



Application Note AN-RS-047

Nhận diện nhanh đặc điểm hình thái của vi sinh vật bằng phổ Raman

Phương pháp đơn giản và không phá hủy để phân tích vi khuẩn

Vi sinh vật là một trong những dạng sống đa dạng nhất trên Trái Đất. Chúng thể hiện những đặc điểm độc đáo và đóng vai trò quan trọng trong chu trình tuần hoàn dinh dưỡng và vật chất trong hệ sinh thái. Vi sinh vật rất cần thiết trong sản xuất thực phẩm, bao gồm sữa chua và đồ uống có cồn, cũng như trong việc xử lý các chất ô nhiễm môi trường. Ngoài ra, việc biến đổi gen vi sinh vật còn giúp sản xuất các sản phẩm có giá trị như insulin. Do tầm quan trọng của chúng, nhiều quốc gia duy trì các kho lưu trữ chuyên biệt như Bộ sưu tập Chủng vi sinh vật Chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection - ATCC) và Bộ sưu tập Vi sinh vật Thụy Sĩ (Swiss Collection of Microorganisms -

SCM) để bảo tồn và tích lũy các vi sinh vật này.

Trước đây, việc định danh vi sinh vật như vi khuẩn chủ yếu dựa vào giải trình tự gen, một phương pháp tốn kém và đòi hỏi thiết bị cũng như kỹ năng chuyên môn cao. Tuy nhiên, phổ Raman là một công cụ tiềm năng giúp nhận diện vi khuẩn và phát hiện các chất chuyển hóa do chúng tạo ra trong quá trình nuôi cấy – từ đó cung cấp thông tin giá trị về các quá trình sinh học và chức năng của vi sinh vật trong hệ sinh thái. Danh mục thiết bị Raman trong phòng thí nghiệm của Metrohm hiện cung cấp các tùy chọn phân tích mẫu nuôi cấy vi khuẩn bằng phổ Raman ở bước sóng 785 nm và 1064 nm.

GIỚI THIỆU

Phổ Raman được ứng dụng trong vi sinh vật học nhờ khả năng tiềm năng trong việc nhận diện vi khuẩn và theo dõi các chất chuyển hóa. Tất cả sinh vật sống trên Trái Đất đều được cấu tạo từ carbon, hydro, oxy, nitơ, phospho, lưu huỳnh và một số nguyên tố vi lượng khác. Các nguyên tố này liên kết với nhau để tạo thành DNA, lipid, axit amin và các phân tử sinh

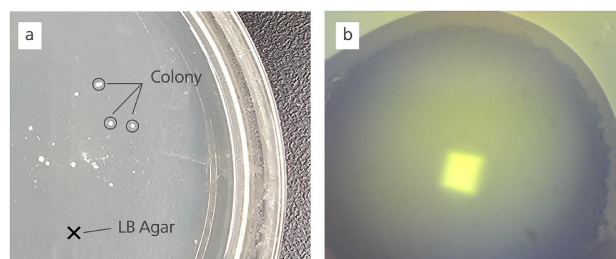
học khác. Thành phần các phân tử sinh học này khác nhau giữa các loài sinh vật. Một số vi khuẩn còn tích trữ các chất chuyển hóa như polyphosphate và glycogen tùy theo điều kiện môi trường. Phổ Raman của vi khuẩn phản ánh sự khác biệt về hóa học này, từ đó cho phép nhận diện vi khuẩn và làm rõ vai trò của chúng trong các quá trình sinh học.

THÍ NGHIỆM

Môi trường nuôi cấy dạng thạch Lysogeny Broth (LB) được chuẩn bị bằng cách hòa tan bột LB và bột thạch trong nước khử ion theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Sigma-Aldrich). Sau khi hấp tiệt trùng, hỗn hợp được rót vào các đĩa petri thủy tinh đã được khử trùng và để

nguội. Khi lớp thạch LB đã đông rắn, ngón tay được ấn nhẹ lên bề mặt thạch để chuyển vi khuẩn sang môi trường nuôi cấy. Đĩa petri sau đó được ủ ở nhiệt độ phòng cho đến khi quan sát thấy các khuẩn lạc phát triển.

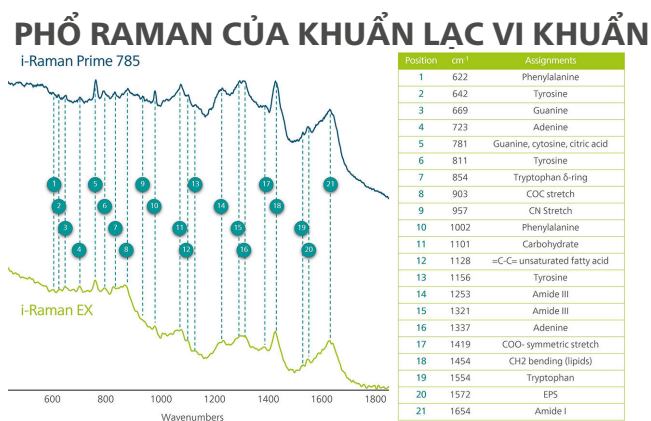
Đĩa petri được đặt trên giá đỡ đầu dò BAC150B và kính hiển vi video BAC151C, sau đó phổ Raman được thu thập từ các khuẩn lạc và môi trường nuôi cấy (Hình 1). Cài đặt thiết bị và các thông số thu nhận được tóm tắt trong **Bảng 1**.



Hình 1. Các khuẩn lạc vi khuẩn hình thành trên thạch LB (a), với hình ảnh phóng đại của một khuẩn lạc dưới kính hiển vi BAC151C kết hợp với vật kính 50x (b).

Bảng 1. Cấu hình thiết bị và các thông số thực nghiệm được sử dụng trong nghiên cứu này * Các thông số thu nhận có thể thay đổi tùy thuộc vào đặc điểm của khuẩn lạc.

Thiết bị	Giá đỡ đầu dò (BAC150B)	Kính hiển vi video (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	



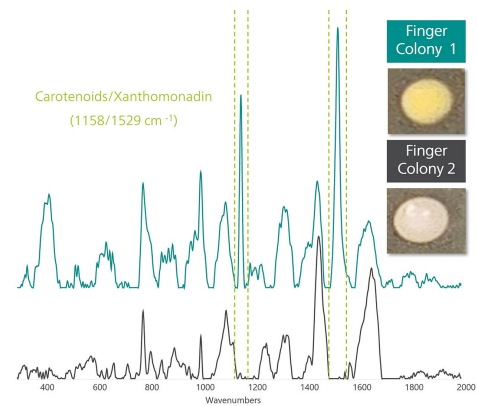
Hình 2. Phổ Raman của một khuẩn lạc vi khuẩn hình thành trên thạch LB được đo bằng thiết bị i-Raman Prime 785 (đường màu xanh lam) và i-Raman EX (đường màu xanh lá). Các peak Raman tương ứng với các đặc trưng đã được báo cáo được đánh dấu bằng đường chấm và được chú thích trong bảng bên phải [1].

Phổ Raman của khuẩn lạc vi khuẩn (Hình 2) hiển thị các peak đặc trưng cho nhiều loại axit amin (1001, 1156 và 1654 cm⁻¹) và DNA (723, 669 và 1337 cm⁻¹). Những đặc điểm này, thường thấy ở vi khuẩn, xác nhận hiệu quả của i-Raman Prime 785 trong phân tích vi sinh vật [1].

Kích thích Raman ở bước sóng 785 nm tạo ra các peak rõ nét và mạnh hơn so với bước sóng 1064 nm. Điều này là do công suất tán xạ cao hơn của laser 785 nm và độ phân giải tốt hơn của đầu dò CCD silicon so với đầu dò mảng InGaAs vốn có mật độ điểm ảnh thấp hơn. Tuy nhiên, kích thích ở 1064 nm có thể giúp giảm nhiễu huỳnh quang do các nền tối màu, như thạch máu hoặc thạch sô cô la, gây ra.

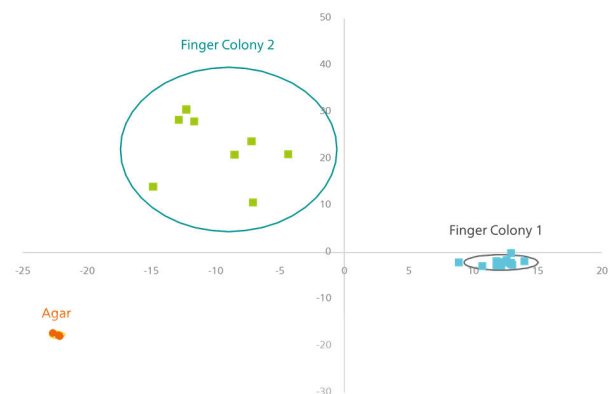
PHÂN BIỆT VI KHUẨN

Hai loại vi khuẩn với hình thái khác nhau (trắng và vàng) hình thành trên thạch LB, cho thấy chúng là các loài vi sinh vật khác nhau (**Hình 3**). Phổ Raman của hai loại vi khuẩn này có sự khác biệt rõ rệt, trong đó vi khuẩn màu vàng hiển thị các peak liên quan đến sắc tố màu – thường thấy ở thực vật và vi sinh vật [1].



Hình 3. Phổ Raman của các khuẩn lạc vi khuẩn màu vàng (đường màu xanh lam) và màu trắng (đường màu xám) hình thành trên thạch LB. Phổ đã được hiệu chỉnh đường nền. Các peak Raman nằm trong vùng gạch chấm có thể liên quan đến sắc tố màu vàng đặc trưng của khuẩn lạc đó.

Phân tích thành phần chính (PCA) có thể phù hợp để phân biệt các loại vi khuẩn có đặc điểm hình thái khác nhau trong quần thể vi khuẩn nhỏ, như trong thí nghiệm này (**Hình 4**). Tuy nhiên, trong thực tế nghiên cứu, các nhà khoa học thường phát triển các thuật toán học máy nhằm phát hiện những khác biệt tinh vi trong các peak nhỏ để phục vụ cho việc đặc tả chi tiết hơn.



Hình 4. Biểu đồ PCA của phổ Raman thu được từ các khuẩn lạc màu trắng và màu vàng hình thành trên thạch LB. Elip độ tin cậy 0,95.

GHI CHÚ KIỂM TRA THỰC ĐỊA

- 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

KẾT LUẬN

Phổ Raman có thể được sử dụng để thu phổ của các khuẩn lạc vi khuẩn trực tiếp từ môi trường nuôi cấy rắn. Phổ Raman thu được với kích thích 785 nm cho độ phân giải cao hơn, trong khi kích thích ở 1064 nm giúp giảm nhiễu huỳnh quang từ môi trường nuôi cấy. Các khuẩn lạc vi khuẩn đơn giản có thể được phân

biệt bằng mô hình PCA, trong khi các cộng đồng vi sinh vật phức tạp hơn có thể được đặc tả chi tiết hơn bằng các thuật toán học máy tiên tiến.

Người dùng có thể dễ dàng xuất các tệp phổ từ thiết bị i-Raman để phân tích thêm bằng phần mềm BWSpec hoặc các công cụ học máy nâng cao khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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)

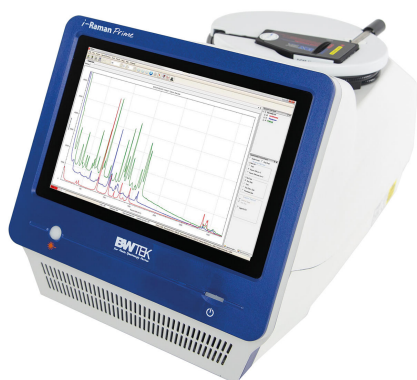
CONTACT

CÔNG TY TNHH METROHM
VIỆT NAM

Tòa nhà Park IX, số 08
Đường Phan Đình Giót,
Phường Tân Sơn Hòa
null Thành phố Hồ Chí Minh

info@metrohm.vn

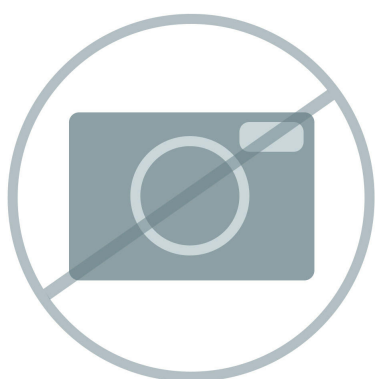
CẤU HÌNH



i-Raman Prime 785S Portable Raman Spectrometer

The i-Raman[®] Prime 785S is a low-noise, high-throughput, and fully integrated Raman system with an embedded tablet computer and a fiber-optic sampling probe. Using a high-quantum-efficiency CCD array detector with TE deep cooling (-25 °C) and high dynamic range, this portable Raman spectrometer delivers research-grade Raman analysis capabilities, including real-time quantitation and identification. The high throughput gives Raman spectra with excellent signal-to-noise ratio, making it possible to measure rapid processes and to measure even the slightest Raman signals, detecting subtle sample differences.

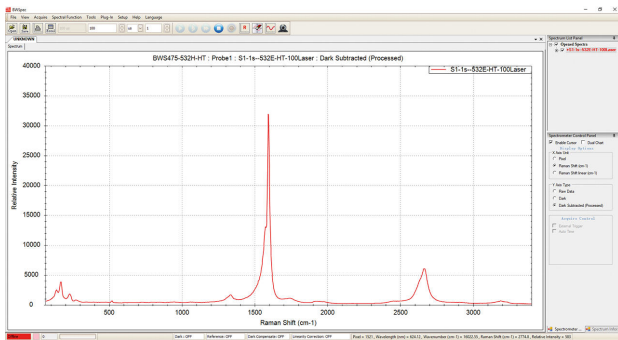
In addition to its portable construction, the i-Raman Prime 785S features the unique combination of wide spectral coverage and high resolution, thus enabling measurements from 150 cm⁻¹ to 3,350 cm⁻¹. The i-Raman Prime can be battery-operated for easy portability, providing research-grade Raman analysis capabilities for high-precision qualitative and quantitative work wherever needed. The system is optimized for use with our STRaman[®] technology for analyses through non-transparent packaging.



Video Microscope Objective, 50x (RML150A)

Microscope objective, infinity-corrected, 50x, working distance (mm) = 9.15, focal length (mm) = 4, numerical aperture (NA) = 0.55.

RML150A



BWSpec Software

BWSpec[®] is B&W Tek's general spectroscopy software for instrument control and data acquisition, including real-time peak analysis and trending. BWSpec is the operating software included with the purchase of all B&W Tek portable Raman systems and spectrometer products. It is designed with features for broad range applications, performing complex measurements and calculations at the click of a button. It supports multiple data formats and provides the option to optimize measurement parameters, such as integration time and laser output power control. In addition to data acquisition and data processing, it also offers automatic dark removal, spectral smoothing, baseline correction, as well as peak monitoring and trending.



i-Raman EX Portable Raman Spectrometer

The i-Raman[®] EX is part of our award-winning series of i-Raman portable Raman spectrometers with our patented CleanLaze[®] laser with 1,064 nm laser excitation. Using a high-sensitivity InGaAs array detector with deep TE cooling, high dynamic range, and a high throughput spectrograph design, this portable Raman spectrometer delivers a high signal-to-noise ratio without inducing autofluorescence, making it possible to measure a wide range of natural products, biological samples (such as cell cultures), and colored samples.

The i-Raman EX provides a spectral coverage range from 100 cm⁻¹ to 2,500 cm⁻¹, enabling you to measure across the entire fingerprint region. The system's small footprint, lightweight design, and low power consumption ensure research-grade Raman analysis capabilities at any location. For expanded analysis capabilities, it can be used with our proprietary Vision software as well as BWIQ[®] multivariate analysis software and BWID[®] identification software. With the i-Raman EX, you always have a high precision Raman solution for qualitative and quantitative analysis without fluorescence.

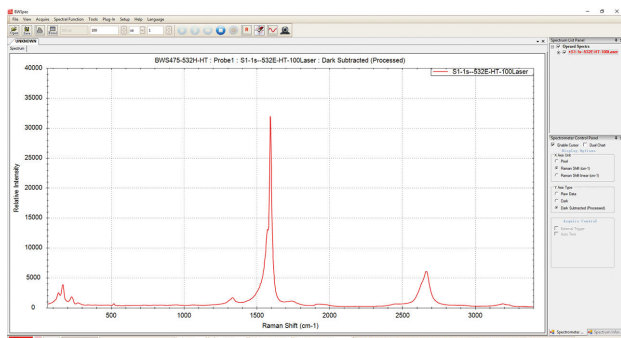
BWS485III



Video Microscope Objective, 50x (RML150A)

Microscope objective, infinity-corrected, 50x, working distance (mm) = 9.15, focal length (mm) = 4, numerical aperture (NA) = 0.55.

RML150A



BWSpec Software

BWSpec[®] is B&W Tek's general spectroscopy software for instrument control and data acquisition, including real-time peak analysis and trending. BWSpec is the operating software included with the purchase of all B&W Tek portable Raman systems and spectrometer products. It is designed with features for broad range applications, performing complex measurements and calculations at the click of a button. It supports multiple data formats and provides the option to optimize measurement parameters, such as integration time and laser output power control. In addition to data acquisition and data processing, it also offers automatic dark removal, spectral smoothing, baseline correction, as well as peak monitoring and trending.