Application Note AN-RS-047

Schnelle phänotypische Identifizierung von Mikroorganismen mit Raman

Eine einfache und zerstörungsfreie Methode zur Bakterienanalyse

Mikroorganismen gehören zu den vielfältigsten Lebensformen auf der Erde. Sie weisen einzigartige Eigenschaften auf und spielen eine entscheidende Rolle in ökologischen Nährstoff- und Stoffkreisläufen. Mikroorganismen sind für die Lebensmittelproduktion, einschließlich Joghurt und alkoholischer Getränke, sowie für die Beseitigung von Umweltschadstoffen von entscheidender Bedeutung. Darüber hinaus erleichtert die genetische Modifikation von Mikroorganismen die Produktion wertvoller Produkte wie Insulin. Aufgrund ihrer Bedeutung unterhalten viele Länder spezialisierte Aufbewahrungsorte wie die American Type Culture Collection (ATCC) und die Swiss Collection of Microorganisms (SCM), um Mikroorganismen zu konservieren und zu sammeln.

Traditionell war zur Identifizierung von Mikroorganismen wie Bakterien die Sequenzierung ihrer genetischen Zusammensetzung erforderlich. Dieser teure Prozess erfordert spezielle Schulungen und Ausrüstung. Die Raman-Spektroskopie ist jedoch ein potenzielles Instrument zur Identifizierung von Bakterien und zum Nachweis der von der Kultur produzierten Metaboliten und bietet Einblicke in die Bioprozesse und Funktionen in einem Ökosystem. Das Labor-Raman-Portfolio von Metrohm umfasst Optionen für die 785 nm- und 1064 nm-Raman-Abfrage von Bakterienkulturen.

EINFÜHRUNG

Die Raman-Spektroskopie wird in der Mikrobiologie aufgrund ihres Potenzials zur Identifizierung von Bakterien und zur Überwachung von Metaboliten eingesetzt. Alle lebenden Organismen auf der Erde bestehen aus Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Phosphor, Schwefel und anderen Spurenelementen. Diese Elemente verbinden sich und bilden DNA, Lipide, Aminosäuren und andere Biomoleküle. Die Zusammensetzung dieser Biomoleküle variiert zwischen Organismen. Einige Bakterien speichern je nach Umweltbedingungen Metabolite (z. B. Polyphosphat und Glykogen). Die Raman-Spektren von Bakterien spiegeln diese chemischen Unterschiede wider, ermöglichen ihre Identifizierung und klären ihre Rolle in Bioprozessen auf.

EXPERIMENT

Lysogenie-Brühe (LB)-Agar-Kulturmedium wurde durch Auflösen von LB-Pulver und Agar-Pulver in deionisiertem Wasser gemäß den Herstellerangaben (Sigma-Aldrich) hergestellt. Nach dem Autoklavieren wurde die Mischung in sterilisierte Petrischalen aus Glas gegossen und abgekühlt. Nachdem der LB-Agar erstarrt war, wurden die Bakterien mit den Fingern auf die Oberfläche gedrückt, um sie auf das Medium zu übertragen. Die Petrischale wurde dann bei Raumtemperatur inkubiert, bis Bakterienkolonien beobachtet wurden.

Die Petrischale wurde auf einen BAC150B-Sondenhalter und ein BAC151C-Videomikroskop gestellt und Raman-Spektren von Kolonien und dem Kulturmedium gesammelt (Abbildung 1). Die Geräteeinstellungen und Erfassungsparameter sind zusammengefasst in Tabelle 1.

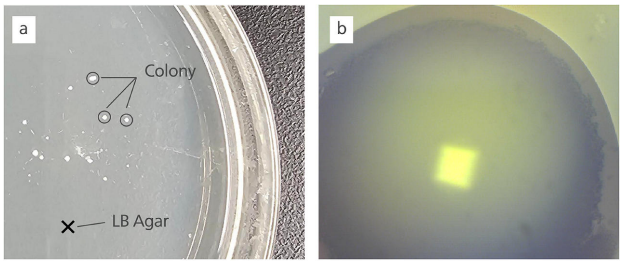
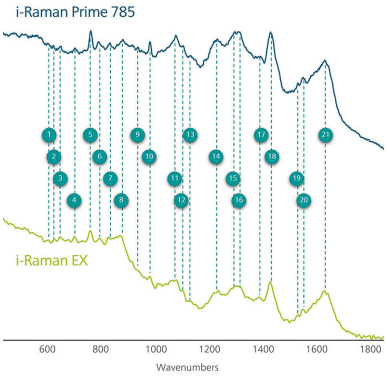


Abbildung 1. Auf dem LB-Agar gebildete Bakterienkolonien (a), mit einer vergrößerten Ansicht einer Kolonie unter dem BAC151C + 50x-Objektiv (b).

Tabelle 1. In dieser Studie verwendeter Instrumentenaufbau In dieser Studie verwendete Instrumentenaufbau und experimentelle Parameter. * Die Erfassungsparameter variieren je nach Kolonieeigenschaften.

Instrument	Sondenhalter (BAC150B)	Videomikroskop (BAC151C)
i-Raman Prime 785	BAC102-785HT	50x Objektiv
i-Raman EX	BAC102-1064HT	50x Objektiv
BWSpec Software		
Erfassungsparameter*		
Laserleistung (%)	30–100	
Integrationszeit	3–60 s	
Durchschnittswerte	3–5	

RAMAN-SPEKTRA EINER BAKTERIENKOLONIE



Position	cm-1	Assignments
1	622	Phenylalanine
2	642	Tyrosine
3	669	Guanine
4	723	Adenine
5	781	Guanine, cytosine, citric acid
6	811	Tyrosine
7	854	Tryptophan δ-ring
8	903	COC stretch
9	957	CN Stretch
10	1002	Phenylalanine
11	1101	Carbohydrate
12	1128	=C-C= unsaturated fatty acid
13	1156	Tyrosine
14	1253	Amide III
15	1321	Amide III
16	1337	Adenine
17	1419	COO- symmetric stretch
18	1454	CH2 bending (lipids)
19	1554	Tryptophan
20	1572	EPS
21	1654	Amide I

Abbildung 2. Raman-Spektren einer auf dem LB-Agar gebildeten Bakterienkolonie, gemessen mit i-Raman Prime 785 (blaugrüne Linie) und i-Raman EX (grüne Linie). Raman-Peaks, die den berichteten Merkmalen entsprechen, sind mit gepunkteten Linien markiert und in der Tabelle rechts zugeordnet [1].

Die Raman-Spektren der Bakterienkolonie (Abbildung 2) enthielten Peaks, die verschiedene Aminosäuren repräsentierten (1001, 1156 und 1654 cm^{-1}) und DNA (723, 669 und 1337 cm^{-1}). Diese bei Bakterien häufig beobachteten Merkmale bestätigen den Erfolg von i-Raman Prime 785 in der mikrobiellen Analyse [1].

Die Raman-Anregung bei 785 nm lieferte stärkere und schärfere Peaks als die Anregung bei 1064 nm. Dies ist auf die höhere Streuleistung des 785-nm-Lasers und die bessere Auflösung des Silizium-CCD-Detektors im Vergleich zum InGaAs-Array-Detektor mit geringerer Pixeldichte zurückzuführen. Eine Anregung mit 1064 nm kann jedoch die Fluoreszenz bei dunkel gefärbten Substraten wie Schokoladenagar oder Blutagar abschwächen.

DIFFERENZIERTE BAKTERIEN

Auf dem LB-Agar bildeten sich Bakterien mit zwei unterschiedlichen Morphologien (weiß und gelb), was darauf hindeutet, dass es sich um unterschiedliche Organismen handelt (Abbildung 3). Die Raman-Spektren dieser beiden Bakterien unterschieden sich deutlich. Die gelben Bakterien zeigten Peaks, die mit Farbpigmenten assoziiert werden, die häufig in Pflanzen und Mikroorganismen vorkommen [1].

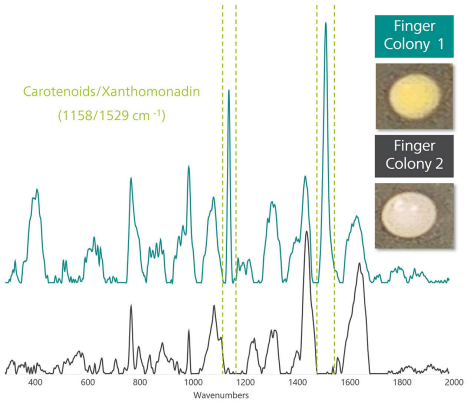


Abbildung 3. Raman-Spektren von gelben (blaugrüne Linie) und weißen (graue Linie) Bakterienkolonien, die sich auf dem LB-Agar gebildet haben. Spektren sind basislinienkorrigiert. Innerhalb der gepunkteten Linien angezeigte Raman-Peaks können mit der gelben Farbe dieser bestimmten Kolonie in Verbindung gebracht werden.

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) kann zur Unterscheidung von Bakterien mit unterschiedlichen phänotypischen Merkmalen in kleinen Bakteriengemeinschaften geeignet sein, wie in diesem Experiment (Abbildung 4). Allerdings entwickeln Forscher typischerweise Algorithmen für maschinelles Lernen, um subtile Unterschiede in kleineren Spitzen zu erkennen und so eine detailliertere Charakterisierung zu ermöglichen.

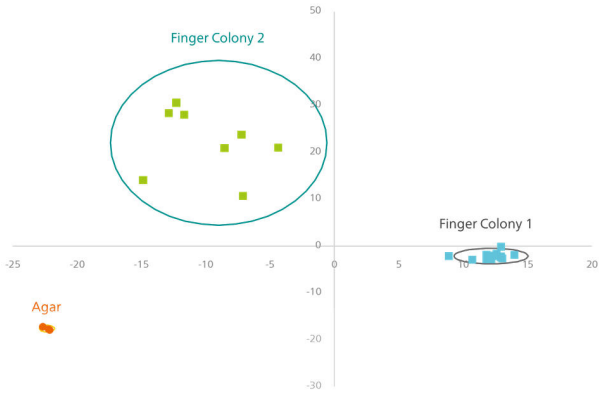


Abbildung 4. PCA-Diagramm von Raman-Spektren, die von weißen und gelben Kolonien auf LB-Agar gesammelt wurden. Konfidenzellipse 0,95.

ANMERKUNG ZUM FELDTEST

- Durch die Verwendung von Petrischalen aus Glas werden spektrale Beiträge von Kunststoff vermieden.
- Raman-Spektren von Kolonien können sich nach Lagerung bei niedrigen Temperaturen und längerer Kultivierung verändern.
- Ein Videomikroskop mit 1064 nm Laseranregung wird verwendet, um den Laserspot zu visualisieren

FAZIT

Mithilfe der Raman-Spektroskopie können Spektren von Bakterienkolonien direkt aus festen Kulturmedien gewonnen werden. Mit einer Anregung bei 785 nm erfasste Raman-Spektren bieten eine höhere Auflösung, während eine Anregung bei 1064 nm die Fluoreszenz des Kulturmediums reduziert.
Einfache Bakterienkolonien können mithilfe von PCA-Modellen differenziert werden, doch zur Charakterisierung komplexerer mikrobieller Gemeinschaften können fortschrittliche Algorithmen des maschinellen Lernens eingesetzt werden.
Benutzer können die Spektraldateien von i-Raman-Instrumenten problemlos zur weiteren Analyse mit der BWSpec-Software oder anderen fortschrittlicheren Tools für maschinelles Lernen exportieren.

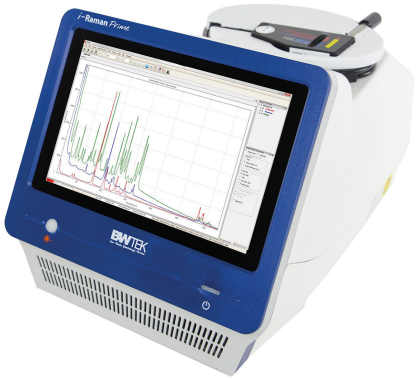
REFERENZ

1. Paret, M. L.; Sharma, S. K.; Green, L. M.; et al. Biochemical Characterization of Gram-Positive and Gram-Negative Plant-Associated Bacteria with Micro-Raman Spectroscopy. *Appl Spectrosc* 2010, *64* (4), 433–441. DOI:10.1366/000370210791114293

CONTACT

Metrohm Inula
Shuttleworthstraße 25
1210 Wien
office@metrohm.at

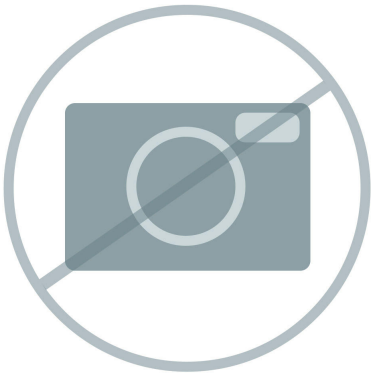
KONFIGURATION



i-Raman Prime 785S Tragbares Raman-Spektrometer

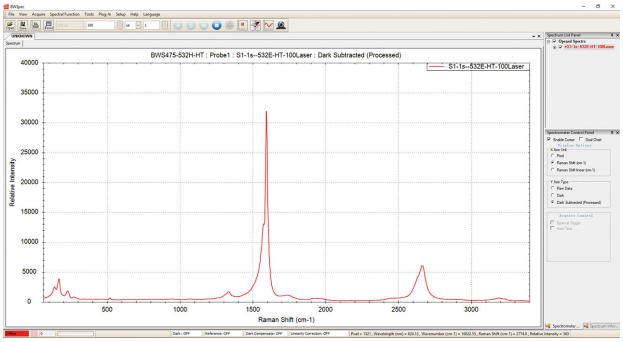
Das i-Raman® Prime 785S ist ein rauscharmes und vollständig integriertes Raman-System mit hohem Durchsatz, eingebautem Tablet-PC und einer Lichtleiter-Probensonde. Dieses tragbare Raman-Spektrometer nutzt einen CCD-Array-Detektor mit hoher Quanteneffizienz, TE-Tiefkühlung (-25 °C) sowie hohem Dynamikbereich und bietet so die Möglichkeit für Raman-Analysen auf Forschungsniveau, einschliesslich Quantifizierung und Identifikation in Echtzeit. Der hohe Durchsatz liefert Raman-Spektren mit hervorragendem Signal-Rausch-Verhältnis und ermöglicht damit die Messung schneller Prozesse sowie selbst schwächster Raman-Signale, sodass feine Probenunterschiede erkannt werden.

Das i-Raman Prime 785S verfügt neben seiner mobilen Bauweise über die einzigartige Kombination aus einem breiten Spektralbereich (150 cm^{-1} bis 3350 cm^{-1}) und einer hohen Auflösung (8 cm^{-1}). Das i-Raman Prime kann mit einem Akku betrieben werden und ist dadurch einfach zu transportieren. So können egal an welchem Ort hochpräzise sowie qualitativ und quantitativ hochwertige Raman-Analysen auf Forschungsniveau durchgeführt werden. Das System ist für den Einsatz mit unserer STRaman®-Technologie für Analysen durch nicht-transparente Verpackungen optimiert.



Videomikroskop-Objektiv, 50-fache Vergrösserung

Mikroskopobjektiv, unendlich korrigiert, 50-fache Vergrösserung, Arbeitsabstand (mm) = 9.15 Brennweite (mm) = 4 numerische Apertur (NA) = 0.55.
RML150A



Software BWSpec

BWSpec® ist die allgemeine Spektroskopiesoftware von B&W Tek zur Gerätesteuerung und Datenaufnahme, darunter für die Peakanalyse und Verlaufsaufzeichnung in Echtzeit. BWSpec ist die Betriebssoftware, die beim Kauf aller tragbaren Raman-Systeme und -Spektrometer von B&W Tek im Lieferumfang enthalten ist. Sie umfasst Funktionen für ein breites Anwendungsfeld und führt auf Knopfdruck komplexe Messungen und Berechnungen durch. Sie unterstützt mehrere Datenformate und bietet die Möglichkeit zur Optimierung von Messparametern, etwa der Integrationszeit und der Steuerung der Laser-Ausgangsleistung. Neben Datenaufnahme und Datenverarbeitung bietet sie auch automatischen Dunkelabtrag, Spektrenglättung, Basislinienkorrektur sowie Peaküberwachung und Verlaufsaufzeichnung.

i-Raman EX Tragbares Raman-Spektrometer

Das i-Raman® EX ist Bestandteil unserer preisgekrönten Serie der i-Raman tragbaren Raman-Spektrometer mit unserem patentierten CleanLaze®-Laser zur Anregung bei 1'064 nm. Dieses tragbare Raman-Spektrometer nutzt einen hochempfindlichen InGaAs-Array-Detektor mit TE-Tiefkühlung, hohem Dynamikbereich und einem auf hohen Durchsatz ausgelegten Spektrografen. Es bietet ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis, ohne Autofluoreszenz auszulösen, sodass eine breite Auswahl an Naturprodukten, biologischen Proben (z. B. Zellkulturen) und farbigen Proben gemessen werden kann.

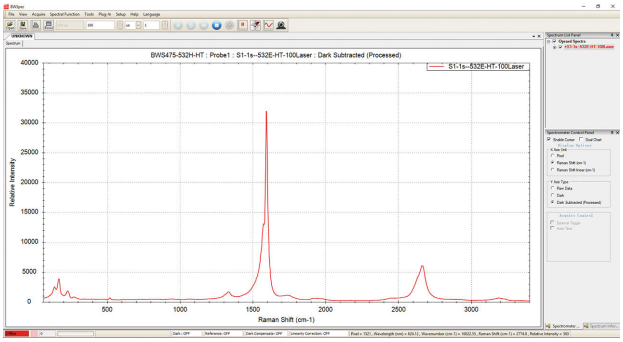
Das i-Raman EX deckt einen Spektralbereich von 100 cm^{-1} bis 2'500 cm^{-1} ab, was Messungen in der gesamten Fingerprint-Region ermöglicht. Die kleine Grundfläche des Systems, die leichte Bauweise und der geringe Energieverbrauch sorgen überall für die Möglichkeit, Raman-Analysen auf Forschungsniveau durchzuführen. Für erweiterte Analysemöglichkeiten kann es mit unserer unternehmenseigenen Software Vision sowie der multivariaten Analysesoftware BWIQ® und der Identifikationssoftware BWID® betrieben werden. Mit dem i-Raman EX haben Sie immer eine hochpräzise Raman-Lösung für qualitative und quantitative Analysen ohne Fluoreszenz zur Hand.

BWS485III

Videomikroskop-Objektiv, 50-fache Vergrösserung

Mikroskopobjektiv, unendlich korrigiert, 50-fache Vergrösserung, Arbeitsabstand (mm) = 9.15 Brennweite (mm) = 4 numerische Apertur (NA) = 0.55.

RML150A



Software BWSpec

BWSpec® ist die allgemeine Spektroskopiesoftware von B&W Tek zur Gerätesteuerung und Datenaufnahme, darunter für die Peakanalyse und Verlaufsaufzeichnung in Echtzeit. BWSpec ist die Betriebssoftware, die beim Kauf aller tragbaren Raman-Systeme und -Spektrometer von B&W Tek im Lieferumfang enthalten ist. Sie umfasst Funktionen für ein breites Anwendungsfeld und führt auf Knopfdruck komplexe Messungen und Berechnungen durch. Sie unterstützt mehrere Datenformate und bietet die Möglichkeit zur Optimierung von Messparametern, etwa der Integrationszeit und der Steuerung der Laser-Ausgangsleistung. Neben Datenaufnahme und Datenverarbeitung bietet sie auch automatischen Dunkelabtrag, Spektrenglättung, Basislinienkorrektur sowie Peaküberwachung und Verlaufsaufzeichnung.