

基于 SERS 技术的食源性致病菌芽孢拉曼光谱特征结构分析及快速识别

刘世杰¹, 朱瑶迪^{1,2}, 李苗云^{1,2*}, 赵改名^{1,2}, 赵莉君^{1,2}, 马阳阳^{1,2}, 王娜¹

1. 河南农业大学食品科学技术学院, 河南 郑州 450000

2. 河南省肉品加工与安全国际联合实验室, 河南 郑州 450000

摘要 为了探究食源性致病菌芽孢的拉曼特征指纹图谱, 实现快速识别, 该研究以产气荚膜梭菌(*C. perfringens*)、艰难梭菌(*C. difficile*)和蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)的芽孢为研究对象, 以柠檬酸钠还原法制备的 AgNPs 溶胶为基底材料, 用 SERS 技术对芽孢进行拉曼光谱检测, 解析食源性致病菌芽孢的分子结构、不同芽孢之间的异同之处。将 3 种食源性致病菌芽孢的 SERS 光谱与主成分分析(PCA)和系统聚类分析(HCA)相结合并进行对比分析, 实现不同种属食源性致病菌芽孢的定性识别。结果表明, 不同食源性致病菌芽孢的 SERS 光谱的特异性和重现性良好。芽孢光谱中 Ca^{2+} -DPA 的拉曼振动峰数量和峰强度占主要地位, 其拉曼振动峰位置在 657~663, 818~820, 1 017, 1 389~1 393, 1 441~1 449 和 1 572~1 576 cm^{-1} 波段。*C. difficile* spores SERS 光谱中 Ca^{2+} -DPA 的六个特征峰峰强度均高于 *C. perfringens* spores 和 *B. cereus* spores, *C. perfringens* spores 次之。 Ca^{2+} -DPA 在 1 017 cm^{-1} (Ca^{2+} -DPA) 处拉曼峰强度在 3 种芽孢的 SERS 光谱中均最高且差异明显, 是 Ca^{2+} -DPA 的主要特征峰, 也是 3 种芽孢的主要特征峰。此外, *C. perfringens* spores 在 936 cm^{-1} (磷脂 N—C 拉伸)、1 294 cm^{-1} (脂质中的 CH_2 变形振动)、1 609 cm^{-1} (蛋白质中的酪氨酸)和 1 649 cm^{-1} (蛋白质中的酰胺 I) 显示特有拉曼振动峰; *C. difficile* spores 在 890 cm^{-1} ($=\text{C}-\text{O}-\text{C}=\text{O}$ 拉伸) 显示特有拉曼振动峰。PCA 分析结果显示 PC1 和 PC2 方差贡献率分别为 51.1% 和 39.7%, 累积贡献率达 90.8%, 可以将所有样本有效区分。HCA 分析可以看出 3 种芽孢的 SERS 光谱被分为三个聚类, 3 种芽孢各自聚类无交叉干扰。结合多元统计分析不仅有效实现了 3 种芽孢之间的区分, 也实现了梭菌属芽孢和杆菌属芽孢的区分, 为食品安全控制提供有效手段。

关键词 食源性致病菌芽孢; 表面增强拉曼光谱; AgNPs; 光谱解析; 快速识别

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2022)09-2774-07

引言

食源性致病菌引起的食源性疾病每年导致全球约 2 000 万人死亡, 2.6 亿人致病, 其中多数案例与食源性致病菌芽孢菌相关, 如产气荚膜梭菌(*C. perfringens*)引起的气性坏疽和食物中毒、艰难梭菌(*C. difficile*)引起的严重且经常致命的腹泻或伪膜性肠炎, 以及蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)引起的呕吐和腹泻综合症^[1]。芽孢是细菌营养细胞在环境胁迫下(营养匮乏、干旱、高温等)在胞内形成的休眠体, 对紫外

辐射、干燥、强酸强碱和一些有毒化学物品等有极强的抵抗力, 在休眠状态下可以保持活力数年甚至数百年。当条件有利于生长时, 芽孢感知外界萌发信号, 开始萌发, 其一旦萌发即会产生毒素, 危及人体健康, 存在极大的安全隐患。因此, 探究快速、高效、无损的食源性致病菌芽孢检测方法迫在眉睫^[2]。

近年来随着光谱技术的发展, 许多光谱技术被用于食品质量与安全检测, 但这些方法对食源性致病菌的检测都有一定的局限性。例如, 荧光光谱技术, 图谱合一鉴别快速, 但缺乏化学信息的特异性, 易受元素相互干扰和重叠峰的影响。

收稿日期: 2021-07-17, 修订日期: 2021-11-17

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划项目(2019YF1605700), 河南省杰青项目(212300410008), 基于银纳米种子介导二次生长自组装 SERS 基底关键技术研究及应用(22A550013), 河南省重点研发与推广专项(科技攻关)项目(202102110141), 国家自然科学基金项目(31801671), 国家现代农业(肉牛牦牛)产业技术体系建设专项(CARS-37), 河南农业大学科技创新基金项目(KJXC2020A17)资助

作者简介: 刘世杰, 1996 年生, 河南农业大学食品科学技术学院硕士研究生 e-mail: 15938978937@163.com

* 通讯作者 e-mail: limy7476@126.com

响^[3]；近红外光谱技术，快捷且无损，但不适用于水溶液的测量^[4]。拉曼光谱检测技术虽然检测信号弱，但结合固体金属粗糙表面或者纳米溶胶悬浮液为基底（例如金、银等贵金属），开发表面增强拉曼光谱技术（SERS），可实现拉曼信号的显著增强，从而获得更多的微生物信号。SERS作为一种生物指纹识别技术，可以提供丰富的分子结构和组成信息，具有无需标记、操作简便、检测时间短且无损等优势，可以满足食品质量与安全领域快速检测的需求^[5]。

目前，国内外许多研究表明SERS技术在食源性致病菌检测研究方面具有巨大的优势和潜力。Witkowska等^[6]采用电化学方法将银纳米粒子沉积于FTO镀膜玻璃板作为SERS基底，检测了五种不同食品基质中的食源性致病菌；Yang等^[7]使纳米颗粒在尽可能多的点和尽可能近的部位与细菌表面，基于SERS技术区分3株大肠杆菌DSM菌株；Li等^[8]提出一种 $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI@bacteria$ 复合物形式与SERS技术结合的方法识别金黄色葡萄球菌、鲍氏不动杆菌和铜绿假单胞菌。然而基于SERS技术对不同食源性致病菌芽孢的光谱解析及快速识别还未见报道。

因此，以不同食源性致病菌芽孢为研究对象，以柠檬酸钠还原法制备的AgNPs溶胶为基底材料，用SERS技术对培养的芽孢进行拉曼光谱检测。依据拉曼图谱间峰位归属和出峰强度差异解析食源性致病菌芽孢之间的分子结构以及不同芽孢之间的差异，并结合多元统计分析，实现食源性致病菌芽孢的快速识别，为快速、便捷地检测食源性致病菌芽孢提供有效手段。

1 实验部分

1.1 材料

菌株 *C. perfringens* ATCC 13124, *C. difficile* ATCC 43593 和 *B. cereus* CMCC(B)63303, 来源于中国菌种保藏中心和广东环凯微生物技术有限公司。脑心输注肉汤培养基(BHI), 液体硫乙醇酸盐培养基(FTG), 胰蛋白酶大豆琼脂(TSA), 营养琼脂(NA), 庖肉培养基, 购于青岛海博有限公司; 胰胨-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂培养基(TSC), 胰蛋白酶大豆琼脂(TSA), 胰蛋白酶大豆肉汤(TSB), 产芽孢培养基, 购于北京陆桥有限公司; 酵母提取物, L-半胱氨酸, 牛磺胆酸钠, 硫酸锰, 浓盐酸, 浓硝酸, 均为分析纯。

1.2 仪器

LabRAM HR Evolution 激光共聚焦拉曼光谱仪, HORIBA 上海茂培科技有限公司; Winner802 纳米激光粒度仪, 济南微纳颗粒仪器股份有限公司; BHC-1000IIA2 生物安全柜, 上海川一实验仪器有限公司; Hirayama HVE-50 蒸汽压力灭菌锅, 广州市深华生物技术有限公司; BECKMAN COULTER 高速冷冻离心机, 广州立诺自动化设备有限公司; ECLIPSE 80i 生物显微镜, 日本 NIKON 公司; MIR-254 低温培养箱, 日本 SANYO 公司; OSJ-UP-30L 超纯水机, 济南欧莱博科学仪器有限公司, 等。

1.3 方法

1.3.1 不同食源性致病菌芽孢的培养

产气荚膜梭菌芽孢的制备。将冷冻的 *C. perfringens* 磁珠在 TSC 培养基上划线后, 在培养箱中 37 °C 培养 24 ~ 48 h。从 TSC 平板上挑取典型的黑色菌落接种到庖肉培养基中, 37 °C 厌氧培养 48 h。取培养完成的菌液接种到新制备的 FTG 培养基中, 在水浴锅中 75 °C 加热 20 min, 并在 37 °C 培养箱中培养 18 h。取该培养液接种到的 FTG 培养基中活化, 37 °C 培养 4 h。将培养液转接到配置好的产芽孢培养基中, 在培养箱中 37 °C 厌氧培养 24 h。将培养完成的芽孢液在水浴锅中 70 °C 加热 25 min 破坏营养细胞, 用无菌水离心 ($7\ 012\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 20 min, 4 °C) 重复洗涤芽孢悬浮液 3 次。通过相差显微镜 100 倍油镜进行芽孢检测, 将离心洗涤的芽孢重新悬浮于无菌蛋白胨水中, 并保存于 -20 °C 环境中待用。

艰难梭菌芽孢的制备。将冷冻的 *C. difficile* 磁珠 FTG 平板上 37 °C 厌氧培养 24 ~ 48 h。从 TSC 平板上挑取单个菌落接种到已加入促芽孢生长因子 (1% 酵母提取物、0.1% L-半胱氨酸和 0.05% 牛磺胆酸钠) 的 BHI 肉汤中 37 °C 厌氧培养 5 d。离心、镜检与保存方法同上。

蜡样芽孢杆菌芽孢的制备。将冷冻的 *B. cereus* 磁珠在 BHI 平板上划线, 在培养箱中 37 °C 培养 24 ~ 48 h。挑取典型的蜡样芽孢杆菌菌落接种到胰蛋白酶大豆肉汤培养基中, 在培养箱中 37 °C 培养 24 h。转接到添加 50 mg · L⁻¹ MnSO₄ 的 TSB 培养基中, 之后在 37 °C 下孵育 7 d。离心、镜检与保存方法同上。

1.3.2 AgNPs 溶胶的制备

把 45 mg AgNO₃ 溶解在 250 mL 超纯水中, 在回流下加热到沸腾。在剧烈搅拌下滴加 5 mL 新鲜制备的 1% 柠檬酸钠溶液。将混合物保持沸腾并搅拌 90 min, 然后缓慢冷却至室温。将得到的 AgNPs 保持在 4 °C 避光保存备用^[9]。

1.3.3 纳米材料的表征

通过紫外可见分光光度计 (UV-Vis)、纳米激光粒度仪和透射电子显微镜 (TEM) 对 AgNPs 进行表征。UV-Vis 表征和纳米激光粒度仪表征时用超纯水对纳米材料进行适当稀释后上机检测; TEM 表征时将制备好的纳米金溶胶样品滴在碳支持膜, 用滤纸吸去样品表面多余的液体, 干燥固定后进行镜检。

1.3.4 载玻片的清洗

进行拉曼光谱扫描前, 将载玻片用王水 ($V_{\text{HCl}} : V_{\text{HNO}_3} = 3 : 1$) 浸泡清洗, 去除其表面的杂质, 之后用超纯水洗涤三遍, 用氮气吹干载玻片, 备用。

1.3.5 SERS 样品的制备

将培养所得的不同芽孢液各取 1 mL, 离心 3 次后重悬备用。将芽孢液稀释 10 倍和 AgNPs 1 : 1 混合, 振荡均匀 90 s, 取 200 μL 混合液滴在处理好的载玻片上, 并将 AgNPs 和 3 种芽孢分别在载玻片上做空白对照, 放置在无菌操作台中自然晾干备用。

1.3.6 拉曼光谱检测

样品检测之前, 以 520.7 cm⁻¹ 峰作为基准峰使用硅片 (Si) 对拉曼仪器进行校正。表面增强拉曼光谱采集使用 532.8 nm 的激光作为激发光源, 将激光强度设置为最大强

度(15 mW),物镜设置成 100 倍,积分时间为 30 s,积分 3 次。检测的光谱范围为 $400\sim 1\,800\text{ cm}^{-1}$,分辨率为 1 cm^{-1} 。将制备处理好的样品进行上机检测,之后使用 LabSpec 6.0 软件对样品进行光谱采集,对每个样品分别随机采集 12 次。

1.3.7 数据处理

使用 EXCEL 2010、Origin 8.0 与 SPSS 16.0 工具对数据进行分析和处理。

2 结果与讨论

2.1 食源性致病菌芽孢的镜检结果

在 100 倍油镜的相差显微镜下观察产气荚膜梭菌芽孢 (*C. perfringens spores*)、艰难梭菌芽孢 (*C. difficile*

spores)和蜡样芽孢杆菌芽孢 (*B. cereus spores*),三种芽孢率均达到 90%以上,单一芽孢分布明显,清晰可见,中心“光亮”,呈圆形或卵圆形。

2.2 AgNPs 溶胶的表征

按 1.3.2 方法制备的 AgNPs 溶胶颜色为灰绿色,对其进行 UV-Vis、激光粒度度和 TEM 表征。由图 2(a)可知,通过 UV-Vis 表征,AgNPs 溶胶的最大吸收单一峰在 415 nm 附近,表明制备出 AgNPs 溶胶。用纳米激光粒度仪对 AgNPs 的粒度大小进行检测,结果表明 AgNPs 溶胶的粒径大小主要分布在 35~55 nm 范围内,如图 2(b)所示。由图 2(c)透射电镜图可知,AgNPs 溶胶,球体颗粒均一,通过 Nano Measurer 计算得到 AgNPs 溶胶的平均尺寸约为 45 nm。

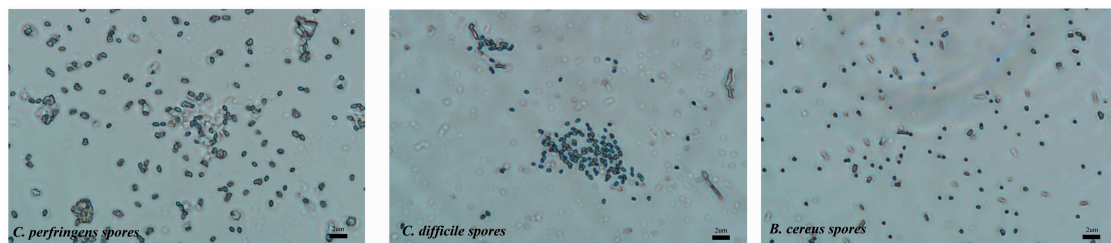


图 1 三种食源性致病菌的相差显微镜镜检图

Fig. 1 Phase-contrast microscopic image of three food-borne pathogenic bacteria spores

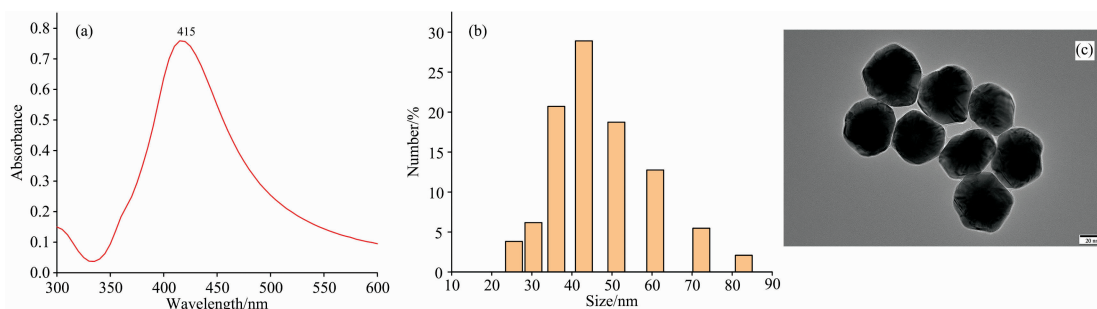


图 2 AgNPs 溶胶的紫外可见光光谱图(a)、粒度分布图(b)和 TEM 图(c)

Fig. 2 UV-Vis absorption spectrum (a), particle size distribution (b) and TEM image (c) of AgNPs

2.3 食源性致病菌芽孢的 SERS 图谱及解析

通过 SERS 技术对 AgNPs、3 种芽孢和 3 种芽孢与 AgNPs 偶联的复合物分别进行 12 次随机拉曼数据采集,经基线校正、归一化和平滑处理,AgNPs 对 3 种食源性致病菌芽孢的 SERS 增强效果、3 种食源性致病菌芽孢的 SERS 平均指纹图谱和 SERS 光谱拉曼位移的暂定归属如图 3、图 4 和表 1 所示。3 种食源性致病菌芽孢与 AgNPs 复合物进行 SERS 检测的结果如图 3 所示。在无 AgNPs 偶联的情况下,3 种食源性致病菌芽孢的拉曼光谱图未出现任何显著特征峰型,而经过 AgNPs 偶联的 *C. perfringens spores*, *C. difficile spores* 和 *B. cereus spores* 均显示出明显增强效应的拉曼光谱,且 3 种芽孢的拉曼信号谱峰图之间差异明显。因此,采用以 AgNPs 溶胶为基底的 SERS 技术检测和区分这 3 种食源性致病菌芽孢是可行的。

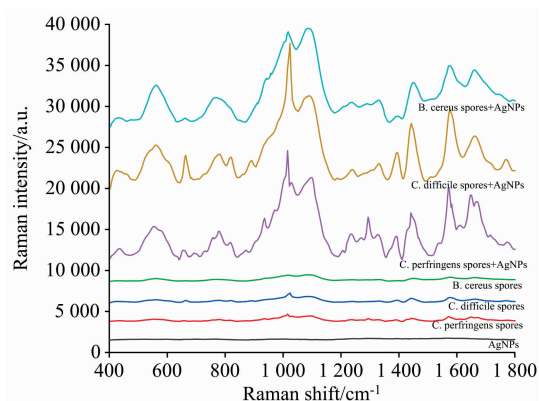


图 3 AgNPs 对 3 种食源性致病菌芽孢的 SERS 增强效果

Fig. 3 SERS enhancement effect of AgNPs on three food-borne pathogenic bacteria spores

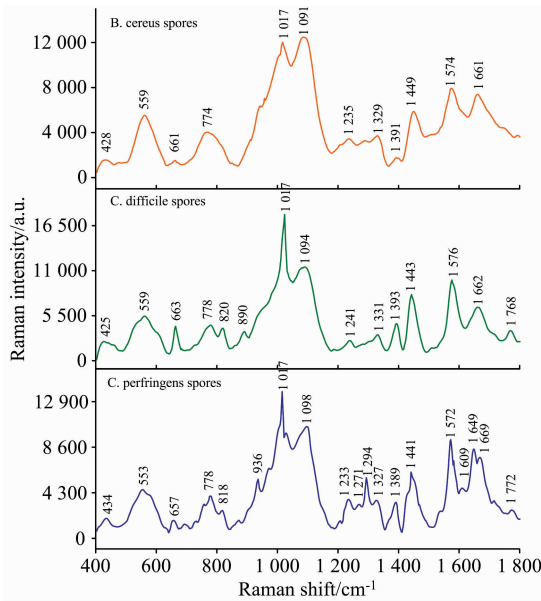


图 4 三种食源性致病菌芽孢的 SERS 平均指纹图谱
Fig. 4 SERS average fingerprints of three food-borne pathogenic bacteria spores

在 3 种食源性致病菌芽孢 SERS 光谱中 Ca^{2+} -DPA 的拉曼振动峰数量和出峰强度占主要地位，原因是芽孢中 Ca^{2+} -DPA 浓度较高(估计为芽孢干重的 5%~15%)，其拉曼振动

峰位置大约在 657~663, 818~820, 1 017, 1 389~1 393, 1 441~1 449 和 1 572~1 576 cm^{-1} 波段。将 Ca^{2+} -DPA 的六个特征峰分别编号为 C_1 — C_6 ，并对 C_1 — C_6 分别在 3 种芽孢的出峰强度进行对比，结果如表 2 所示。由表 1 可知， Ca^{2+} -DPA 的六个特征峰在 3 种芽孢 SERS 光谱中差异明显，*C. difficile spores* SERS 光谱中 Ca^{2+} -DPA 的六个特征峰峰强度均高于 *C. perfringens spores* 和 *B. cereus spores*，*C. perfringens spores* 次之。3 种芽孢的 Ca^{2+} -DPA 在 1 017 cm^{-1} (Ca^{2+} -DPA) 处拉曼峰强度均最高且差异明显，是 Ca^{2+} -DPA 的主要特征峰，也是区别三种芽孢的主要特征峰。

3 种食源性致病菌芽孢在 425~434, 553~559, 774~778, 1 091~1 098, 1 233~1 236, 1 327~1 331 和 1 661~1 669 cm^{-1} 波段均有明显拉曼振动峰，除 1 094 cm^{-1} 在 *B. cereus spores* 出峰强度明显高于其他两种芽孢外，其余每个波段拉曼振动峰的出峰强度在 3 种芽孢中基本一致。这些拉曼振动峰分别归属于淀粉中碳水化合物的骨架模式、蛋白质 S—S 拉伸、核酸中的腺嘧啶或尿嘧啶、核酸中的 $\text{O}=\text{P}-\text{O}$ 伸缩振动、 $\text{C}-\text{H}_2$ 拉伸振动、蛋白质中的 $\text{C}-\text{H}$ 变形振动和不饱和脂质中的酰胺 I。

除此之外，在 3 种食源性致病菌芽孢的 SERS 指纹图谱可以观察到三者拉曼振动峰数量明显不同(*C. perfringens spores* > *C. difficile spores* > *B. cereus spores*)，不同的拉曼振动峰归属于食源性致病菌芽孢的不同组成成分和化学键振动形式。*C. perfringens spores* 在 936 cm^{-1} (磷脂 $\text{N}-\text{C}$ 拉

表 1 三种食源性致病菌芽孢 SERS 光谱拉曼位移的暂定归属^[10-13]

Table 1 Tentative attribution of Raman shift of SERS spectra of three food-borne pathogenic bacteria spores

| 拉曼位移/ cm^{-1} (本研究) | 拉曼位移/ cm^{-1} (文献资料) | 峰位归属 | <i>C. perfringens</i> <i>spores</i> | <i>C. difficile</i> <i>spores</i> | <i>B. cereus</i> <i>spores</i> |
|---------------------------------|----------------------------------|---|--|--------------------------------------|-----------------------------------|
| 425~434 | 481 | 碳水化合物的骨架模式(淀粉) | + | + | + |
| 553~559 | 540~560 | S—S 拉伸(蛋白质) | ++ | ++ | ++ |
| 657~663 | 662 | Ca^{2+} -DPA | + | ++ | + |
| 774~778 | 776 | 腺嘧啶或尿嘧啶(核酸) | ++ | ++ | ++ |
| 818~820 | 810~827 | Ca^{2+} -DPA | + | + | + |
| 890 | 880~900 | $=\text{C}-\text{O}-\text{C}=\text{C}$ 拉伸 | - | + | - |
| 936 | 930~957 | 磷脂 $\text{N}-\text{C}$ 拉伸 | + | - | - |
| 1 017 | 1 017 | Ca^{2+} -DPA | ++++ | ++++ | ++++ |
| 1 091~1 098 | 1 092 | $\text{O}=\text{P}-\text{O}$ 伸缩振动(核酸) | ++ | ++ | +++ |
| 1 233~1 236 | 1 220~1 248 | $\text{C}-\text{H}_2$ 拉伸振动 | + | + | + |
| 1 271 | 1 273 | 酰胺 III(蛋白质) | + | - | - |
| 1 294 | 1 297 | CH_2 变形振动(脂质) | ++ | - | - |
| 1 327~1 331 | 1 323~1 334 | $\text{C}-\text{H}$ 变形振动(蛋白质) | + | + | + |
| 1 389~1 393 | 1 393, 1 397 | Ca^{2+} -DPA | ++ | ++ | + |
| 1 441~1 449 | 1 445, 1 448 | Ca^{2+} -DPA | ++ | ++ | ++ |
| 1 572~1 576 | 1 570~1 576 | Ca^{2+} -DPA | +++ | +++ | +++ |
| 1 609 | 1 616 | 酪氨酸(蛋白质) | + | - | - |
| 1 649 | 1 655 | 酰胺 I(蛋白质) | ++ | - | - |
| 1 661~1 669 | 1 665 | 酰胺 I(不饱和脂质) | ++ | ++ | ++ |
| 1 768~1 772 | 1 745 | 酯的 $\text{C}=\text{O}$ 基团伸缩 | + | + | - |

注：“+”表示在光谱上有条带，“+”数量多少代表拉曼峰强度的大小。“-”表示光谱上没有的谱峰

Note: “+” indicates that there is a band on the spectrum, and the number of “+” indicates the intensity of Raman peak; “-” represents no spectral peak on the spectrum

表 2 Ca^{2+} -DPA 六个特征峰分别在 3 种芽孢 SERS 光谱的出峰强度对比Table 2 Comparison of six characteristic peaks of Ca^{2+} -DPA in SERS spectra of three spores

| 特征峰编号 | <i>C. perfringens</i> spores | <i>C. difficile</i> spores | <i>B. cereus</i> spores |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| C ₁ | 691.56±111.44 ^b | 3 203.56±114.32 ^a | 514.07±164.20 ^c |
| C ₂ | 1 627.82±110.73 ^b | 2 961.78±116.63 ^a | — |
| C ₃ | 12 848.73±122.95 ^b | 16 867.77±129.82 ^a | 11 035.27±174.48 ^c |
| C ₄ | 2 364.93±135.98 ^b | 3 536.54±141.93 ^a | 760.33±200.46 ^c |
| C ₅ | 5 252.11±137.85 ^b | 7 083.81±145.53 ^a | 4 860.83±201.51 ^c |
| C ₆ | 8 317.11±136.46 ^b | 8 849.84±151.83 ^a | 6 924.89±197.80 ^c |

注：平均值±标准差；同行数值有共同上标字母表示差异不显著 ($p>0.05$)；同行数值有不同上标字母表示差异显著 ($p<0.05$)；“—”表示光谱上没有的谱峰

Note: Mean±Standard deviation; There were no significant difference in the values of peers with the same superscript on the same row ($p>0.05$); There were significant differences in the values of peers with different superscript letters on the same row ($p<0.05$); “—” represents no spectral peak on the spectrum

伸)、1 294 cm^{-1} (脂质中的 CH_2 变形振动)、1 609 cm^{-1} (蛋白质中的酪氨酸)和 1 649 cm^{-1} (蛋白质中的酰胺 D)显示特有拉曼振动峰; *C. difficile* spores 在 890 cm^{-1} ($=\text{C}-\text{O}-\text{C}=\text{}$ 拉伸)显示特有拉曼振动峰。1 768~1 772 cm^{-1} (酯的 $\text{C}=\text{O}$ 基团伸缩)在 *C. perfringens* spores 和 *C. difficile* spores 均有显示,但是不存在于 *B. cereus* spores 中。由此可见,3 种食源性致病菌芽孢 SERS 光谱图谱中可以观察到一些拉曼振动峰出峰位置和出峰强度的差异,表明以 AgNPs 溶胶为基底的 SERS 技术具有区分不同类型食源性致病菌芽孢的能力。

2.4 三种芽孢食源性致病菌 SERS 光谱重现性试验

SERS 基底的重现性对于常规分析的实际应用至关重要。为检验基于 AgNPs 溶胶基底材料对五种食源性致病菌 SERS 检测的重现性,使用激光共聚焦拉曼光谱仪分别对 3 种食源性致病菌样本随机扫描 12 次,并对 3 种食源性致病菌芽孢在 1 017 cm^{-1} (Ca^{2+} -DPA)处拉曼峰值的相对标准偏差(RSD)进行计算。3 种食源性致病菌芽孢 SERS 光谱的重现性试验结果如图 5 所示,每种芽孢的 12 次 SERS 光谱具有良好的的一致性。经计算,*C. perfringens* spores 在 1 017 cm^{-1} 处的拉曼峰值 RSD 为 0.96%,*C. difficile* spores 在 1 017 cm^{-1} 处的拉曼峰值 RSD 为 0.77%,*B. cereus* spores 在 1 017 cm^{-1} 处的拉曼峰值 RSD 为 1.58%,表明基于 AgNPs 溶胶为基底材料的 SERS 技术检测食源性致病菌芽孢具有高度重现性,为基于 SERS 技术对食源性致病菌芽孢的快速检测提供了强有力的支持。

2.5 多元统计分析结果

主成分分析(PCA)可以提取 3 种芽孢 SERS 光谱中具有最高累积方差的前两个主成分 PC1 和 PC2 并进行 PCA 二维散点图绘制,将复杂的多维空间数据转变为直观可见的分布散点图。系统聚类分析(HCA)可以将 3 种芽孢 SERS 光谱进行先聚类再判断分析并构建树状图,判断研究对象种群之间的相似性与差异性。

为了更好地实现不同食源性致病菌芽孢的定性识别,避免相似的拉曼振动光谱对微生物分类和鉴定的干扰。利用 PCA 和 HCA 分析,评估基于 AgNPs 溶胶为基底材料的 SERS 技术检测 3 种食源性致病菌芽孢的图谱差异性,分析结果如

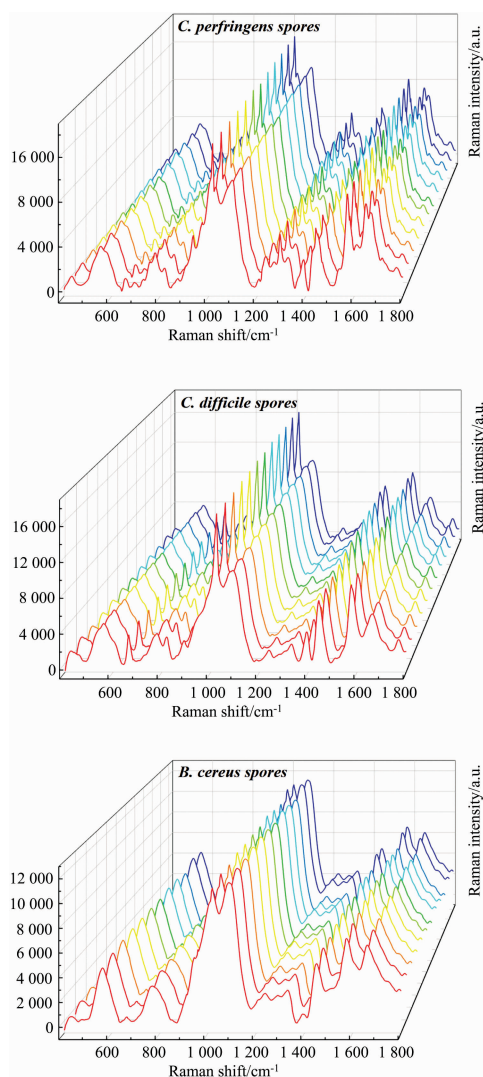


图 5 三种食源性致病菌芽孢 SERS 光谱的重现性试验
Fig. 5 Repeatability test of SERS spectra of three food-borne pathogenic bacteria spores

图 6 和图 7 所示。PCA 分析结果显示 PC1 和 PC2 方差贡献率分别为 51.1%和 39.7%,累积贡献率达 90.8%,且 PCA

分析可以很明显地将 3 种芽孢的聚集成 3 个独立的簇，每个簇独立无重复，每种芽孢都能彼此区分开。HCA 分析可以看出 3 种芽孢被分为三个聚类，3 种各自聚类无交叉干扰。在聚类距离 21 处 *C. perfringens* spores 和 *C. difficile* spores 被聚为一类，相对于 *B. cereus* spores, *C. perfringens* spores 和 *C. difficile* spores 的 SERS 特征拉曼光谱较相似，表明属于梭菌属芽孢的 *C. perfringens* spores 和 *C. difficile* spores 化学结构和组成相似性较高，属于杆菌属芽孢的 *B. cereus* spores 在结构和组成成分上与其存在区分，与 Christie^[14] 等研究相似。通过 PCA 和 HCA 分析不仅有效实现了 3 种芽孢之间的区分，也实现了梭菌属芽孢和杆菌属芽孢的区分。

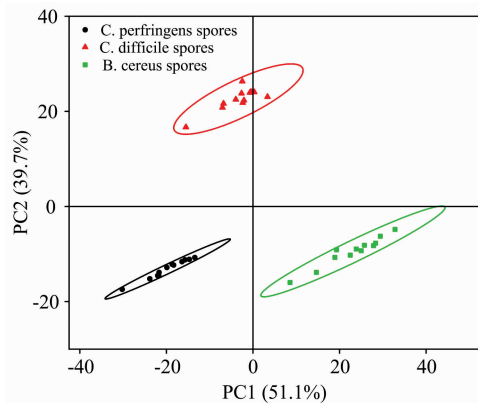


图 6 三种食源性致病菌芽孢 SERS 图谱的主成分分析 (PCA) 二维散点图

Fig. 6 Two-dimensional scatter plot of principal component analysis (PCA) of SERS maps of spores of three food-borne pathogens

3 结 论

利用柠檬酸钠还原法制备 AgNPs 溶胶的 SERS 增强作用，通过激光共聚焦拉曼光谱检测可以发现与 AgNPs 偶联的

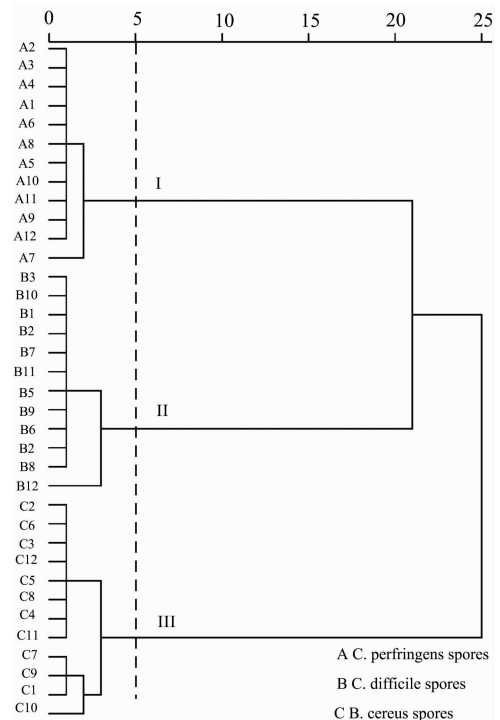


图 7 三种食源性致病菌芽孢 SERS 图谱的 HCA 结果树状图
Fig. 7 HCA resulting dendrogram of SERS maps of spores of three food-borne pathogens

C. perfringens spores, *C. difficile* spores 和 *B. cereus* spores 均显示出明显增强效应的拉曼光谱图且光谱重现性良好。3 种芽孢的 SERS 光谱中 Ca^{2+} -DPA 的拉曼振动峰数量和出峰强度占主要地位，且在 SERS 图谱中可以观察到拉曼振动峰的差异，表明以 AgNPs 溶胶为基底的 SERS 技术具有区分不同类型食源性致病菌芽孢的能力。结合多元统计分析，不仅有效实现了 3 种芽孢之间的区分，也实现了梭菌属芽孢和杆菌属芽孢的区分，为食源性致病菌芽孢检测和食品安全风险控制及检测提供了有效手段。

References

- [1] Saravanan A, Kumar P S, Hemavathy R V, et al. Environmental Chemistry Letters, 2021, 19(1): 189.
- [2] Setlow P. Journal of Applied Microbiology, 2019, 126(2): 348.
- [3] Qu L L, Ying Y L, Yu R J, et al. Microchimica Acta, 2021, 188(6): 201.
- [4] Zhu Y, Zhang J, Li M, et al. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 232: 117997.
- [5] Yan S, Wang S, Qiu J, et al. Talanta, 2021, 226: 122195.
- [6] Witkowska E, Korsak D, Kowalska A, et al. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2017, 409(6): 1555.
- [7] Yang D, Zhou H, Haisch C, et al. Talanta, 2016, 146: 457.
- [8] Li J, Wang C, Shi L, et al. Microchimica Acta, 2019, 186(7): 457.
- [9] Kelestemur S, Culha M. Applied Spectroscopy, 2017, 71(6): 1180.
- [10] René Breuch, Daniel Klein, Eleni Siefke, et al. Talanta, 2020, 219: 121315.
- [11] Chisanga M, Muhamadali H, Ellis D I, et al. Applied Spectroscopy, 2018, 72(7): 987.
- [12] Gao W, Li B, Yao R, et al. Analytical Chemistry, 2017, 89(18): 9836.
- [13] Mungroo N A, Oliveira G, Neethirajan S. Microchimica Acta, 2016, 183(2): 697.
- [14] Christie G, Setlow P. Cellular Signalling, 2020, 74: 109729.

Raman Spectroscopic Characteristic Structure Analysis and Rapid Identification of Food-Borne Pathogen Spores Based on SERS Technology

LIU Shi-jie¹, ZHU Yao-di^{1, 2}, LI Miao-yun^{1, 2*}, ZHAO Gai-ming^{1, 2}, ZHAO Li-jun^{1, 2}, MA Yang-yang^{1, 2}, WANG Na¹

1. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450000, China

2. International Joint Laboratory of Meat Processing and Safety in Henan Province, Zhengzhou 450000, China

Abstract In order to explore the Raman fingerprint of food-borne pathogenic bacteria spores for rapid identification. In this study, the spores of *C. perfringens*, *C. difficile* and *B. cereus* were used as the research objects. The SERS technology of AgNPs synthesized by the sodium citrate reduction method was used to detect the Raman spectroscopy of food-borne pathogenic bacteria spores and analyze the similarities or differences among different spores. The SERS spectra of three kinds of food-borne pathogenic bacteria spores were combined with principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for comparative analysis to identify different species of food-borne pathogenic bacteria spores. The results showed that the SERS spectra of different food-borne pathogen spores had sufficient specificity and reproducibility. In the SERS spectra of spores, the number and intensity of Raman vibration peaks of Ca^{2+} -DPA were dominant, and the Raman vibration peaks were located at $657\sim 663$, $818\sim 820$, $1\ 017$, $1\ 389\sim 1\ 393$, $1\ 441\sim 1\ 449$ and $1\ 572\sim 1\ 576\ \text{cm}^{-1}$. The intensity of six characteristic peaks of Ca^{2+} -DPA in SERS spectra of *C. difficile* spores were higher than that of *C. perfringens* spores and *B. cereus* spores, followed by *C. perfringens* spores. The Raman peak intensity of Ca^{2+} -DPA at $1\ 017\ \text{cm}^{-1}$ (Ca^{2+} -DPA) of the three spores was the highest, and the difference was noticeable, which was the main characteristic peak of Ca^{2+} -DPA and the main characteristic peak of the three spores. In addition, *C. perfringens* spores showed unique Raman peaks at $936\ \text{cm}^{-1}$ (N—C stretching of phospholipid), $1\ 294\ \text{cm}^{-1}$ (CH_2 deformation vibration of lipid), $1\ 609\ \text{cm}^{-1}$ (tyrosine of protein) and $1\ 649\ \text{cm}^{-1}$ (amide I of protein). *C. difficile* spores showed unique Raman peaks at $890\ \text{cm}^{-1}$ ($=\text{C}-\text{O}-\text{C}=\text{}$ stretching). PCA analysis showed that the variance contribution rates of PC1 and PC2 were 51.10% and 39.70%, respectively, and the cumulative contribution rate was 90.8%, which could effectively distinguish all samples. HCA analysis indicated that the SERS spectra of the three spores were divided into three clusters, and each cluster of the three spores had no cross-interference. The combination of multivariate statistical analysis effectively realized the distinction among the three spores and distinguished the distinction between Clostridium spores and Bacillus spores, providing an effective means for food safety control.

Keywords Food-borne pathogenic bacteria spores; SERS; AgNPs; Spectral analysis; Rapid identification

(Received Jul. 17, 2021; accepted Nov. 17, 2021)

* Corresponding author