



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

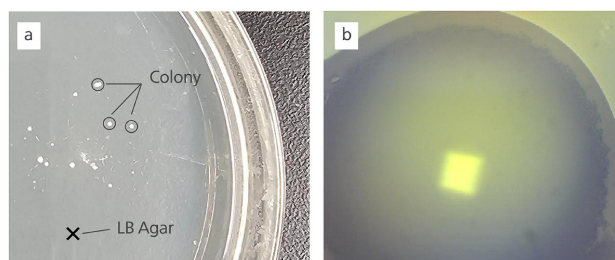
biomolecules varies between organisms. Some bacteria store metabolites (e.g., polyphosphate and glycogen) depending on environmental conditions. The Raman spectra of bacteria reflect these chemical differences, enabling their identification and elucidating their roles in bioprocesses.

## 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**.

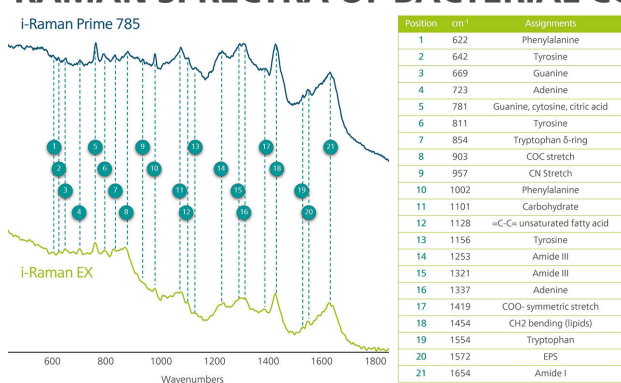


**Figure 1.** Bacterial colonies formed on the LB agar (a), with a magnified view of a colony under the BAC151C + 50x objective (b).

**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



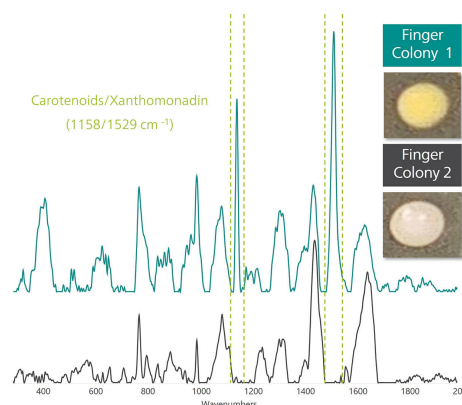
**Figure 2.** Raman spectra of a bacterial colony formed on the LB agar measured using the i-Raman Prime 785 (teal line) and i-Raman EX (green line). Raman peaks that correspond to reported features are marked with dotted lines and assigned in the table on the right [1].

Raman spectra of the bacterial colony (Figure 2) contained peaks representing various amino acids (1001, 1156, and 1654 cm<sup>-1</sup>) and DNA (723, 669, and 1337 cm<sup>-1</sup>). 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.

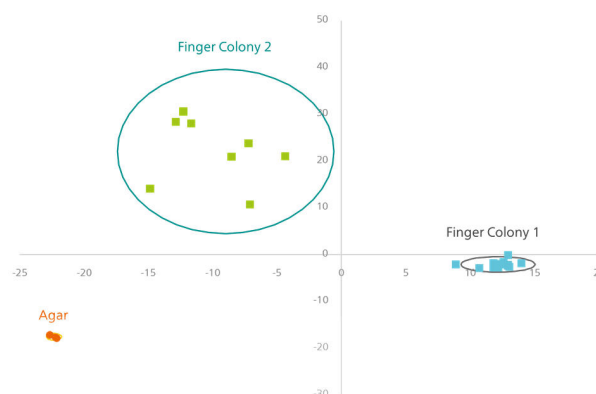
## DIFFERENTIATING BACTERIA

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

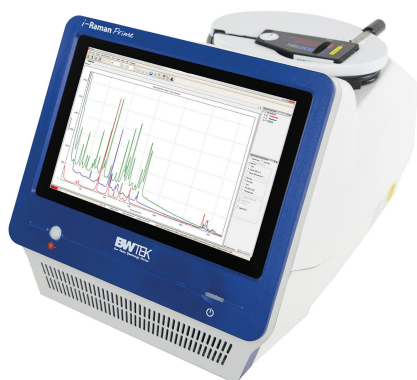
1. Paret, M. L.; Sharma, S. K.; Green, L. M.; et al. Biochemical Characterization of Gram-Positive and Gram-Negative Plant-Associated Bacteria with Micro-Raman Spectroscopy. *Appl Spectrosc* **2010**, *64* (4), 433–441.  
[DOI:10.1366/000370210791114293](https://doi.org/10.1366/000370210791114293)

## CONTACT

メトロームジャパン株式会社  
143-0006 東京都大田区平  
和島6-1-1  
null 東京流通センター アネ  
ックス9階

[metrohm.jp@metrohm.jp](mailto:metrohm.jp@metrohm.jp)

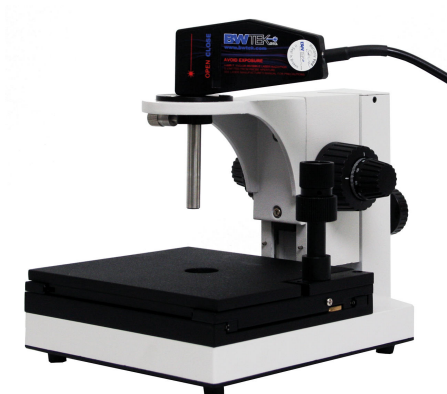
## CONFIGURATION



### i-Raman Prime 785S

i-Raman® Prime 785S は、タブレット PC および光ファイバーサンプリングフローフ内蔵の、低ノイズかつ高スループットの完全一体型のラマンシステムです。このポータブル型ラマン分光計は、高い量子効率、TE 冷却 ( $-25^{\circ}\text{C}$ )、ならびに高いダイナミックレンジを備えた CCD アレイ検出器を使用し、リアルタイムでの定量化と同定を含む研究レベルでのラマン分析を提供します。高スループットにより、傑出した信号対雑音比のラマンスペクトルを得ることのできるため、速いプロセスの測定、および最も弱いラマン信号でさえも検出可能となり、サンプルの微細な相違も検出できます。

i-Raman Prime 785S には、そのポータブル式の構造に加え、幅広いスペクトル領域と高い分解能というユニークな組み合わせが装備されているため、 $150\text{ cm}^{-1}$  から  $3350\text{ cm}^{-1}$  までの測定が可能です。i-Raman Prime はバッテリーでの稼働が可能なので、容易に持ち運ぶことができます。そのため、場所を選ばず、高精度かつ質的、量的に価値の高いラマン分析を研究レベルで実施することできます。システムは、不透明なパッケージ越しの分析用の、弊社 STRaman® テクノロジーの使用向けに最適化されました。



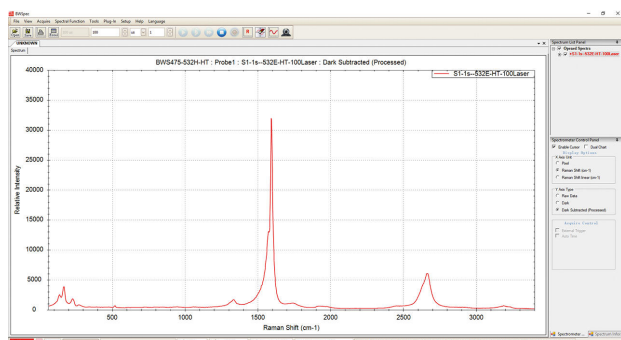
ラホ品質の B&W Tek 社製ラマンフローフを用いた使用のためのフローホルダー。手動の XYZ 粗調整および微調整を提供します。



50

マイクروسコープ対物レンズ、無限補正、50倍拡大、作業距離 (mm) = 9.15、焦点距離 (mm) = 4、開口数 (NA) = 0.55。

RML150A



## BWSpec

BWSpec<sup>®</sup> は、リアルタイムによるピークとトレントの分析を含む装置のコントロール、データ取得に適したB&W Tekの分光法ソフトウェアです。BWSpec は、あらゆるB&W Tek ホータフルラマンシステムおよびスペクトロメーター製品のご購入時に含まれる操作ソフトウェアです。広範囲なアプリケーションのための機能を含み、ボタン1つで複雑な測定および計算を行ないます。複数のデータ形式に対応し、積分時間やレーザー出力コントロール等、測定パラメータを最適化するためのオプションが含まれています。データ取得およびデータ処理に加え、自動バックグラウンド除去、スペクトルスムーシング、ベースライン補正、ピークモニタリングおよびトレント分析といった各種機能を提供しています。



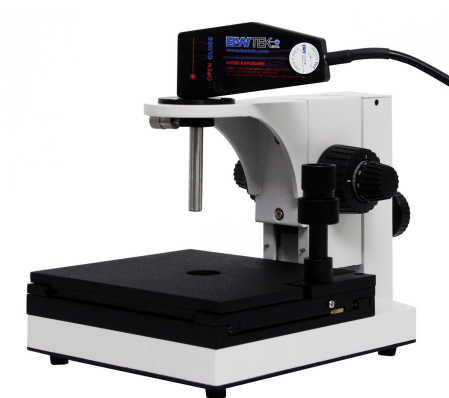


### i-Raman EX

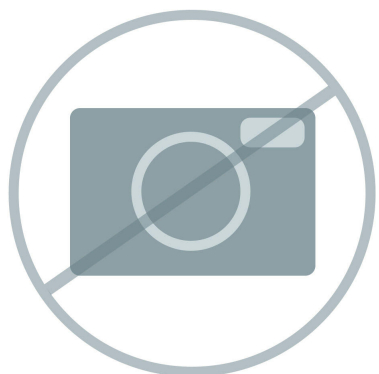
i-Raman® EX は、数々の受賞歴を誇る i-Raman 携帯型スペクトロメーターシリーズの一つであり、特許取得済みの 1.064 nm 励起の CleanLaze® レーザーを搭載したスペクトロメーターです。高感度 InGaAs アレイ検出器と TE 深冷、高ダイナミックレンジ、高スルーフット分光器設計により、自家蛍光を発生させずに高い S/N 比を実現し、天然物、生体サンプル(細胞培養など)、着色サンプルなどを幅広く測定できる携帯型ラマン分光器です。

i-Raman EX は、 $100\text{ cm}^{-1}$  から  $2.500\text{ cm}^{-1}$  までの範囲のスペクトルをカバーしており、指紋の全領域を測定することが可能です。システムの設置面積が小さく、軽量設計、低消費電力で場所を選ばず、研究レベルのラマン分析が可能です。また、解析機能を拡張するために、当社独自の Vision ソフトウェアや多変量解析ソフトウェア BWIQ®、識別ソフトウェア BWID® と組み合わせて使用することかできます。i-Raman EX により、蛍光を伴わない品質分析および定量分析のための高精度のラマンソリューションを常に使用することかできます。

BWS485III



ラホ品質の B&W Tek 社製ラマンプローブを用いた使用のためのプローブホルダー。手動の XYZ 粗調整および微調整を提供します。

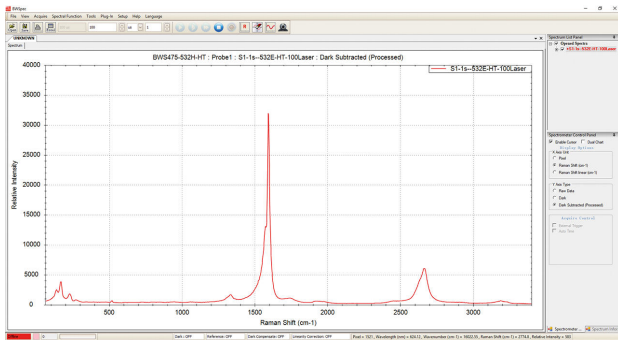


### 50

マイクロスコープ対物レンズ、無限補正、50倍拡大、作業距離 (mm) = 9.15、焦点距離 (mm) = 4、開口数 (NA) = 0.55。

RML150A





## BWSpec

BWSpec<sup>®</sup> は、リアルタイムによるピークとトレントの分析を含む装置のコントロール、データ取得に適したB&W Tekの分光法ソフトウェアです。BWSpec は、あらゆるB&W Tek ホータフルラマンシステムおよびスペクトロメーター製品のご購入時に含まれる操作ソフトウェアです。広範囲なアプリケーションのための機能を含み、ボタン1つで複雑な測定および計算を行ないます。複数のデータ型に対応し、積分時間やレーザー出力コントロール等、測定パラメータを最適化するためのオプションが含まれています。データ取得およびデータ処理に加え、自動バックグラウンド除去、スペクトルスムージング、ベースライン補正、ピークモニタリングおよびトレント分析といった各種機能を提供しています。