescence spectra between bacterial samples are obtained at $P=50$ mW. We discussed the relationship between bacterial structure and fluorescence spectra. According to the research result, It was concluded that *E. faecalis* exhibited a fluorescence peak of flavonoid groups near 528 nm, and the fluorescence peak at 634 nm of *P. aeruginosa* corresponds to the fluorescence emission of protoporphyrin. The results showed that, (1) the fluorescence peaks at 634 and 703 nm of *P. aeruginosa* for excitation are different from other two bacteria, which can be a feature for direct detection; (2) based on statistics, the spectrum of *E. faecalis* and *S. Typhimurium* was divided into 9 characteristic areas, and the recognition rate of the two bacteria reached 100% detected by the dynamic clustering method. The results show that the laser-induced fluorescence spectrometry can effectively detect *P. aeruginosa*, *E. faecalis* and *S. Typhimurium*. Compared with other rapid

detection techniques, LIFS has significant application value for the rapid detection of foodborne pathogenic bacteria with the easier operation, faster detection speed and higher recognition rate.

Keywords Laser Induced Fluorescence; *Enterococcus faecalis*; *Salmonella* Typhimurium; *Pseudomonas aeruginosa*; Dynamic clustering algorithm

* Corresponding authors

(Received Jan. 2, 2021; accepted Apr. 21, 2021)

《光谱学与光谱分析》 入选《世界期刊影响力指数(WJCI)报告(2020 STM)》 (2021年8月18日)

《世界期刊影响力指数(WJCI)报告(2020 STM)》(以下简称《WJCI报告》)是由中国科学技术信息研究所、《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司、清华大学图书馆、万方数据有限公司、中国高校科技期刊研究会联合研制的期刊评价报告。该报告是中国科学技术协会专题资助课题《面向国际的科技期刊影响力综合评价方法研究》(2019KJQK004)的成果,入选了“科创中国”项目。《WJCI报告》旨在建立一个全新的期刊评价体系,入选期刊均被认为是具有地区代表性和学科代表性的优秀期刊。

统计年: 2019年

刊名	光谱学与光谱分析				
国家或地区	中国大陆				
ISSN	1000-0593				
主办单位或出版商	中国光学学会				
总被引频次	4872				
影响因子	0.863				
学科影响力	学科	WJCI	WJCI 学科排名	WJCI 分区	百分位
	化学综合	1.402	75/182	Q2	58.79
	谱学	1.028	19/30	Q3	36.67
	平均值	1.215	—	—	47.73

