

黑曲霉孢子灭活前后红外消光特性

顾有林^{1,2}, 王成², 杨丽², 欧宗伟², 胡以华^{1,2}, 李乐^{1,2}, 赵义正^{1,2}, 陈卫^{1,2}, 王鹏³

(1. 脉冲功率激光技术国家重点实验室(电子工程学院), 安徽合肥 230037;

2. 电子工程学院, 安徽合肥 230037;

3. 离子束生物工程学重点实验室(中国科学院), 安徽合肥 230031)

摘要: 黑曲霉孢子是生物气溶胶的重要组成部分, 质量消光系数是研究黑曲霉孢子电磁衰减特性的重要参数。采用压片法测量了灭活前后黑曲霉孢子 2.5~15 μm 波段的反射光谱, 并利用 Kramers-Kronig(K-K)关系计算了黑曲霉孢子红外波段的复折射率。基于 Mie 散射理论求出了灭活前后黑曲霉孢子红外波段的质量消光系数, 并对结果进行了分析和讨论。分析结果表明: 3~5 μm 波段, 灭活后平均质量消光系数降低了 4.6%, 8~14 μm 波段, 灭活后平均质量消光系数降低了 89.5%, 由此可知, 保持活性对于提高黑曲霉孢子的电磁衰减能力具有重要的意义。

关键词: 黑曲霉孢子; 红外; 灭活; 复折射率; 质量消光系数

中图分类号: O443.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-2276(2015)01-0036-06

Infrared extinction before and after aspergillus niger spores inactivation

Gu Youlin^{1,2}, Wang Cheng², Yang Li², Ou Zongwei², Hu Yihua^{1,2}, Li Le^{1,2}, Zhao Yizheng^{1,2},
Chen Wei^{1,2}, Wang Peng³

(1. State Key Laboratory of Pulsed Power Laser Technology(Electronic Engineering Institute), Hefei 230037, China;

2. Electronic Engineering Institute, Hefei 230037, China;

3. Key Laboratory of Ion Beam Engineering(Chinese Academy of Sciences), Hefei 230031, China)

Abstract: Aspergillus niger spores is an important part of bio-aerosols, and its mass extinction coefficient is an important parameter for study on electromagnetic attenuation characteristics of aspergillus niger spores. The reflection spectra before and after aspergillus niger spores inactivation within the 2.5-15 μm waveband were measured by squash method. The complex refractive index of aspergillus niger spores in the infrared waveband was calculated by using Kramers-Kronig (K-K) relation. Then, based on Mie scattering theory, the mass extinction coefficient before and after aspergillus niger spores inactivation in the infrared waveband were obtained, and the results were analyzed and discussed. The results show that average mass extinction coefficient has a decrease of 4.6 percent in the 3-5 μm waveband and a decrease of 89.5 percent in the 8-14 μm waveband. In light of this, to retain activity of aspergillus niger spores will play an important role in the increasing of its electromagnetic attenuation abilities.

Key words: aspergillus niger spores; infrared; inactivation; complex refractive index; mass extinction coefficient

收稿日期: 2014-05-11; 修订日期: 2014-06-17

基金项目: 国家自然科学基金(60908033); 安徽省自然科学基金(1408085MKL47)

作者简介: 顾有林(1974-), 男, 副教授, 硕士生导师, 博士, 主要从事空间信息处理方面的研究。Email: ylg0912@163.com

0 引言

生物气溶胶是指具有生命的气溶胶粒子、活性粒子以及由生命活性的机体所释放到空气中的各种粒子稳定地悬浮于气体介质中形成的分散体系^[1]。作为大气气溶胶的重要组成部分,生物气溶胶与人类的生产、生活密切相关。随着生物气溶胶研究的逐步深入^[1-10],国内外越来越多的研究人员开始研究微生物红外波段的衰减特性。

P.S Tuminello 等人基于仪器测量光通过枯草芽孢杆菌溶液后的能量衰减计算得到透过率,利用朗伯-比尔定律获得枯草芽孢杆菌 0.2~2.5 μm 波段的衰减特性^[11]。孙杜娟等人利用傅里叶变换红外光谱仪对金属化花粉红外波段电磁特性进行了测试与分析,并计算了 2.5~25 μm 波段的散射截面^[12];利用显微红外光谱仪测定了枯草芽孢杆菌等微生物 2.5~15 μm 波段的红外反射光谱,计算了微生物样品在 6~14 μm 波段的复折射率^[13]。上述微生物红外消光性能研究并未考虑灭活对微生物红外消光特性的影响。

课题组制备了黑曲霉孢子,利用湿热灭活法对其进行了灭活处理,获得了黑曲霉孢子灭活前后两种颗粒样品,利用粉末压片机将灭活前后两种孢子制成压片,通过显微红外光谱仪测定了黑曲霉孢子两种样品 2.5~15 μm 波段的反射光谱。基于反射光谱数据,利用 Kramers-Kronig(K-K)关系计算了黑曲霉孢子灭活前后 2.5~15 μm 波段的复折射率。基于 Mie 散射理论获得了 3~5 μm、8~14 μm 波段黑曲霉孢子灭活前后的质量消光系数,分析了计算结果并讨论了引起变化的可能原因。

1 基本理论

利用 Mie 散射理论^[14],可以计算半径为 r 的球体粒子对波长为 λ 的平面入射波的消光截面,具体表示为:

$$C_{\text{ext}} = \frac{2\pi}{q^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) \text{Re}(a_n + b_n) \quad (1)$$

式中: $q = \frac{2\pi}{\lambda}$ 为波数; a_n 和 b_n 为 Mie 散射系数。

$$a_n = \frac{\psi_n(q) \psi_n'(mq) - m \psi_n'(q) \psi_n(mq)}{\zeta(q) \psi_n'(mq) - m \zeta'(q) \psi_n(mq)} \quad (2)$$

$$b_n = \frac{m \psi_n(q) \psi_n'(mq) - m \psi_n'(q) \psi_n(mq)}{m \zeta(q) \psi_n'(mq) - \zeta'(q) \psi_n(mq)} \quad (3)$$

式中: $m(\lambda) = n(\lambda) + ik(\lambda)$ 为物质相对周围介质的复折射率。

$$\psi_n(z) = \sqrt{\frac{z\pi}{2}} J_{n+\frac{1}{2}}(z)$$

$$\zeta_n(z) = \sqrt{\frac{z\pi}{2}} H_{n+\frac{1}{2}}^{(2)}(z) \quad (4)$$

式中: z 取 q 或 mq ; $J_{n+\frac{1}{2}}(z)$ 和 $H_{n+\frac{1}{2}}^{(2)}(z)$ 分别为半奇阶第一类贝塞尔函数和第二类汉克尔函数。

针对球型粒子,其质量消光系数 α_e 可用公式(5)计算:

$$\alpha_e = \frac{C_{\text{ext}}}{\frac{4}{3} \pi r^3 \rho} \quad (5)$$

式中: ρ 为粒子的质量密度; r 为粒子的半径。

可利用 K-K^[15]关系计算复折射率 m 。电磁波垂直入射时,利用公式(6)可以计算材料的反射相移 $\Theta(\lambda)$:

$$\Theta(\lambda) = \frac{\lambda}{\pi} P \int_0^{\infty} \frac{\ln R(\lambda')}{(\lambda'^2 - \lambda^2)} d\lambda' \quad (6)$$

式中: $R(\lambda')$ 为垂直入射时材料全波段反射率; λ 为反射波波长; P 为柯西主值函数。

利用公式(6)计算材料在波长 λ 处的反射相移 $\Theta(\lambda)$ 时,必须测定垂直入射时全波段的反射率。考虑到电磁波的有效作用范围、测试仪器的的工作波段范围以及测试的角度,在实际测量时只能获得有限波段 $\lambda_a \sim \lambda_b$ 内近似垂直入射的材料反射率 $R(\lambda)$ 。需要通过经验公式或常数等外推手段得到其他波段的材料反射率。

设材料复折射率实部为 $n(\lambda)$,虚部为 $k(\lambda)$,两参数可利用反射率 $R(\lambda)$ 、反射相移 $\Theta(\lambda)$ 计算得到,具体如下:

$$n(\lambda) = \frac{1 - R(\lambda)}{1 + R(\lambda) + 2\sqrt{R(\lambda)} \cos \Theta(\lambda)} \quad (7)$$

$$k(\lambda) = \frac{-2\sqrt{R(\lambda)} \sin \Theta(\lambda)}{1 + R(\lambda) + 2\sqrt{R(\lambda)} \cos \Theta(\lambda)} \quad (8)$$

通过上述分析可知,通过实验手段测定红外波段黑曲霉孢子灭活前后两种不同状态下的反射率 $R(\lambda)$,利用公式(1)~(8)即可计算红外波段的样品质量消光系数,可进一步分析样品红外波段的消光性能。

2 实验与测试

2.1 样品制备

采用固体发酵方式培养制备黑曲霉孢子样品。具体培养过程如下。

斜面、平板培养基(g/L):取新鲜去皮马铃薯200 g,加水 1 000 mL,煮沸 30 min,纱布过滤,并补足失水,得 20%马铃薯浸汁。加葡萄糖 60 g,煮沸后缓慢加入琼脂 20 g,继续加热并煮沸,补足失水。自然 pH。

平皿中加入平板培养基 20 mL,取 200 μ mL 种液,均匀涂布在平板表面,培养温度 37 $^{\circ}$ C,湿度自然,时间 4 天。

固体发酵平板加入 10 mL 无菌水洗涤,洗脱下的孢子悬液放置入超声清洗仪分散。之后孢子悬液经冷冻离心机 12 000 rpm 离心 5 min,取沉淀,洗涤,继续离心取沉淀,至上清液清澈。孢子放至冰箱冷冻至完全冻结。放入冷冻干燥机中干燥,处理条件:-70 $^{\circ}$ C,处理时间 48 h。利用超声破碎仪将孢子样品分散。

样品存放在加硅胶的干燥皿中,室温下保藏。量取一定量的样品,利用碾钵稍作粉碎处理,通过 769YP-15A 粉末压片机进行样品压片。

样品灭活采用湿热灭活法,其原理是使黑曲霉孢子的蛋白质及核酸变形导致其死亡。具体湿热灭活流程为:一般采用 103.4 kPa 蒸汽压温度达 121 $^{\circ}$ C,维持 20~30 min。灭菌后在适宜温度下培养几小时,再灭菌一次,以用于杀死刚刚萌发的孢子。灭活过程包括升温、保温和冷却等 3 个阶段。湿热灭活后,样品内含有部分水分,可能导致污染其他杂菌,需对其进行烘干处理。

2.2 样品测试

利用上述方法制备黑曲霉孢子灭活前后两种不同状态的样品压片。利用美国热电公司 Nicolet Contin μ m 显微红外光谱仪测量两种样品压片在 2.5~15 μ m(667~4 000 cm^{-1})波段的反射光谱。采用镀金反射镜面作为背底,针对每个样品压片随机选取 3 个采样点测定反射光谱,计算 3 次测定的反射光谱值平均值作为最终的结果。与傅里叶光谱仪相比,显微红外光谱仪光斑尺寸为 100 μ m \times 100 μ m,光斑尺寸更小,光斑内压片更加光滑、平整,所测定的反

射光谱更接近理想的镜面反射光谱。利用日立电子的 JSM-6700 扫描电镜测量样品的 SEM 图。

3 结果与讨论

3.1 样品扫描电镜及反射谱测试结果

图 1、2 分别为灭活前后黑曲霉孢子在 10 000 倍观察条件下的 SEM 图,图 3 为黑曲霉孢子灭活前后两种不同状态下的样品在 2.5~15 μ m 波段的反射光谱测试结果。

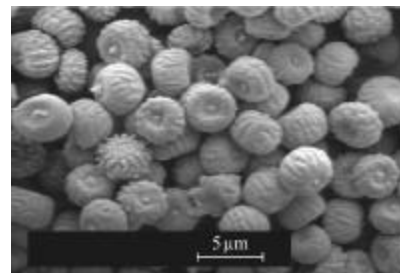


图 1 活黑曲霉孢子 SEM 图

Fig.1 SEM of live aspergillus niger spores

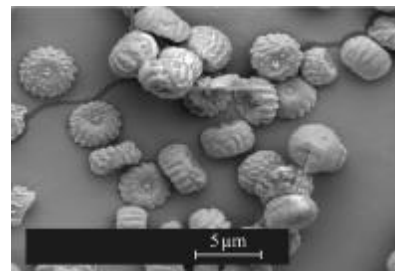


图 2 死黑曲霉孢子 SEM 图

Fig.2 SEM of dead aspergillus niger spores

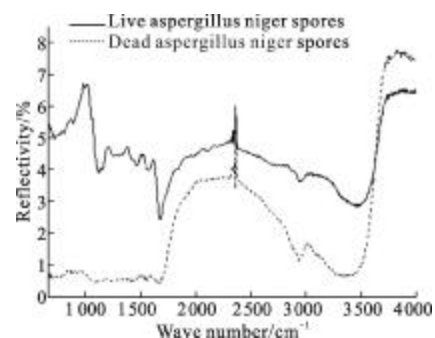


图 3 667~4 000 波数黑曲霉孢子灭活前后反射光谱

Fig.3 Reflection spectrum before and after aspergillus niger spores inactivation in wave number 667 to 4 000 cm^{-1}

通过图 1 可知,黑曲霉孢子在灭活前呈球形状态,粒径分布相对集中,平均粒径在 1~2.5 μ m。通过

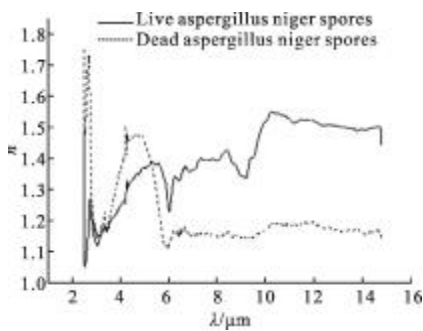
图 2 可知,灭活后黑曲霉孢子呈扁球形,单位面积内孢子数明显变少,粒径变化不大。由图 3 可知,灭活前后黑曲霉孢子在 2.5~15 μm(667~4 000 cm⁻¹)波段的反射率大小在 0.005~0.075 区间内且随着波长变化而剧烈变化。在 2.85~15 μm(667~3 500 cm⁻¹)波段内灭活前黑曲霉孢子的透过率均大于灭活后黑曲霉孢子。

3.2 样品复折射率和质量消光系数计算

由上述分析可知,只有知道灭活前后两种不同状态下黑曲霉孢子在全波段的反射率 $R(\lambda)$ 才可计算其复折射率。而对 2.5~15 μm 波段外的反射率则需要采用外推的方法得到^[16]。其中,0~2.5 μm 波段内,采用经验式外推方法,反射率与波长具有如下关系^[17]:

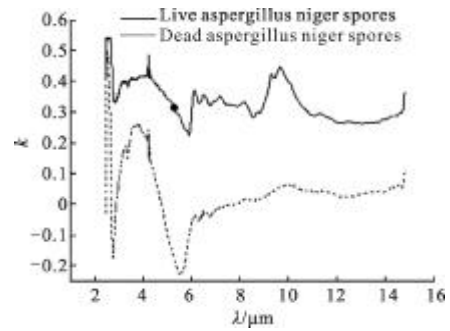
$$R_1(\lambda) = A\lambda^p \quad (9)$$

式中: p 为常数,这里取 4; A 根据反射率 $R_1(\lambda)$ 确定,对于超出仪器测试范围的高频波段反射率,基本可以利用公式(9)推出, $R_1(\lambda) = R(2.5 \mu\text{m})$,对于灭活后的黑曲霉孢子反射率为 0.074 33,可以推出 A 为 0.19,因此灭活后黑曲霉孢子反射率计算公式为 $R_1(\lambda) = 0.19\lambda^4$ 。在计算 2.5~15 μm 波段内样品的复折射率时,100 μm 以上波长处的材料反射率影响可以忽略不计,因此,取 100 μm 作为积分的上限,采用常数外推的方法确定 15~100 μm 内灭活前后黑曲霉孢子样品的 $R_2(\lambda)$, $R_2(\lambda) = R(15 \mu\text{m})$,因此可得灭活前后黑曲霉孢子样品在整个积分范围内(0~100 μm)的反射率 $R(\lambda)$ 。将整个积分范围内的反射率 $R(\lambda)$ 的代入公式(2)~(4)中。灭活前后黑曲霉孢子在红外波段内的复折射率 m 的实部 n 与虚部 k 的计算结果中图 4 所示。



(a) 复折射率实部

(a) Real part of complex refractive index



(b) 复折射率虚部

(b) Imaginary part of complex refractive index

图 4 黑曲霉孢子灭活前后红外复折射率

Fig.4 IR complex refractive index before and after aspergillus niger spores inactivation

将得到的样品复折射率代入公式(1)~(5)中,取 $r = 1.5 \mu\text{m}$, $\rho = 1.1 \text{ g/cm}^3$, 分别计算 3~5 μm、8~14 μm 波段灭活前后黑曲霉孢子样品的质量消光系数,如图 5、图 6 所示。

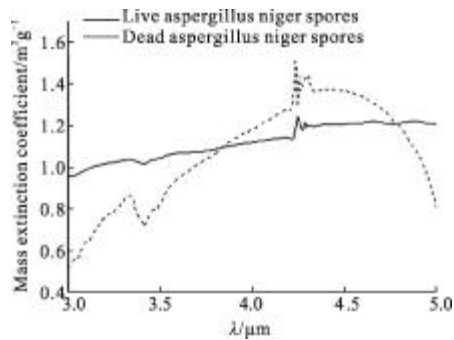


图 5 3~5 μm 波段黑曲霉孢子灭活前后质量消光系数

Fig.5 Mass extinction coefficient before and after aspergillus niger spores within wave band of 3 to 5 μm

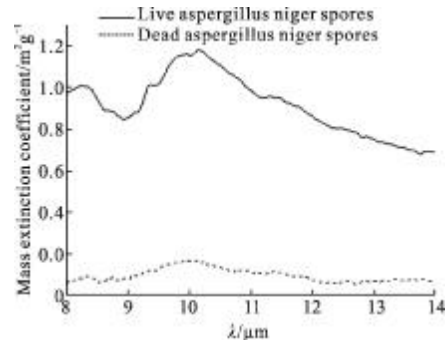


图 6 8~14 μm 波段黑曲霉孢子灭活前后质量消光系数

Fig.6 Mass extinction coefficient before and after aspergillus niger spores inactivation within wave band of 8 to 14 μm

由图 5 可以看出,3~5 μm 波段内,黑曲霉孢子在 3~3.8 μm、4.75~5 μm 波段灭活前比灭活后要高,

3.8~4.75 μm 波段灭活前比灭活后要低。8~14 μm 波段内, 灭活前的黑曲霉孢子要比灭活后的黑曲霉孢子大很多。因此可以看出, 灭活对 3~5 μm 波段黑曲霉孢子的电磁衰减影响不大, 而对 8~14 μm 波段的电磁衰减影响很大。

灭活前后黑曲霉孢子 3~5 μm 、8~14 μm 波段平均质量消光系数如表 1 所示。

表 1 3~5 μm 和 8~14 μm 波段黑曲霉孢子灭活前后平均质量消光系数

Tab.1 Average mass extinction coefficient before and after aspergillus niger spores inactivation within wave band of 3~5 μm and 8~14 μm

$\lambda/\mu\text{m}$	Before inactivation $a_0/\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	After inactivation $a_0/\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$
3-5	1.124	1.072
8-14	0.917	0.096

由表 1 可知, 灭活后, 中红外波段样品平均质量消光系数降低了 4.6%, 远红外波段样品平均质量消光系数降低了 89.5%。

3.3 结果讨论

对黑曲霉孢子进行灭活前后样品测试, 反射光谱差异较大, 从而造成 3~5 μm 、8~14 μm 波段的质量消光系数也有较大差异, 分析其原因, 可能来自 3 方面:

(1) 灭活过程中后期的烘干处理, 使黑曲霉孢子细胞内水的含量较之前变少, 所以与未灭活前相比, 灭活后的黑曲霉孢子对红外波段的吸收作用大大降低, 灭活后黑曲霉孢子的质量消光系数要小于灭活前黑曲霉孢子的质量消光系数。

(2) 细胞物理形态的变化导致光谱差异。如灭活过程会使细胞膜皱缩、变形, 导致细胞形态发生变化, 引起光谱差异。灭活也可能使细胞膜破裂, 导致一些细胞亚结构渗漏出细胞, 这些不同形态的细胞碎片也会引起光谱的变化。

(3) 灭活引起的化学结构的改变导致光谱差异。通过氢键等次级键, 天然蛋白质维持其空间结构, 在细胞灭活过程中导致蛋白质分子内部的结构被破坏, 从而导致蛋白质变性, 核酸断裂。蛋白质变性后次级键被破坏, 蛋白质分子由有序的、卷曲的紧密结构变为无序的、松散的伸展状结构。例如原来处于分

子内部的疏水基团会大量暴露在分子表面, 使 280 nm 吸收光谱升高。

4 结 论

通过上述的计算分析表明, 结合实验测量的反射率光谱数据, 利用 K-K 关系计算灭活前后黑曲霉孢子复折射率, 进一步计算其红外波段的质量消光系数, 通过分析其结果可知, 灭活对中波红外波段样品的平均质量消光系数影响较小, 而对远红外波段样品的平均质量消光系数很大。计算得到的灭活前后黑曲霉孢子在 3~5 μm 、8~14 μm 波段的平均质量消光系数的差异对黑曲霉孢子光学特性的研究以及影响黑曲霉孢子的电磁衰减特性因素具有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] Feng Mingchun, Xu Liang, Gao Minguang, et al. Optical properties research of Bacillus subtilis spores by fourier transform infrared spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2012, 32(12): 3193-3196. (in Chinese)
冯明春, 徐亮, 高闽光, 等. 傅里叶红外变换光谱仪对枯草芽孢杆菌的光学特性研究 [J]. 光谱学与光谱析, 2012, 32(12): 3193-3196.
- [2] Dalterio R A, Nelson W H, Britt D, et al. Steady-state and decay characteristics of protein tryptophan fluorescence from bacteria[J]. Applied spectroscopy, 1986, 40(1): 86-90.
- [3] Bronk Burt V, Reinisch Lou. Variability of steady-state bacterial fluorescence with respect to growth conditions [J]. Applied Spectroscopy, 1993, 47(4): 436-440.
- [4] Pinnick Ronald G, Hill Steven C, Nachman Paul, et al. Fluorescence particle counter for detecting airborne bacteria and other biological particles [J]. Aerosol Science and Technology, 1995, 23(4): 653-664.
- [5] Paul Nachman, Gang Chen, Pinnick R G, et al. Conditional-sampling spectrograph detection system for fluorescence measurements of individual airborne biological particles [J]. Applied Optics, 1996, 35(7): 1069-1076.
- [6] Ross K F A, Billing E V E. The water and solid content of living bacterial spores and vegetative cells as indicated by refractive index measurement[J]. J Gen Microbiol, 1957, 16(2):418-425.
- [7] Zou Bingfang, Zhang Yinchao. Multi-wavelength fluorescence lidar detection of bioaerosols [J]. Infrared and Laser

- Engineering, 2006, 35(S3): 262-267. (in Chinese)
邹炳芳, 张寅超. 多波长荧光激光雷达测生物气溶胶的数值模拟计算[J]. 红外与激光工程, 2006, 35(S3): 262-267.
- [8] Lan Tiange, Xiong Wei, Fang Yonghua, et al. Study on passive detection of biological aerosol with Fourier-transform infrared spectctroscopic technique [J]. Acta Optica Sinica, 2010, 30(6): 1656-1661. (in Chinese)
兰天鸽, 熊伟, 方勇华, 等. 应用被动傅里叶变换红外光谱技术探测生物气溶胶研究[J]. 光学学报, 2010, 30(6): 1656-1661
- [9] Feng Chunxia, Huang Lihua, Zhou Guangchao, et al. Computation and analysis of light scattering by monodisperse biological aerosols [J]. Chinese Journal of Lasers, 2010, 37(10): 2592-2598. (in Chinese)
冯春霞, 黄立华, 周光超, 等. 单分散生物气溶胶光散射特性的计算与分析 [J]. 中国激光, 2010, 37(10): 2592-2598.
- [10] Cai Shuyao, Zhang Pei, Zhu Linglin, et al. Research on detection technology of bioaerosols with tryptophan intrinsic fluorescence measurement [J]. Acta Optica Sinica, 2012, 32(5): 0512009-1-0512009-6. (in Chinese)
蔡淑窈, 张佩, 朱玲琳, 等. 基于色氨酸本征荧光测量的生物气溶胶检测技术研究 [J]. 光学学报, 2012, 32(5): 0512009-1-0512009-6.
- [11] Tuminello P S, Arakawa E T, Khare B N, et al. Optical properties of Bacillus subtilis spores from 0.2 to 2.5 μm [J]. Appl Opt, 1997, 36(13): 2818-2824.
- [12] Sun Dujuan, Hu Yihua, Gu Youlin, et al. Preparation and performance testing of metallic biologic particles [J]. Acta Photonica Sinica, 2013, 42(5): 555-558. (in Chinese)
孙杜娟, 胡以华, 顾有林, 等. 金属化生物颗粒的制备与性能测试[J]. 光子学报, 2013, 42(5): 555-558.
- [13] Sun Dujuan, Hu Yihua, Gu Youlin, et al. Determination and model construction of microbes' complex refractive index in far infrared band[J]. Acta Phys Sin, 2013, 62(9): 094218-1-094218-9. (in Chinese)
孙杜娟, 胡以华, 顾有林, 等. 微生物远红外波段复折射率测定及模型构建[J]. 物理学报, 2013, 62(9): 094218-1-094218-9.
- [14] Michael I M, Larry D T, Andrew A L. Scattering, Absorption and Emission of Light by Small Particles [M]. London: Cambridge, 2002: 3-8.
- [15] Lucarini V, Saarinen J J, Peiponen K E, et al. Kramers-Kronig Relations in Optical Materials Research [M]. Germany:Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005: 9-25.
- [16] Dou Zhengwei, Li Xiaoxia, Zhao Jijin. Complex refraction indices of expanded graphite deduced from its refraction spectra in infraredband [J]. Acta Armamentar II, 2011, 32(4): 498-502. (in Chinese)
豆正伟, 李晓霞, 赵纪金. 光谱法研究膨胀石墨红外波段复折射率[J]. 兵工学报, 2011, 32(4): 498-502.
- [17] Bohern C F, Huffman D R. Absorption and Scattering of Light by Small Particles [M]. New York: John Wiley & Sons, 1983: 227-234.