Application Note AN-RS-047

Rapid phenotypic identification of microorganisms with Raman

A simple and nondestructive method for bacterial analysis

Microorganisms are among the most diverse life forms on Earth. They exhibit unique characteristics and play crucial roles in ecological nutrient and material cycles. Microorganisms are essential to food production, including yogurt and alcoholic beverages, and in the remediation of environmental contaminants. Additionally, genetic modification of microorganisms facilitates production of valuable products like insulin. Given their importance, many countries maintain specialized repositories like the American Type Culture Collection (ATCC) and the Swiss Collection of Microorganisms (SCM) to preserve and accumulate microorganisms.

Traditionally, identifying microorganisms such as bacteria involved sequencing their genetic makeup. This expensive process requires specialized training and equipment. However, Raman spectroscopy is a potential tool for identifying bacteria and detecting metabolites produced by the culture, providing insights into the bioprocesses and function in an ecosystem. Metrohm's laboratory Raman portfolio contains options for 785 nm and 1064 nm Raman interrogation of bacterial cultures

INTRODUCTION

Raman spectroscopy is used in microbiology for its potential to identify bacteria and monitor metabolites. All living organisms on Earth are composed of carbon, hydrogen, oxygen, nitrogen, phosphorus, sulfur, and other trace elements. These elements bond together to form DNA, lipids, amino acids, and other biomolecules. The composition of these biomolecules varies between organisms. Some bacteria store metabolites (e.g., polyphosphate and glycogen) depending on environmental conditions. The Raman spectra of bacteria reflect these chemical differences, enabling their identification and elucidating their roles in bioprocesses.

EXPERIMENT

Lysogeny broth (LB) agar culture media was prepared by dissolving LB powder and agar powder in deionized water following manufacturer specifications (Sigma-Aldrich). After autoclaving, the mixture was poured into sterilized glass petri dishes and cooled. Once the LB agar solidified, fingers were pressed onto the surface to transfer bacteria to the media. The petri dish was then incubated at room temperature until bacterial colonies were observed.

The petri dish was placed on a BAC150B probe holder and BAC151C Video microscope, and Raman spectra were collected from colonies and the culture media (Figure 1). Instrument setup and acquisition parameters are summarized in Table 1.

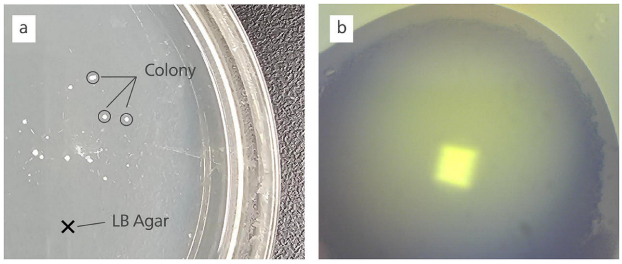


Figure 1. Bacterial colonies formed on the LB agar (a), with a magnified view of a colony under the BAC151C + 50x objective (b).

Table 1. Instrument setup used in this study Instrument setup and experimental parameters used in this study. * Acquisition parameters vary depending on the colony characteristics.

Instrument	Probe holder (BAC150B)	Video microscope (BAC151C)
i-Raman Prime 785	BAC102-785HT	50x objective
i-Raman EX	BAC102-1064HT	50x objective
BWSpec Software		
Acquisition Parameters*		
Laser power (%)	30–100	
Integration time	3–60 s	
Averages	3–5	

RAMAN SPRECTRA OF BACTERIAL COLONY

Raman spectra of the bacterial colony (Figure 2) contained peaks representing various amino acids (1001, 1156, and 1654 cm^{-1}) and DNA (723, 669, and 1337 cm^{-1}). These features, commonly observed in bacteria, confirm the success of i-Raman Prime 785 in microbial analysis [1].

Raman excitation at 785 nm provided stronger and sharper peaks than excitation at 1064 nm. This is attributed to the higher scattering power of the 785 nm laser and better resolution of the silicon CCD detector compared to the InGaAs array detector with a lower pixel density. However, 1064 nm excitation may mitigate fluorescence associated with darkly colored substrates, such as chocolate agar or blood agar.

DIFFERENTIATING BACTERIA

Bacteria with two distinct morphologies (white and yellow) formed on the LB agar, suggesting that they are different organisms (Figure 3). The Raman spectra of these two bacteria were markedly different, with the yellow bacteria displaying peaks associated with colored pigments commonly found in plants and microorganisms [1].

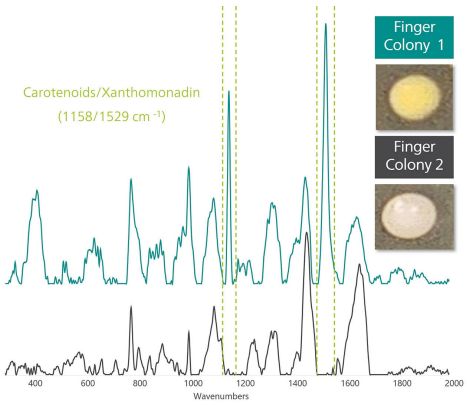


Figure 3. Raman spectra of yellow (teal line) and white (grey line) bacterial colonies formed on the LB agar. Spectra are baseline corrected. Raman peaks shown within the dotted lines may be associated with the yellow color of that particular colony.

Principal Component Analysis (PCA) may be suitable for differentiating bacteria with distinct phenotypic features in small bacterial communities, as in this experiment (Figure 4). However, researchers typically develop machine-learning algorithms to detect subtle differences in minor peaks for more detailed characterization.

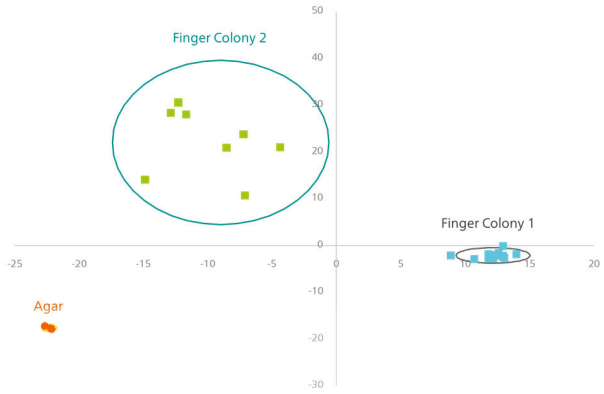


Figure 4. PCA plot of Raman spectra collected from white and yellow colonies formed on LB agar. Confidence ellipse 0.95.

FIELD TEST NOTE

- Using glass petri dishes avoids spectral contributions from plastic.
- Raman spectra of colonies may change after low-temperature storage and extended culturing.
- A video microscope is used with 1064 nm laser excitation to visualize the laser spot

CONCLUSION

Raman spectroscopy can be used to acquire spectra of bacterial colonies directly from solid culture media. Raman spectra collected with 785 nm excitation provides higher resolution, while excitation at 1064 nm reduces fluorescence from culture media.
Simple bacterial colonies can be differentiated using PCA models, but advanced machine-learning algorithms can be used to characterize more complex microbial communities.
Users can easily export the spectral files from i-Raman instruments for further analysis using BWSpec software or other more advanced machine learning tools.

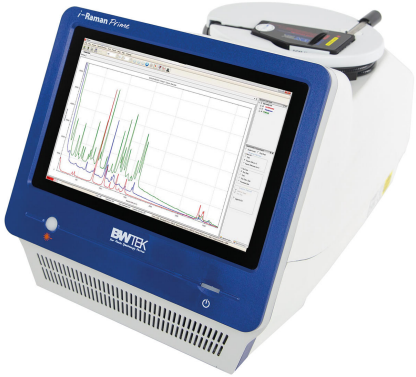
REFERENCE

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 Suisse SA
Industriestrasse 13
4800 Zofingen
info@metrohm.ch

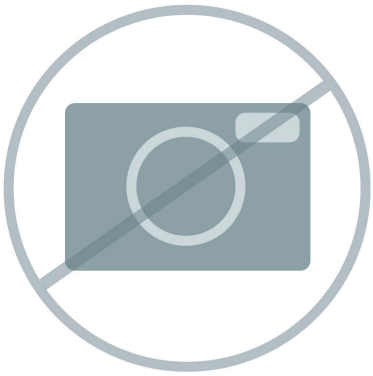
CONFIGURATION



Spectromètre Raman portable i-Raman Prime 785S

L'i-Raman® Prime 785S est un système Raman à faible bruit entièrement intégré à haut débit, avec une tablette PC intégrée et une sonde à fibre optique. Faisant appel à un détecteur à barrette CCD à haute efficacité quantique, refroidi par cryogénie thermoélectrique (-25 °C) et une gamme dynamique élevée, ce spectromètre Raman portable offre la possibilité de réaliser des analyses Raman de qualité recherche, incluant quantification et identification en temps réel. Le haut débit délivre des spectres Raman avec un excellent rapport signal/bruit, ce qui permet de mesurer des processus rapides, de même que les signaux Raman les plus faibles afin de détecter les différences les plus fines entre les échantillons.

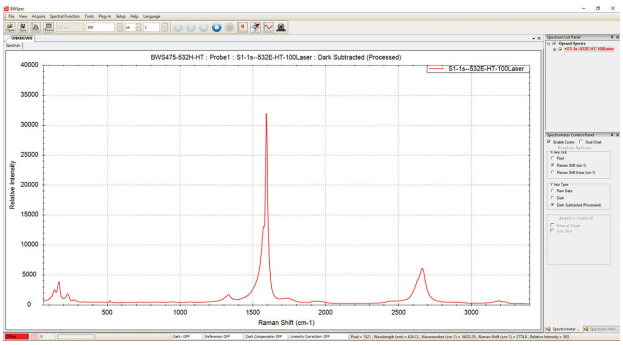
Outre le concept d'appareil portable, l'i-Raman Prime 785S propose aussi la combinaison unique d'une vaste gamme spectrale et d'une haute résolution, qui permet des mesures de 150 cm^{-1} à 3 350 cm^{-}-1. L'i-Raman Prime peut fonctionner sur batterie, ce qui facilite son transport. Ainsi, quel que soit le lieu, il est possible de réaliser des analyses Raman de qualité recherche, à la fois de haute précision et de haut niveau qualitatif et quantitatif. Le système est optimisé pour une application de notre technologie STRaman® pour des analyses au travers d'emballages non transparents.



Objectif de vidéomicroscope, grossissement x 50

Objectif de microscope, corrigé à l'infini, grossissement x 50, distance de travail (mm) = 9.15, distance focale (mm) = 4 ouverture numérique (ON) = 0.55.

RML150A



Logiciel BWSpec

BWSpec® est le logiciel général de spectroscopie de B&W Tek pour la commande d'appareil et l'acquisition des données, y compris l'analyse des pics en temps réel et les tendances. BWSpec est le logiciel de fonctionnement compris dans l'achat de tous les systèmes Raman portables B&W Tek et produits de spectromètre. Il est concu avec des fonctions pour une vaste gamme d'applications et permet d'effectuer des mesures et des calculs complexes d'un simple clic. Il prend en charge de multiples formats de données et offre l'option d'optimisation des paramètres de mesure tels que le temps d'intégration et le contrôle de puissance de sortie du laser. En plus de l'acquisition et du traitement des données, il offre également la suppression automatique de l'obscurité, le lissage spectral, la correction de la ligne de base, ainsi que le contrôle des pics et des tendances.

Spectromètre Raman portable i-Raman EX

i-Raman® EX fait partie de notre série primée de spectromètres Raman portables i-Raman dotés de notre système breveté CleanLaze® avec une excitation laser de 1 064 nm. Utilisant un détecteur à matrice InGaAs haute sensibilité avec réfrigération TE, une plage dynamique élevée et une conception de spectrographe à haut débit, ce spectromètre Raman portable offre un rapport signal/bruit de fond élevé sans induire d'autofluorescence, ce qui permet de mesurer une large gamme de produits naturels, d'échantillons biologiques (tels que les cultures cellulaires) et d'échantillons colorés.

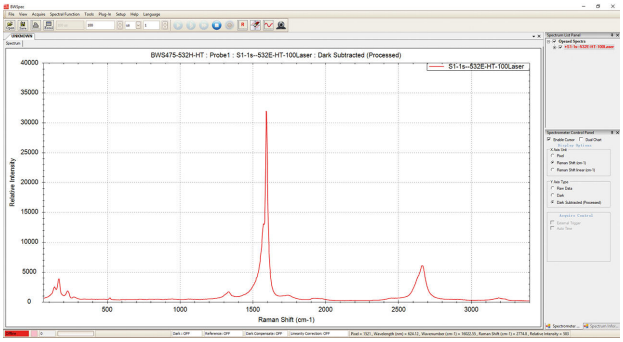
i-Raman EX offre une gamme de couverture spectrale allant de 100 cm^{-1} à 2 500 cm^{-1}, permettant de mesurer sur toute la région des empreintes digitales. Le faible encombrement du système, sa conception légère et sa faible puissance absorbée garantissent des capacités d'analyse Raman de qualité recherche en tout lieu. Pour des capacités d'analyse étendues, il peut être utilisé avec notre logiciel exclusif Vision ainsi qu'avec le logiciel d'analyse multivariée BWIQ® et le logiciel d'identification BWID®. Avec i-Raman EX, une solution Raman de haute précision est toujours disponible pour des analyses qualitatives et quantitatives sans fluorescence.

BWS485III

Objectif de vidéomicroscope, grossissement x 50

Objectif de microscope, corrigé à l'infini, grossissement x 50, distance de travail (mm) = 9.15, distance focale (mm) = 4 ouverture numérique (ON) = 0.55.

RML150A



Logiciel BWSpec

BWSpec® est le logiciel général de spectroscopie de B&W Tek pour la commande d'appareil et l'acquisition des données, y compris l'analyse des pics en temps réel et les tendances. BWSpec est le logiciel de fonctionnement compris dans l'achat de tous les systèmes Raman portables B&W Tek et produits de spectromètre. Il est concu avec des fonctions pour une vaste gamme d'applications et permet d'effectuer des mesures et des calculs complexes d'un simple clic. Il prend en charge de multiples formats de données et offre l'option d'optimisation des paramètres de mesure tels que le temps d'intégration et le contrôle de puissance de sortie du laser. En plus de l'acquisition et du traitement des données, il offre également la suppression automatique de l'obscurité, le lissage spectral, la correction de la ligne de base, ainsi que le contrôle des pics et des tendances.