



Application Note AN-RS-047

Identificazione fenotipica rapida dei microrganismi con Raman

Un metodo semplice e non distruttivo per l'analisi batterica

I microrganismi sono tra le forme di vita più diversificate sulla Terra. Presentano caratteristiche uniche e svolgono ruoli cruciali nei cicli ecologici dei nutrienti e dei materiali. I microrganismi sono essenziali per la produzione alimentare, inclusi yogurt e bevande alcoliche, e per la bonifica dei contaminanti ambientali. Inoltre, la modificazione genetica dei microrganismi facilita la produzione di prodotti preziosi come l'insulina. Data la loro importanza, molti paesi gestiscono depositi specializzati come l'American Type Culture Collection (ATCC) e la Swiss Collection of Microorganisms (SCM) per preservare e accumulare

microrganismi.

Tradizionalmente, l'identificazione di microrganismi come i batteri implicava il sequenziamento del loro patrimonio genetico. Questo processo costoso richiede formazione e attrezzature specializzate. Tuttavia, la spettroscopia Raman è un potenziale strumento per l'identificazione dei batteri e la rilevazione dei metaboliti prodotti dalla coltura, fornendo informazioni sui bioprocessi e sulla funzione in un ecosistema. Il portfolio Raman da laboratorio di Metrohm include opzioni per l'interrogazione Raman a 785 nm e 1064 nm di colture batteriche.

INTRODUZIONE

La spettroscopia Raman è utilizzata in microbiologia per la sua potenzialità nell'identificazione dei batteri e nel monitoraggio dei metaboliti. Tutti gli organismi viventi sulla Terra sono composti da carbonio, idrogeno, ossigeno, azoto, fosforo, zolfo e altri oligoelementi. Questi elementi si legano tra loro per formare DNA, lipidi, amminoacidi e altre

biomolecole. La composizione di queste biomolecole varia da organismo a organismo. Alcuni batteri immagazzinano metaboliti (ad esempio, polifosfati e glicogeno) a seconda delle condizioni ambientali. Gli spettri Raman dei batteri riflettono queste differenze chimiche, consentendone l'identificazione e chiarendone il ruolo nei bioprocessi.

ANALISI

Il terreno di coltura agarizzato in Lysogeny broth (LB) è stato preparato sciogliendo la polvere di LB e la polvere di agar in acqua deionizzata, seguendo le specifiche del produttore (Sigma-Aldrich). Dopo l'autoclavaggio, la miscela è stata versata in piastre

Petri in vetro sterilizzate e raffreddata. Una volta solidificato l'agar LB, si sono premute le dita sulla superficie per trasferire i batteri al terreno. La piastra Petri è stata quindi incubata a temperatura ambiente fino all'osservazione di colonie batteriche.

La piastra di Petri è stata posizionata su un porta-sonda BAC150B e su un videomicroscopio BAC151C, e sono stati raccolti spettri Raman dalle colonie e dal terreno di coltura (**Figura 1**). La configurazione dello strumento e i parametri di acquisizione sono riassunti nella **Tabella 1**.

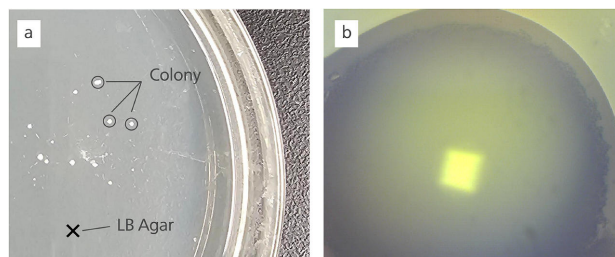


Figure 1. Colonie batteriche formate sull'agar LB (a), con una vista ingrandita di una colonia sotto l'obiettivo BAC151C + 50x (b).

Tabella 1. Configurazione dello strumento e parametri sperimentali utilizzati in questo studio. * I parametri di acquisizione variano a seconda delle caratteristiche della colonia.

Strumento	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	

SPETTRI RAMAN DELLA COLONIA BATTERICA

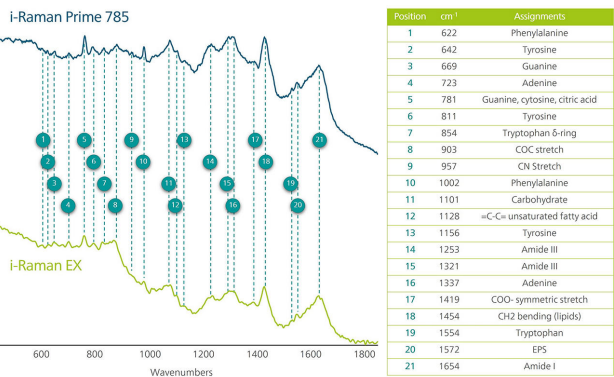


Figure 2. Spettri Raman di una colonia batterica formata su agar LB misurati utilizzando i-Raman Prime 785 (linea verde acqua) e i-Raman EX (linea verde). I picchi Raman che corrispondono alle caratteristiche riportate sono contrassegnati con linee tratteggiate e assegnati nella tabella a destra [1].

Gli spettri Raman della colonia batterica (**Figura 2**) contenevano picchi rappresentativi di vari amminoacidi (1001, 1156 e 1654 cm⁻¹) e DNA (723, 669 e 1337 cm⁻¹). Queste caratteristiche, comunemente osservate nei batteri, confermano il successo di i-Raman Prime 785 nell'analisi microbica [1].

L'eccitazione Raman a 785 nm ha prodotto picchi più intensi e nitidi rispetto all'eccitazione a 1064 nm. Ciò è dovuto alla maggiore potenza di diffusione del laser a 785 nm e alla migliore risoluzione del rivelatore CCD al silicio rispetto al rivelatore a matrice InGaAs con una densità di pixel inferiore. Tuttavia, l'eccitazione a 1064 nm può attenuare la fluorescenza associata a substrati di colore scuro, come l'agar cioccolato o l'agar sangue.

DIFFERENZIARE I BATTERI

Sull'agar LB si sono formati batteri con due morfologie distinte (bianca e gialla), suggerendo che si tratti di organismi diversi (**Figura 3**). Gli spettri Raman di questi due batteri erano notevolmente diversi, con i batteri gialli che mostravano picchi associati a pigmenti colorati comunemente presenti in piante e microrganismi. [1].

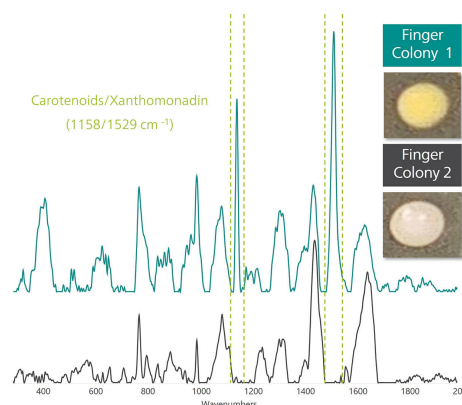


Figure 3. Spettri Raman di colonie batteriche gialle (linea verde acqua) e bianche (linea grigia) formate sull'agar LB. Gli spettri sono corretti rispetto alla linea di base. I picchi Raman mostrati all'interno delle linee tratteggiate possono essere associati al colore giallo di quella particolare colonia.

L'analisi delle componenti principali (PCA) può essere adatta per differenziare batteri con caratteristiche fenotipiche distinte in piccole comunità batteriche, come in questo esperimento (**Figura 4**). Tuttavia, i ricercatori in genere sviluppano algoritmi di apprendimento automatico per rilevare sottili differenze nei picchi minori, al fine di ottenere una caratterizzazione più dettagliata.

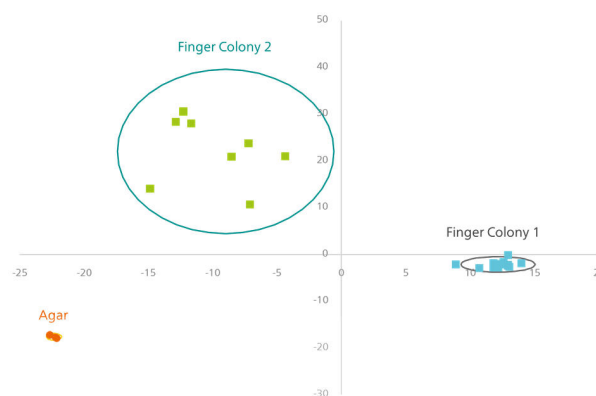


Figure 4. Grafico PCA degli spettri Raman raccolti da colonie bianche e gialle formate su agar LB. Confidence ellipse 0.95.

NOTE SULLA PROVA SUL CAMPO

- Utilizzando piastre di Petri in vetro si evitano i contributi spettrali della plastica.
- Gli spettri Raman delle colonie possono cambiare dopo la conservazione a bassa temperatura e la coltura prolungata.
- Viene utilizzato un microscopio video con eccitazione laser a 1064 nm per visualizzare il punto laser

CONCLUSIONE

La spettroscopia Raman può essere utilizzata per acquisire spettri di colonie batteriche direttamente da terreni di coltura solidi. Gli spettri Raman acquisiti con eccitazione a 785 nm offrono una risoluzione più elevata, mentre l'eccitazione a 1064 nm riduce la fluorescenza dai terreni di coltura.

Le colonie batteriche semplici possono essere differenziate utilizzando modelli PCA, ma per

caratterizzare comunità microbiche più complesse si possono utilizzare algoritmi avanzati di apprendimento automatico.

Gli utenti possono esportare facilmente i file spettrali dagli strumenti i-Raman per ulteriori analisi utilizzando il software BWSpec o altri strumenti di apprendimento automatico più avanzati.

RIFERIMENTI

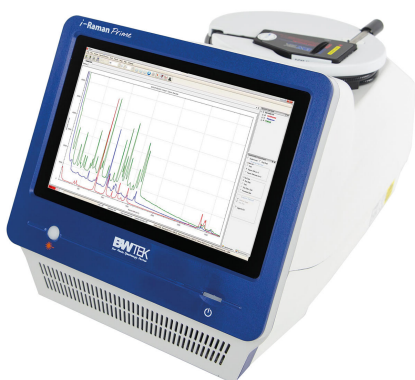
1. Paret, M. L.; Sharma, S. K.; Green, L. M.; et al. Biochemical Characterization of Gram-Positive and Gram-Negative Plant-Associated Bacteria with Micro-Raman Spectroscopy. *Appl Spectrosc* **2010**, 64 (4), 433–441.
[DOI:10.1366/000370210791114293](https://doi.org/10.1366/000370210791114293)

CONTACT

Metrohm Italiana Srl
Via G. Di Vittorio, 5
21040 Origgio (VA)

info@metrohm.it

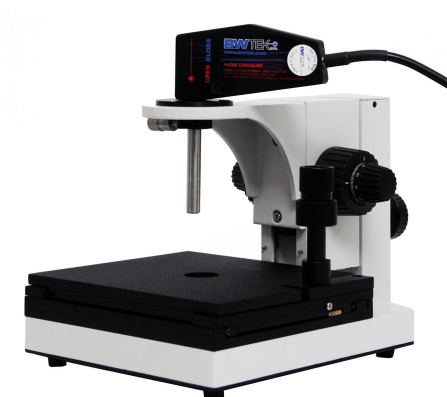
CONFIGURAZIONE



Spettrometro Raman portatile i-Raman Prime 785S

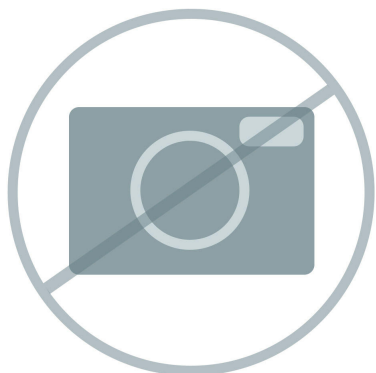
i-Raman[®] Prime 785S è un sistema Raman integrato e completo, a ridotto rumore, con portata elevata, Tablet-PC incorporato e una sonda per campione con conduttore ottico. Questo spettrometro Raman portatile utilizza un sensore con array CCD ad elevata efficienza quantica, il raffreddamento termoelettrico (-25 °C) e un intervallo dinamico elevato, così da consentire di eseguire analisi Raman a livello di ricerca, incluse quantificazione e identificazione in tempo reale. La portata elevata garantisce spettri Raman con rapporto segnale-rumore eccezionale e consente di misurare processi rapidi e perfino i segnali Raman più deboli, così da riuscire a rilevare anche le minime differenze tra i campioni.

Oltre alla struttura pensata per analisi mobili, i-Raman Prime 785S è caratterizzato da una combinazione unica di intervallo spettrale ampio e risoluzione elevata, così da consentire misure da 150 cm⁻¹ fino a 3.350 cm⁻¹. i-Raman Prime è utilizzabile con batteria ricaricabile ed è facile da trasportare. Dunque è possibile eseguire analisi Raman di alta precisione e di grande valore, sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo, a livello di ricerca, a prescindere dal luogo in cui ci si trova. Il sistema è stato ottimizzato per l'impiego con la nostra tecnologia STRaman[®], per l'analisi attraverso imballaggi non trasparenti.



Supporto per sonda Raman

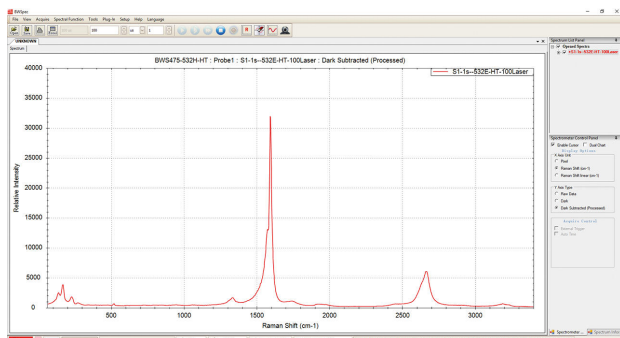
Supporto per sonda per l'impiego con le sonde Raman di B&W Tek di qualità di laboratorio. Consente la regolazione XYZ fine e grossolana manuale.



Obiettivo per videomicroscopio, ingrandimento di 50 volte

Obiettivo per microscopio, con correzione all'infinito, ingrandimento di 50 volte, distanza di lavoro (mm) = 9.15, lunghezza focale (mm) = 4, apertura numerica (NA) = 0.55.

RML150A



Software BWSpec

BWSpec® è un software di spettroscopia generale di B&W Tek per il controllo dello strumento e l'acquisizione dati, inclusi l'analisi dei trend e dei picchi in tempo reale. BWSpec è il software incluso con l'acquisto di tutti gli spettrometri e i sistemi Raman portatili di B&W Tek. Prevede caratteristiche che lo rendono adatto a un'ampia gamma di applicazioni e permette di eseguire misure e calcoli complessi premendo semplicemente un pulsante. Supporta più formati di dati e consente di ottimizzare i parametri di misura, come ad esempio il tempo di integrazione e il controllo della potenza dell'uscita laser. Oltre all'acquisizione e all'elaborazione dei dati, offre anche la rimozione automatica dell'oscurità, l'attenuazione dello spettro, la correzione della linea di base, nonché il monitoraggio dei picchi e l'analisi dei trend.

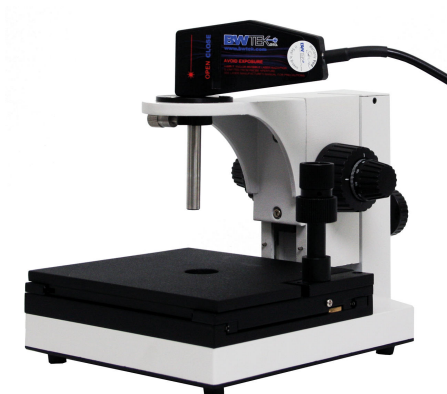


Spettrometro Raman portatile i-Raman EX

i-Raman® EX fa parte della nostra serie, insignita di premi, di spettrometri Raman portatili i-Raman dotata del laser CleanLaze® da noi brevettato per eccitazione laser a 1.064 nm. Con un rilevatore con array InGaAs ad alta sensibilità dotato di raffreddamento termoelettrico profondo, un intervallo dinamico elevato e uno spettrografo a portata elevata, questo spettrometro Raman portatile produce un elevato rapporto segnale/rumore senza il rilascio di autofluorescenza, rendendo quindi possibile la misura di un'ampia gamma di prodotti naturali, campioni biologici (ad esempio colture cellulari) e campioni colorati.

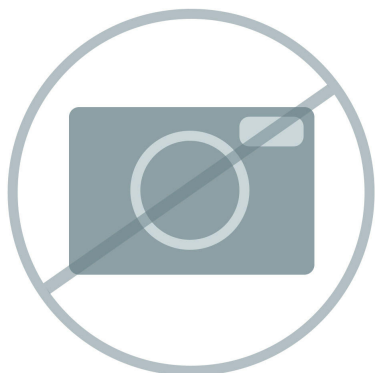
i-Raman EX garantisce un intervallo di copertura spettrale da 100 cm^{-1} a 2.500 cm^{-1} , permettendo quindi la misura nell'intera regione dell'impronta. Le dimensioni ridotte del sistema, il design leggero e il consumo ridotto di alimentazione permettono di eseguire analisi Raman, a livello di ricerca, in qualsiasi luogo. Per ampliare le capacità di analisi, è utilizzabile con il nostro software brevettato Vision e con il software per analisi multivariata BWIQ®, nonché con il software di identificazione BWID®. Con lo strumento i-Raman EX, avrete sempre una soluzione Raman ad alta precisione per l'analisi quantitativa e qualitativa senza fluorescenza.

BWS485III



Supporto per sonda Raman

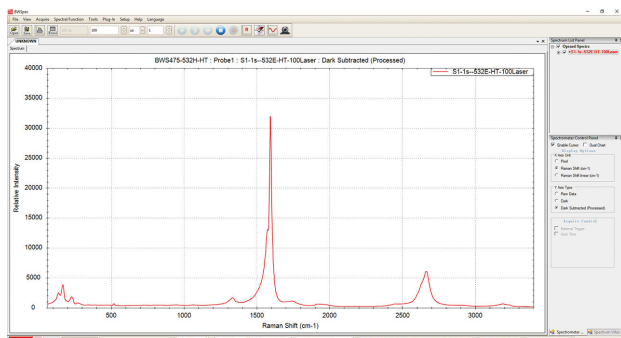
Supporto per sonda per l'impiego con le sonde Raman di B&W Tek di qualità di laboratorio. Consente la regolazione XYZ fine e grossolana manuale.



Obiettivo per videomicroscopio, ingrandimento di 50 volte

Obiettivo per microscopio, con correzione all'infinito, ingrandimento di 50 volte, distanza di lavoro (mm) = 9.15, lunghezza focale (mm) = 4, apertura numerica (NA) = 0.55.

RML150A



Software BWSpec

BWSpec® è un software di spettroscopia generale di B&W Tek per il controllo dello strumento e l'acquisizione dati, inclusi l'analisi dei trend e dei picchi in tempo reale. BWSpec è il software incluso con l'acquisto di tutti gli spettrometri e i sistemi Raman portatili di B&W Tek. Prevede caratteristiche che lo rendono adatto a un'ampia gamma di applicazioni e permette di eseguire misure e calcoli complessi premendo semplicemente un pulsante. Supporta più formati di dati e consente di ottimizzare i parametri di misura, come ad esempio il tempo di integrazione e il controllo della potenza dell'uscita laser. Oltre all'acquisizione e all'elaborazione dei dati, offre anche la rimozione automatica dell'oscurità, l'attenuazione dello spettro, la correzione della linea di base, nonché il monitoraggio dei picchi e l'analisi dei trend.