

# 傅立叶变换红外光谱结合化学计量学在微生物判别、分类、鉴定中的应用

蔡飞<sup>1</sup>, 陆峰<sup>2</sup> (1. 广州军区直属第二门诊部药械科, 广州 510080; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

**摘要** 目的:介绍傅立叶变换红外光谱 (FTIR) 结合化学计量学处理在微生物定性中的应用。方法:以国内外代表性的文献进行归纳综述。结果:微生物的红外信号具有很强的指纹特征,制样简单,采样形式多样,结合分级聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和人工神经网络法 (artificial neural network, ANN) 等化学计量学方法,在细菌、酵母或其他微生物的判别、分类、鉴定和大范围筛选中获得越来越广泛的应用。结论:FTIR 技术具有简便、快速、易操作的特点,结合化学计量学处理,其研究领域不断扩大,正在成为微生物研究中的一个重要的工具。

**关键词** 傅立叶变换红外光谱;微生物;定性分析;化学计量学

**中图分类号:**R917 **文献标识码:**D **文章编号:**1006-0111(2002)04-0238-03

## 1 引言

红外光谱法早在 20 世纪 50 年代起就开始运用于区分不同的微生物。随着现代干涉型红外光谱仪、傅立叶变换技术以及计算机的发展,这一研究领域又有了新的进展。1991 年,Naumann 等在 Nature 杂志<sup>[1]</sup>中指出傅立叶变换红外光谱法 (fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 具有判别、分类和鉴别微生物的能力。这篇论文及其后续的相关文章<sup>[2]</sup>成为这一研究领域的经典参考文献。越来越多的研究者开始用 FTIR 技术研究微生物的性状特征。

FTIR 技术以未损伤细胞的 FTIR 光谱的特殊指纹区为基础,光谱反映的是整个细胞组成分子的振动特征<sup>[3]</sup>,也就是蛋白质、核酸等物质的特征,因此可以区分生化信息上的差别。目前大部分的研究对象为细菌和酵母菌,少数为真菌和藻类。这些研究通常依据微生物分类学上的类别,对菌株进行判别或鉴别。也有依据细菌的革兰阴性或阳性、对抗生素的敏感程度等进行菌株的判别研究。不同微生物在光谱上的差别通常无法用肉眼识别,需要提取特殊信息,采用统计学处理,并结合不同的化学计量学方法<sup>[4]</sup>。

## 2 光谱采集

该研究中应用最普遍的是 FTIR 透射技术,即将样品涂在 ZnSe 窗片上,其它如漫反射、镜面反射和衰减全反射技术等研究较少。显微红外光谱技术,可以采用透射方式,也可以直接采集琼脂板上菌落的原位光谱<sup>[5]</sup>。吸收光谱常用的分辨率为  $2\text{cm}^{-1}$  到  $8\text{cm}^{-1}$ ,一般同一菌株多次采样,以验证光谱的重

现性,在必要时计算平均光谱。然后对光谱进行下列处理:①基线校正,以避免基线偏移导致的光谱差异。②归一化,以消除样品量不同带来的光谱差异,一般按最强吸收带 (酰胺 I 带,  $1640\text{cm}^{-1}$ ) 进行归一化处理,或者在给定光谱区域里归一化至相同强度。③求一阶、二阶导数光谱,以减小基线变异,增强分辨率。求算一阶导数可以得到最好的结果。

## 3 统计方法

根据研究目的不同可以采用两种统计方法:无监督型法和监督型法。

### 3.1 无监督型法

指在微生物确切分类未知的情况下对光谱数据进行表述的方法。运用主成分分析 (PCA) 可以在不降低光谱差异的前提下,减少数据维数<sup>[6]</sup>。而后将每一条光谱与其它光谱进行比较,将相同光谱归类,绘出散点图,每一散点代表一条光谱。也可以采用分级聚类分析 (HCA),用光谱间的距离作为判定依据。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。

无监督方法通常用来揭示微生物光谱的相似性:相同的属、种以及对一种抗生素的耐药或敏感性。另外,计算未知光谱和模型中光谱的距离,或者将未知光谱并入模型重新聚类分析,也可以对未知光谱进行鉴别。

### 3.2 监督型法

即每一条光谱对应微生物的类别是已知的,然后将已知类别性质数据与光谱数据一起进行量化运

算。这里运用的方法常为判别函数分析 (discriminant function analysis, DFA), 判别分析 (discriminant analysis, DA), 标准差分析 (canonical variate analysis, CVA) 等。它们的目的是形成数据的加权线性组合, 使得同类微生物之间的光谱变异降到最小, 同时放大不同类微生物之间的光谱差异。例如, 采用马氏距离得到的类别间的距离, 就可以对光谱进行很好的分类。该方法的有效性可以通过比较类别内/间的距离来论证, 不同类别之间的距离必定比类别内部的距离更为明显。也可以用另一种方法检验鉴别方法的有效性: 在样品足量的情况下, 将其分为两组, 一为训练组, 用来完成自我训练, 另一为实验组, 用来论证方法的有效性。如果微生物光谱数据太少, 则可以将每一个观察数据从数据组内依次取出, 用剩下的数据组校准取出的数据, 即内部交叉验证。鉴别的正确率可以判断方法的可靠性。

上述方法首先被用在判别不同的菌株或者是同一菌种的不同的菌株群; 其次, 作为预测的方法, 可以根据光谱间的马氏距离最小的原则, 将一条新的光谱划分到某个光谱 (菌株) 群中。K 最近邻法 (K - nearest neighbor, KNN)<sup>[7]</sup> 和较现代的 ANN<sup>[8]</sup> 也可以用来对新的未知样品进行分类。

#### 4 分类与鉴别

在无监督型法中, 最为常用的是 HCA, 通常用来估计光谱之间的相似性, 选择合适算法并描绘树状分支图对微生物进行判定。不同算法得到的结果偶尔会有不同, 但对于只提供一个菌株进行判别的细菌, 菌种间的区分一般是成功的。例如, Haag 对放线菌的 16 株菌株进行分类, 结果与实际种或属是一致的<sup>[9]</sup>; Bastert 将 3 个菌种的 27 株真菌归类为三簇光谱, 其结果同样较好<sup>[10]</sup>。

但是, 根据分类将不同菌株归类形成光谱簇以表征菌种或者菌属, 结果并非总令人满意。Johsen 和 Nielsen<sup>[11]</sup>, 以及 Kummerle 等人<sup>[12]</sup>, 在研究过程中发现分类结果与实际情况之间存在一定差异。Timmins 等人<sup>[13]</sup> 在判别 29 株念珠菌分离株时, 有两株误判。如果未知菌株或菌种的光谱包含在光谱数据库里<sup>[12]</sup>, 那么鉴别未知样品成功的百分率较高。

监督型法实际运用相对较少。Lefier 等<sup>[14]</sup> 运用 CVA 分开了 7 种李斯特杆菌和 5 种不同血清型的单核细胞增多型李斯特杆菌, 并对乳酸乳球菌的两个亚种进行判别, 使得在生产过程中有可能对乳酪的菌丛进行评估。运用无监督型法中的 PCA 将光谱数据降维后再结合 DA 方法, 在细菌判别上同样

可以得到较好的结果。通过 CVA 或者 DA 等监督型法得到的判别和鉴定结果比无监督型法得到的结果更具有可比性。ANN 比 PCA、HVA 等方法更具有优越性, Tintelnot 等人<sup>[15]</sup> 运用 ANN 分开了两个不同菌种的念珠菌。

#### 5 其他研究领域

FTIR 结合化学计量学同样也是判断革兰阳性和阴性细菌的简单途径。运用 HCA 得到的树状分支图可以清楚的区分革兰阴性和阳性菌种。Lang 和 Sang<sup>[5]</sup> 将属于 12 个菌属的 26 种菌进行了分类, 用主成分回归分析预测了细菌的该性状。

Sockalingum 等人<sup>[16]</sup> 根据菌株对于抗生素的敏感或耐药性, 运用 PCA 判别了对亚胺培南敏感和耐受的铜绿假单胞菌菌株。与传统的分析方法相比, FTIR 在分析未知样品特征性状时更为快速, 可以对菌株进行快速筛选。但是, 耐受和敏感菌株之间的差异要比不同菌种间的差异小得多, 因而对它们之间进行区分鉴定就需要寻找更为特征的光谱区域, 所用的化学计量学的方法也更为复杂。

Irmsher 等人<sup>[17]</sup> 研究同菌种的临床分离株, 进行方法间的对比, 发现由 FTIR 和 HCA 得到的分类情况与 DNA 片段的脉冲场凝胶电泳 (pulsed-field gel electrophoresis PFGE) 或者多位点酶电泳 (multi-locus enzyme electrophoresis MEE) 得到的结果具有很好的相关性。与 PFGE 相比, FTIR 的优势在于快速、重演。Schmalreck 等人<sup>[18]</sup> 依据标准化步骤, 连续 3 年用 FTIR 鉴别重复从病人体内分离得到同样的酵母菌株, 推动了该项研究的临床应用。陆峰等人<sup>[19]</sup> 考察了不同菌种菌株之间, 敏感型、耐药型菌之间以及不同耐药类型、程度的菌株之间的红外光谱差异, 采用聚类分析, 快速鉴别了新型隐球菌和白念珠菌, 白念珠菌的敏感株和耐药株, 有助于临床对细菌进行快速鉴别。

另外, Schuster 等人<sup>[20]</sup> 用 FTIR 技术监测微生物培养过程中的生理性状, 有可能根据培养中不同时期光谱信号, 判别微生物的生物活性。

#### 6 结论

FTIR 在判定鉴别微生物方面的地位越来越重要。只要提供细胞生长的标准条件和规范统一的样品前处理, 该方法的重演性将会更好。

与细菌生物分型或者基因组分析这些繁琐的方法相比, FTIR 技术结合化学计量学在微生物定性上的主要优势在于简便、快速、易操作, 有助于临床对微生物进行快速的鉴别分类, 寻找合适的抗菌药物。

目前国内该项工作刚刚起步,研究较少,有待于更为深入的研究。FTIR 技术正逐渐成为微生物研究中的一个重要工具。

#### 参考文献:

- [1] Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy [J]. *Nature*, 1991, 351(6321): 81.
- [2] Helm D, Labischinski H, Challehn GS, *et al.* Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy [J]. *J Gen Microbiol*, 1991, 137(pt1): 69.
- [3] 李 胜,周学秋. 傅立叶变换红外光谱进行微生物特征的研究[A]. 见:布鲁克光学仪器公司编. 傅立叶红外光谱仪技术及应用论文集[C]. 武汉,2000:151.
- [4] 吴瑾光,近代傅立叶变换红外光谱技术及应用(上卷)[M]. 北京:科学技术文献出版社,1994,282.
- [5] Lang PL, Sang SC, The in site infrared microspectroscopy of bacterial colonies on agar plate [J]. *Cell Mol Biol*, 1998, 44(1): 237.
- [6] 任玉林, 柳春亭, 逯家辉. 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.
- [7] Holmes E, Nicholls AW, Lindon JC, *et al.* Chemometric models for toxicity classification based on NMR Spectra of Biofluids [J]. *Chem Res Toxicol*, 2000, 13(6): 471.
- [8] Goodacre R, Timmins EM, Burton R, Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism fingerprinting and artificial neural networks [J]. *Microbiology*, 1998, 144(pt5): 1157.
- [9] Haag H, Gremlich HU, Bergmann R, *et al.* Characterization and identification of actinomycetes by FT-IR spectroscopy [J]. *J Microbiol Meth*, 1996, 27(2-3): 157.
- [10] Bastert J, Korting HC, Traenkle P, *et al.* Identification of dermatophytes by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) [J]. *Mycosis*, 1999, 42(9-10): 525.
- [11] Johnsen K, Nielsen P, Diversity of *Pseudomonas* strains isolated with King's B and Gould's SI agar determined by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction, 16s rDNA sequencing and Fourier transform infrared spectroscopy characterization [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 173(1): 155.
- [12] Kummerle M, Scherer S, Seiler H, Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(6): 2207.
- [13] Timmins EM, Howell SA, Alsberg KA, *et al.* Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy [J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(2): 367.
- [14] Lefier D, Hirst D, Holt C, *et al.* Effect of sampling procedure and strain variation in *Listeria monocytogenes* on the discrimination of species in the genus *Listeria* by Fourier transform infrared spectroscopy and canonical variates analysis [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 147(1): 45.
- [15] Tintelnott K, Haase G, Seibold M, *et al.* Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis* [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(4): 1599.
- [16] Sockalingum GD, Bouhedja W, Pina P, *et al.* ATR-FTIR spectroscopic investigation of imipenem-susceptible and-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isogenic strains [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 232(1): 240.
- [17] Irmischer HM, Fischer R, Beer W, *et al.* Characterization of nosocomial *Serratia marcescens* isolates: comparison of Fourier-transform infrared spectroscopy with pulsed-field gel electrophoresis of genomic DNA fragments and multilocus enzyme electrophoresis [J]. *Zentralbl Bakteriol*, 1999, 289(3): 249.
- [18] Schmalreck AF, Trankle P, Vanca E, *et al.* Differentiation and characterization of yeasts pathogenic for humans and algae pathogenic for animals using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in comparison with conventional methods [J]. *Mycosis*, 1998, 41(7): 71.
- [19] 陆 峰,徐 铮,林培英,等. 红外光谱法鉴别白念珠菌耐药菌株的初步研究[J]. 第二军医大学学报,待发表.
- [20] Schuster KC, Monitoring the physiological status in bioprocesses on the cellular level [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2000, 66: 185.

收稿日期:2002-03-03

## 自乳化莜术油软胶囊中莜术油的含量测定研究

李国栋<sup>1</sup>, 许 付<sup>2</sup>, 尤英微<sup>2</sup>, 钟延强<sup>1</sup>, 高 申<sup>1</sup>(1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 本校药学专业 2002 届毕业学员)

**摘要** 目的:建立自乳化莜术油软胶囊中莜术油含量测定方法。方法:采用可见光分光光度法,将胶囊中内容物用无水乙醇稀释后,采用香草醛硫酸溶液显色,于(520±2)nm 检测,测定其吸收度。结果:莜术醇浓度在 40~320μg·ml<sup>-1</sup> 范围内,线性关系良好( $r=0.9979$ ),回收率 96.59%,RSD 为 1.03%。结论:本方法准确,可靠,适合用于自乳化莜术油软胶囊制剂的含量测定。

**关键词** 分光光度法; 莜术油; 自乳化软胶囊