

**SPEKTROMETRIA MAS W BADANIACH SKAŻEŃ
MIKROBIOLOGICZNYCH ŚRODOWISKA. CZĘŚĆ II.
KWASY 3-HYDROKSYTŁUSZCZOWE JAKO
BIOMARKERY LIPOPOLISACHARYDÓW
(ENDOTOKSYN) ŚCIAN KOMÓRKOWYCH BAKTERII
GRAMUJEMNYCH**

INVESTIGATION (DETECTION) OF ENVIRONMENT
MICROBIAL CONTAMINATION BY MASS
SPECTROMETRY. PART II.
3-HYDROXY FATTY ACIDS AS A
LIPOPOLYSACCHARIDES (ENDOTOXIN)
BIOMARKERS OF THE GRAM-NEGATIVE BACTERIAL
CELL WALLS

Karol Bal, Zbigniew Mielniczuk

*COBRO - Instytut Badawczy Opakowań
ul. Konstancińska 11, 02-942 Warszawa
e-mail: bal@cobro.org.pl*

Abstract

Wstęp

1. Struktura chemiczna lipopolisacharydu
2. Funkcje biologiczne lipopolisacharydu
3. Metody oznaczania lipopolisacharydów
4. Przykłady zastosowania chromatografii i spektrometrii mas w badaniach lipopolisacharydów
5. Przykładowe widma mas pochodnych kwasów 3-hydroksytłuszczowych
6. Zastosowania praktyczne
 - 6.1. Obliczanie zawartości lipopolisacharydu w próbkach

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Karol Piotr Bal, urodzony w 1949 r. (Krosno), ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Warszawskim w 1972 r. Doktorat nauk chemicznych uzyskał w Instytucie Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk w 1976 r. W latach 1977–1978 odbył staż podoktorski na Wydziale Chemii Uniwersytetu Nowego Brunswicku we Fredericton, Kanada. W latach 2005–2006 przebywał jako „guest scientist” na Wydziale Mikrobiologii Medycznej Uniwersytetu w Lund, Szwecja w zespole Prof. L. Larssona. Adiunkt w IChO PAN w latach 1976–1985. W latach 1986–1998 adiunkt w Instytucie Sportu w Laboratorium

Badań Antydopingowych. W latach 1999–2006 adiunkt w Instytucie Żywności i Żywnienia w Warszawie. Obecnie adiunkt w COBRO – Instytut Badawczy Opakowań, Warszawa. Autor ponad 20 oryginalnych artykułów oraz około 30 innych publikacji w czasopismach krajowych i zagranicznych. Członek Polskiego Towarzystwa Chemicznego od 1975 r.



Zbigniew Maksym Mielniczuk, urodzony w 1941 r., zm. 17.06.2013 r. ukończył studia chemiczne na Politechnice Warszawskiej w 1971 r. Doktorat nauk technicznych na Akademii Rolniczej w Poznaniu 1976 r. W latach 1977–1978 odbył staż podoktorski na Wydziale Chemii Uniwersytetu Dalhousie, Halifax, Kanada. W latach 1992–1994 przebywał jako „guest scientist” na Wydziale Mikrobiologii Medycznej Uniwersytetu w Lund, Szwecja w zespole Prof. L. Larssona. Doktor habilitowany nauk biologicznych – Uniwersytet Łódzki 1997 r. Sekretarz Naukowy oraz Prof. nzw. w COBRO - Instytut Badawczy

Opakowań. Autor ponad 40 oryginalnych artykułów oraz około 80 innych publikacji w czasopismach krajowych i zagranicznych

ABSTRACT

Microorganisms synthesize several monomeric chemical structures that are not found elsewhere in nature, e.g. muramic acid (an amino sugar) and D-amino acids (D-alanine and D-glutamic acid) are ubiquitous in bacterial peptidoglycan (PG). Characteristic sugars (e.g. heptoses) and 3-hydroxylated fatty acids are found in the endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) of gram-negative bacteria [1].

The best way to protect against environment contamination is microbial control. Methods in current use for monitoring microorganisms mainly include culture and direct microscopy. However, several factors, including samples collection, growth conditions, incubation temperature and interaction between different organisms all affected the culture results.

Additionally, culture based methods can detect only viable organisms and they are also time consuming, sometimes taking days or weeks.

However, since both living and dead microorganisms express irritating and toxic structures, they should all be taken into consideration.

Muramic acid has been suggested for use as a chemical marker in gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) determination of bacterial peptidoglycan [2]. While 3-hydroxylated fatty acids are the best proposition for use as a chemical markers in gas chromatography-mass spectrometry determination of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) of gram-negative bacteria in both clinical and environmental samples [38]. Two derivatives have been applied, including the trimethylsilyl (TMS) and pentafluorobenzoyl (PFBO) derivatives [80].

Both derivatives (TMS and PFBO) have been proven suitable for use with GC-ion-trap tandem MS [3].

The aim of our proposition is trial of application of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method as an alternative or complement to culturing, microscopy and other assays for detection, characterization and monitoring of microbial contamination of environment (e.g. water, air, air-conditioning systems), contamination of biochemical and food production chain processes, packaging for foodstuffs etc. by analysis of bacterial 3-hydroxylated fatty acids as a biochemical markers.

A method is described for the quantitation of methyl esters of 3-hydroxyacids, markers of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin), as trimethylsilyl or pentafluorobenzoyl derivatives using GC/MS method.

The described methods are quick and simple, can be applied for monitoring microbial contamination directly, without prior culturing, in complex environmental samples.

This method can be also applied for testing processes of cleaning and disinfections on packaging materials or on both packaging materials/foodstuffs in order to decrease their microbial load and thus to ensure better shelf-life.

- [1] Z. Mielniczuk, K. Bał, Spektrometria mas w badaniach skażeń mikrobiologicznych środowiska. Część I. Kwas muraminowy jako biomarker ścian komórkowych bakterii, *Wiad. Chem.*, 2012, **66**, 445.
- [2] K. Bał, L. Larsson, E. Mielniczuk, Z. Mielniczuk, Structure of muramic acid TMS derivative mass spectrum's base ion ($m/z=185$) used for quantification of bacterial peptidoglycan, *J. Microbiol. Meth.*, 2002, **48**, 267.
- [3] A. Saraf, L. Larsson, Identification of microorganisms by mass spectrometry, *Advances in Mass Spectrometry*, 1998, **14**, 449.
- [38] Z. Mielniczuk, E. Mielniczuk, L. Larsson, Gas chromatography-mass spectrometry methods for analysis of 2- and 3-hydroxylated fatty acids: Application for endotoxin measurement, *J. Microbiol. Meth.*, 1993, **17**, 91.
- [80] Z. Mielniczuk, S. Alugupalli, E. Mielniczuk, L. Larsson, Gas chromatography-mass spectrometry of lipopolysaccharide 3-hydroxy fatty acids: comparison of pentafluorobenzoyl and trimethylsilyl methyl ester derivatives, *J. Chromatogr.*, 1992, **623**, 115.

Keywords: LPS, lipopolysaccharide, gas chromatography-mass spectrometry

Słowa kluczowe: LPS, lipopolisacharyd, chromatografia gazowa, spektrometria mas

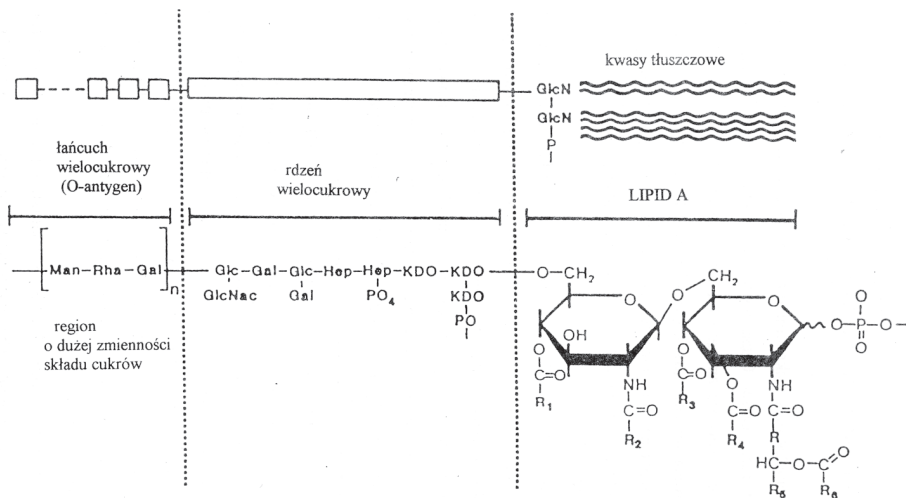
WSTĘP

Kontrolę skażeń mikrobiologicznych szeroko rozumianego środowiska naturalnego można prowadzić metodami klasycznymi, takimi jak np. immunologicznymi [radioimmunologicznymi (RIA), immunofluorescencyjnymi (IF), immunoenzymatycznymi (ELISA)] lub genetycznymi polegającymi na identyfikacji ściśle dobranego fragmentu materiału genetycznego z użyciem techniki „Polymerase Chain Reaction” (PCR), jak również poprzez hodowlę drobnoustrojów na pożywkach połączonych z badaniami mikroskopowymi. Metody oparte na hodowli są pracochłonne i do uzyskania wyniku wymagają co najmniej kilku dni, a nawet kilku tygodni. Ponadto pozwalają wykryć tylko żywe organizmy, a jak wiadomo zarówno żywe jak martwe mikroorganizmy posiadają toksyczne struktury i dlatego obie formy powinny być brane pod uwagę podczas monitorowania skażeń mikrobiologicznych. Alternatywą do w/w metod może być zastosowanie chromatografii gazowej i spektrometrii mas (GC/MS) do monitorowania unikalnych markerów chemicznych bakterii, a tym samym do wykrywania skażeń mikrobiologicznych w otoczeniu (np. w powietrzu, wodzie, kurzu) [1–3].

Wszystkie bakterie mają stosunkowo prostą budowę i są osłonięte błoną komórkową. Komórki bakterii (z wyjątkiem *Mycoplasmatales* i *Archaeobacterie*) otoczone są leżącą na zewnątrz błoną, ścianą komórkową tworzącą szkielet zewnętrzny decydujący m.in. o kształcie komórki. Jednym z ważniejszych składników ścian komórkowych bakterii gram-ujemnych jest zewnętrzna osłona zbudowana z białek oraz lipopolisacharydu [4, 5]. Lipopolisacharyd (LPS), którego brakuje u bakterii gram-dodatnich, jest endotoksyną stanowiącą amfifilowy integralny składnik zewnętrznej błony komórkowej osłony bakterii gram-ujemnych, gdzie tworzy on złożone struktury z białkami i fosfolipidami.

Ze względu na ważną rolę jaką ściana komórkowa odgrywa w funkcjach życiowych bakterii oraz że właśnie ona zawiera wiele unikalnych związków chemicznych, poniżej, w dużym uproszczeniu opisana została budowa chemiczna lipopolisacharydu, składnika ściany komórkowej bakterii gram-ujemnych.

1. STRUKTURA CHEMICZNA LIPOPOLISACHARYDU



Rysunek 1. Schemat struktury lipopolisacharydu bakterii gram-ujemnych [6], po modyfikacjach
 Figure 1. Schematic structure of the lipopolysaccharide of gram-negative bacteria, [6] after modifications

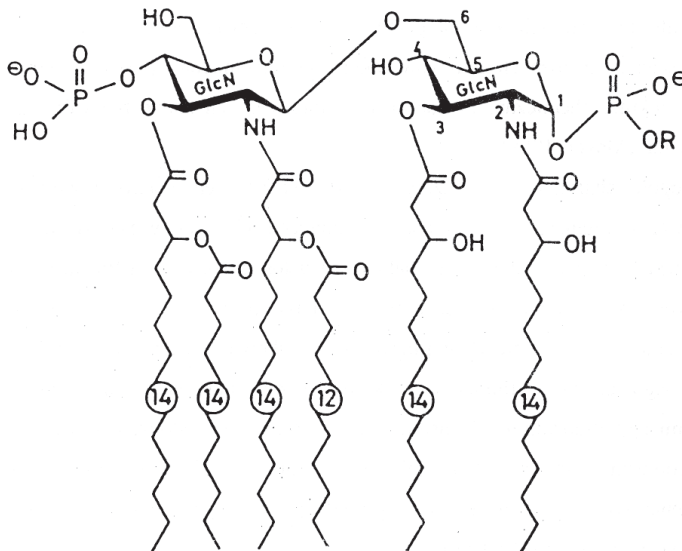
Duża, kompleksowa makrostruktura LPS, przedstawiona schematycznie na Rysunku 1 składa się z trzech części: pierwszej, zewnętrznej, zbudowanej z wielocukrów, odpowiedzialnej za swoistość antygenową (tzw. łańcuch O-swoisty); jest to najbardziej wyeksponowana na zewnątrz część LPS [7], charakteryzująca się znaczną zmiennością. Fragment ten zbudowany jest z powtarzających się od 20 do 40 jednostek, z których każda składa się z jednej do siedmiu cząsteczek cukrów.

Drugą część stanowi oligosacharydowy rdzeń LPS, który zawiera dwa rzadko spotykane cukry: kwas 2-keto-3-deoksyoktanowy (KDO), występujący we wszystkich lipopolisacharydach, (jest on ogniwem łączącym wielocukier z lipidem A), oraz siedmio węglowy cukier, heptozę.

KDO jest związkiem bardzo rzadko występującym w przyrodzie i poza lipopolisacharydami można go znaleźć w nielicznych roślinach i glonach. Wiązanie KDO z lipidem A jest bardzo słabe i może ulegać hydrolizie kwaśnej w bardzo umiarkowanych warunkach [8].

Trzecią częścią LPS jest właśnie lipid A. Jest to najmniej zmienna część LPS, odpowiedzialna za jego toksyczne oddziaływanie. Lipid A zawiera rdzeń cukrowy złożony z dwóch reszt cząsteczek N-acetylo-D-glukozyaminy (GlcNAc) połączonych ze sobą wiązaniem beta-1,6 [9]. Do tego kompleksu, przyłączone są dwie grupy fosforylowe [10] i cztery kwasy tłuszczowe (Rys. 2). Są to kwasy nie zawierające grupy hydroksylowej, 3-hydroksy- oraz bardzo rzadko kwasy 2-hydroksytłuszczowe, o długości łańcucha od 10 do 20 atomów węgla, połączonych z GlcNAc wiązaniem estrowym lub amidowym [11]. Skład kwasów tłuszczowych LPS jest charak-

terystyczny dla pałeczek gram-ujemnych, i może być użyty jako chemiczny marker przydatny do ich wykrywania, a nawet identyfikacji [12, 13]. Chemiczną strukturę lipidu A *E. coli* przedstawiono na Rysunku 2.



Rysunek 2. Struktura chemiczna lipidu A *E. coli* [5], po modyfikacjach
Figure 2. Chemical structure of the lipid A of *E. coli*, [5], after modifications

2. FUNKCJE BIOLOGICZNE LIPOPOLISACHARYDU

Zewnętrzna warstwa osłony komórkowej bakterii gram-ujemnych stanowi doskonałą, nieprzepuszczalną barierę dla wielu substancji [14, 15]. W roku 1952 Westphal i Lüderitz i in. [16] wyizolowali składnik toksyczny z pałeczek *Salmonella*, *Serratia* i *Vibrio*. Autorzy stwierdzili, że zawiera on zawsze wielocukier oraz lipid (stąd: lipopolisacharyd, LPS), powiązane z grupą fosforanową, która bardzo zmienia reaktywność obu składników. Lipopolisacharyd będący najbardziej wysuniętą częścią składową zewnętrznej warstwy osłony komórkowej bierze udział w wielu czynnościach życiowych bakterii. M.in. pełni zasadniczą rolę w zachowaniu kształtu bakterii i ich ochronie przed czynnikami zewnętrznymi. Lipopolisacharydy różnych gatunków bakterii gram-ujemnych posiadają bardzo podobną strukturę chemiczną. Przedmiotem najliczniejszych badań był LPS z pałeczek *Salmonella* [9].

Lipopolisacharyd – z biologicznego punktu widzenia endotoksyna – spełnia, jak wspomniano wyżej, wiele bardzo ważnych funkcji życiowych bakterii gram-ujemnych. Część wielocukrowa, a zwłaszcza łańcuch O-specyficzny nadaje bakterii swoistość antygenową. LPS warunkuje też właściwości pasożytnicze i chorobotwórcze bakterii, wpływa na wrażliwość komórek na działanie antybiotyków i licznych czynników chemicznych. Jego obecność tłumaczy większość różnic pomiędzy bak-

teriami gram-ujemnymi i gram-dodatnimi. Najistotniejszą właściwością endotoksyny jest zdolność do wywoływania zarówno u ludzi jak i u zwierząt gorączki oraz objawów wstrząsu (zaburzenia krążenia powodujące nieprawidłowe funkcjonowanie wielu narządów prowadzące do śmierci) [17].

Endotoksyny w mniejszych ilościach, oddziałują korzystnie na organizm przez stymulację jego ogólnej odporności na zakażenia bakteryjne, wirusowe, a także wykazują działanie nekrotyzujące w stosunku do tkanek nowotworowych. Zdaniem wielu badaczy, kontakt z endotoksynami ma istotne znaczenie dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania układu odpornościowego.

Podanie osobie zdrowej, LPS np. w ilości 4 ng/kg masy ciała powoduje wytwarzanie i uwalnianie mediatorów stanu zapalnego jako czynnika nekrozy nowotworów (TNF- α), cytokin (w tym interleukiny 1, 6 i 8), rodników tlenowych (tlen atomowy, nadtlenek wodoru, tlenek azotu) oraz lipidów, jak prostaglandyna E2 i tromboksan A2 [18, 19]. Pobudzone przez LPS makrofagi wytwarzają mediatory stanu zapalnego w umiarkowanej ilości, które stymulują korzystne reakcje organizmu, jak stany podgorączkowe, pobudzenie układu odpornościowego, czy też niszczenie drobnoustrojów. W ciężkich zakażeniach, endotoksyny są gromadzone w dużych ilościach we krwi, co stymuluje uwalnianie przez makrofagi mediatorów w obrębie całego ustroju. Efektem tego działania są reakcje niepożądane, takie jak wysoka gorączka, znaczne obniżenie ciśnienia krwi, wewnętrzznaczyniowe wykrzepianie krwi, wstrząs zagrażający życiu. Obserwacje te zostały potwierdzone po zsyntetyzowaniu lipidu A i przebadaniu jego aktywności biologicznej [20, 21].

Przebywanie w środowisku o wysokim stężeniu endotoksyn, (np. w pomieszczeniach o niedostatecznej lub wadliwej wentylacji jak w szkołach, szpitalach, biurach, rzeźniach, farmach hodowlanych, fabrykach tekstylnych, przy skażeniu bakteriami wody używanej do klimatyzacji), może być przyczyną wielu schorzeń górnych dróg oddechowych, np. alergii, czy przewlekłych nieżytów oskrzeli [22, 23]. Uważa się, że stężenie LPS w powietrzu (kurzu) w ilości 0,1–0,2 mg/m³ jest stężeniem krytycznym wywołującym w/w objawy [24].

Instytucje oraz firmy np. farmaceutyczne, zajmujące się hodowlą tkankową, inżynierią genetyczną, czy też produkcją leków, przyjmują dopuszczalne stężenie endotoksyn w produkcie końcowym na poziomie 0,025 ng/ml (25 pg/ml). Kurz obecny praktycznie wszędzie w normalnym środowisku, jest złożoną mieszaniną związków organicznych i nieorganicznych, przy czym jego skład zależy od środowiska. Endotoksyny pochodzące z bakterii gram-ujemnych obecnych w kurzu, wydają się być głównymi składnikami odpowiedzialnymi za zaburzenia układu oddechowego [25, 26].

3. METODY OZNACZANIA LIPOPOLISACHARYDÓW

W wielu krajach oficjalnie uznaną metodą stwierdzania obecności lipopolisacharydu jest test pirogeny z wykorzystaniem królików. Jest on jednak mało dokładny i kosztowny [27].

Stężenie lipopolisacharydów w środowisku jest oznaczane głównie testem „LAL” (*Limulus ameocyte lysate test*). LAL jest wodnym wyciągiem z komórek krwi (*amebocytes*) kraba morskiego, „*Limulus polyphemus*” [28].

Lipopolisacharyd aktywuje kaskadową reakcję krzepnięcia LAL, prowadząc do utworzenia żelu. Stopień żelowania LAL pozostaje w ścisłym związku z ilością LPS w badanej próbce [29]. Spektrofotometryczny pomiar pozwala na określenie zawartości LPS o stężeniu powyżej 1 pg/ml [30].

Połączona metoda LAL z testem immunoenzymatycznym (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) obniża próg wykrywania LPS do stężenia poniżej 1 pg/ml [31]. Metoda LAL znalazła m.in. zastosowanie kliniczne do szybkiej diagnostyki zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych [32].

Wiadomo jednak, że wiele innych substancji niż LPS, m.in. peptydoglikan, dekstrany, niektóre białka oraz polinukleotydy, aktywują reakcję LAL, natomiast inne: typu elektrolitów, hormonów, czy antybiotyków, mogą ją hamować [33].

W roku 1978, Iwanaga i in. [34], wprowadzili, a w 1983 r. Harris i in. [35] ulepszyli kolorymetryczną metodę ilościowego oznaczania endotoksyn używając syntetycznego peptydu (S-2423) jako substratu dodawanego do badanej próbki inkubowanej uprzednio z LAL. W trakcie zachodzącej reakcji, z substratu wydziela się zabarwiona na żółto p-nitroanilina, której absorbancja mierzona przy 405 nm jest proporcjonalna do zawartości endotoksyn.

Te klasyczne techniki biochemiczne są często niedostatecznie selektywne, pracochłonne i ilościowo nieprecyzyjne. Porównanie oznaczania lipopolisacharydów w kurzu znajdującym się w pomieszczeniach produkcyjnych zakładów drobiarskich metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MC) i metodą LAL [36], wykazały niewielką korelację pomiędzy zastosowanymi metodami. Wyższe wartości stężeń uzyskiwano przy stosowaniu metody GC/MS. Ciągłe udoskonalanie testu LAL pozwala jednak uzyskiwać lepsze korelacje z GC-MS [37]. Poniżej porównano niektóre cechy testu *Limulus* z metodą GC/MS:

	Limulus	GC/MS
czułość	wysoka (pg/ml)	umiarkowana (ng/w próbce)
swoistość	umiarkowana	wysoka
pomiar	„wolny” LPS	całkowita ilość LPS

Chromatografia gazowa (GC), sprzężona najczęściej ze spektrometrią mas (MS) jest szczególnie użyteczną metodą do wykrywania i oznaczania ilościowego markerów chemicznych bakterii [1], w tym kwasów 3-hydroksy tłuszczowych charakterystycznych markerów lipopolisacharydów (endotoksyn) składników ścian

komórkowych bakterii gram-ujemnych. Wysoka czułość i specyficzność tego układu analitycznego umożliwia oznaczenie markerów bezpośrednio w próbkach klinicznych i środowiskowych, bez uprzedniej, często długiej hodowli. Pozwala wykrywać zanieczyszczenia bakteriami w tak skomplikowanych próbkach jak np. kurz z powietrza [38, 39], w próbkach materiałów klinicznych [40], czy też glebie [41].

Przygotowanie próbki do badań jest proste i nie wymaga często pracochłonnej i długotrwałej hodowli bakterii. Składa się ono z kilku następujących etapów:

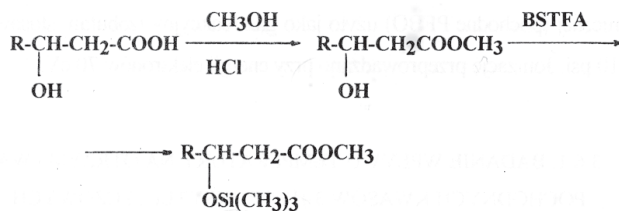
1. wydzielenie pojedynczych markerów chemicznych ze złożonej matrycy materiału wyjściowego, poprzez hydrolizę metanolem w roztworze HCl i ekstrakcję wytworzonych estrów metylowych kwasów tłuszczowych heksanem [42].
2. przeprowadzenie estrów metylowych w pochodne trimetylosililowe umożliwiające wykonanie analizy metodą GC-MS. Etap ten prowadzi do obniżenia polarności związków, zwiększa ich stabilność oraz wykrywalność.

Najczęściej stosowaną metodą jonizacji próbek jest metoda „electron impact” (EI) z zastosowaniem kwadropolowego detektora. Stosuje się również pochodne pentafluorobenzoilowe (PFBO). Do ich detekcji wymagana jest ujemna jonizacja chemiczna (CI) z zastosowaniem metanu, izobutanu lub amoniaku jako gazu jonizującego.

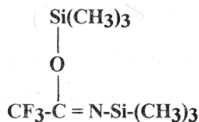
Detekcję związków można prowadzić metodą SIM (monitorowanie pojedynczych jonów) lub metodą SCAN (TIC, pomiar całkowitego prądu jonowego). Do obliczeń ilościowych najczęściej stosuje się kwas 3-OH tridekanowy (3-OH C13:0) nie występujący w strukturach bakterii.

Reakcje tworzenia pochodnych kwasów 3-hydroksytłuszczowych przebiegają według następujących schematów:

1. pochodne trimetylosililowe estrów metylowych (Me/TMS):

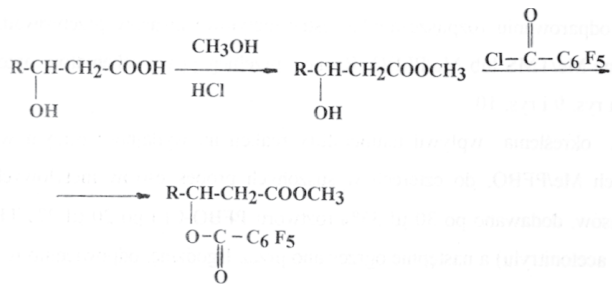


BSTFA = N,O-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid



R = rodnik alkilowy

2. pochodne pentafluorobenzoilowe estrów metylowych (Me/PFBO):



R = rodnik alkilowy

4. PRZYKŁADY ZASTOSOWANIA CHROMATOGRAFII I SPEKTROMETRII MAS W BADANIACH LIPOPOLISACHARYDÓW

Metodą GC/MS, jak wspomniano wyżej, możliwe jest wykrywanie i oznaczenie ilościowe, markerów chemicznych ścian komórkowych bakterii gram-ujemnych jakimi są kwasy 3-hydroksytłuszczowe. Związki te były wykrywane we wszystkich lipopolisacharydach. Już we wczesnych latach sześćdziesiątych uważano, że chromatografia gazowa może być zastosowana do charakteryzowania bakterii gram-ujemnych, poprzez analizę kwasów tłuszczowych, będących składnikami ich komórek [43].

Od tego czasu opublikowano wiele prac dotyczących klasyfikacji i identyfikacji bakterii na podstawie składu kwasów tłuszczowych [44, 45]. Kwasy te oznaczano również metodą chromatografii cieczowej [46] oraz gazowej połączonej ze spektrometrią mas (GC/MS) [47–49].

Oznaczanie tych kwasów prowadzi bezpośrednio do określenia stężenia LPS w badanym materiale [50, 51]. Z dokładniejszych badań wynika, że w czystych hodowlach są to głównie kwasy (*R*) 3-hydroksytłuszczowe [52], połączone w lipidzie A z glukozaminą zarówno wiązaniem estrowym jak i amidowym. Kwasy tego typu są związkami nie spotykanymi w naturze. Bliższe określenie jakościowe i ilościowe składu kwasów tłuszczowych pozwala na ocenę nie tylko ilości LPS, ale również rodzaju lub gatunku bakterii [53]. Skład kwasów tłuszczowych lipopolisacharydów niektórych bakterii gram-ujemnych podaje Wilkinson [54].

Ocena profilu kwasów organicznych wydzielanych z komórek bakteryjnych jest szczególnie istotna w przypadku konieczności szybkiej identyfikacji i klasyfikacji np. wolno rosnących bakterii lub pałeczek niefermentacyjnych [55–58].

Niewielkie ilości kwasów 3-hydroksytłuszczowych były wykrywane we frakcjach fosfolipidów ścian komórkowych *Mycobacterium* [59].

Ogólnie, w/w kwasy tłuszczowe zawarte w LPS stanowią od 15 do 22% całkowitej ilości kwasów tłuszczowych komórki bakteryjnej [60].

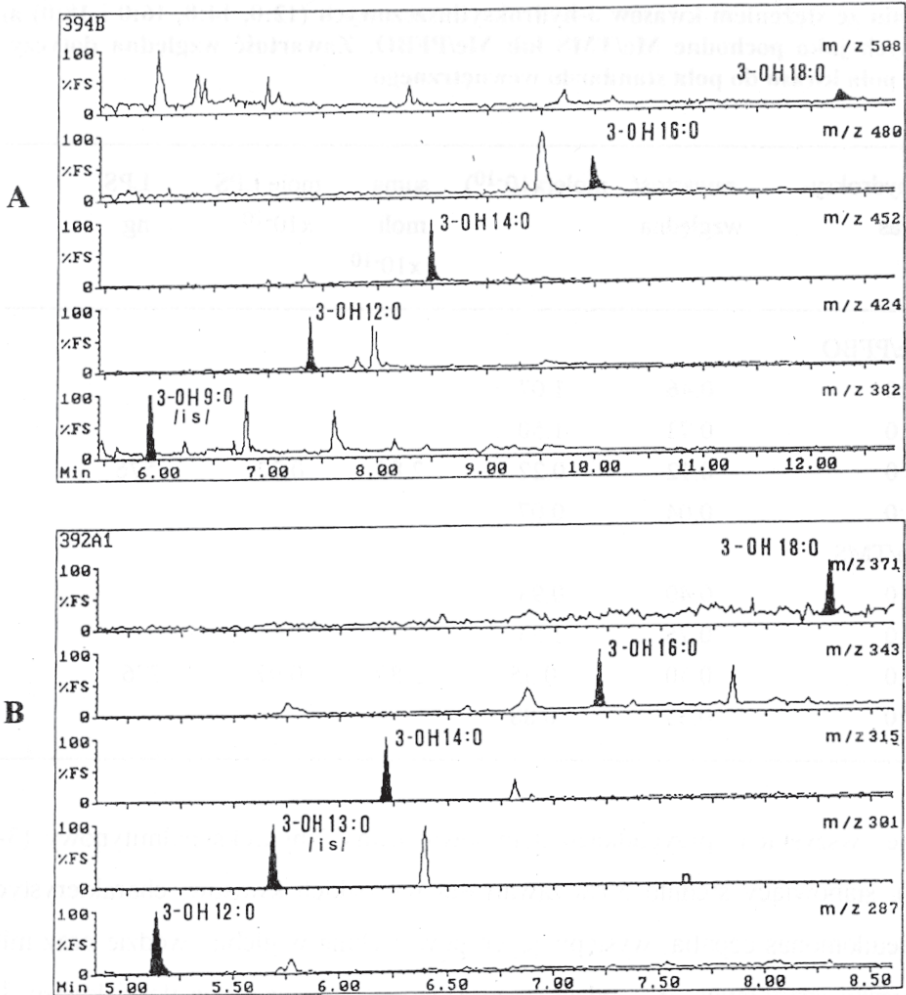
Należy nadmienić, iż w naturze rozpowszechnione są również kwasy 2-hydroksytyłuszczowe, ale najczęściej pochodzenia niebakteryjnego. Występują one np. w grzybach i jarzynach [61, 62].

W strukturze LPS występują 3-hydroksykwasy tłuszczowe zawierające najczęściej od 10 do 18 atomów węgla. Kwasy te mogą być użyte jako chemiczne markery endotoksyn w środowisku naturalnym [63]. Zawartość endotoksyn była badana w próbkach powietrza i kurzu pobranego z kabin samolotów pasażerskich w czasie rejsu. Stwierdzono iż stężenie endotoksyn w tych przypadkach było wyższe niż w próbkach pobranych z pomieszczeń mieszkalnych i biur. Były to kwasy o długości łańcucha od C10:0 do C18:0. Oznaczenia prowadzono metodą chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas typu pułapki jonowej oraz testem LAL [64].

Larsson i in. [65, 66] badali metodą spektrometrii mas stężenie endotoksyn w powietrzu pomieszczeń dla palaczy i niepalących. Stężenie endotoksyn w pokoju dla palaczy było 120 razy większe aniżeli w pomieszczeniu dla niepalących. Autorzy stwierdzają, że tego rodzaju badania mogą przyczynić się do wyjaśnienia genezy chorób górnych dróg oddechowych u palaczy.

Park i in. [67] metodą GC/MS badali stężenia endotoksyn w pomieszczeniach wolnostojących domów (sypialnia, kuchnia, bawialnia, duży pokój) w których przebywały dzieci chore na astmę oraz alergie. Autorzy stwierdzili różnice zarówno w stężeniu jak i długości łańcucha kwasów 3-hydroksytyłuszczowych w zależności od pomieszczenia. Kurz w kuchni zawierał najwyższą koncentrację kwasu 3-OH C:10 i wykazywał najwyższą aktywność endotoksyn (mierzoną testem LAL). Kurz w sypialni charakteryzował się dużą zawartością długołańcuchowych 3-OH kwasów i niską specyficzną aktywnością endotoksyn.

Pomorska i in. [68] stosując metodę chromatografii gazowej sprzężoną z tandemową spektrometrią mas typu pułapki jonowej (GC/MS/MS) zbadali powietrze (kurz organiczny) z 22 pomieszczeń dla zwierząt (owiec, świń, koni, krów, drobiu jak również stodoł) na obecność endotoksyn. Największe ich stężenie („*airborne endotoxin*”, LPS) stwierdzono w pomieszczeniach dla owiec, najmniejsze w stodołach. Zostało to potwierdzone testem LAL. We wszystkich jednak przypadkach przekroczony został podawany przez różnych autorów limit stężenia endotoksyn wynoszący 0,1 mu g/m³ co może stwarzać zagrożenie dla układu oddechowego zarówno ludzi jak i zwierząt.

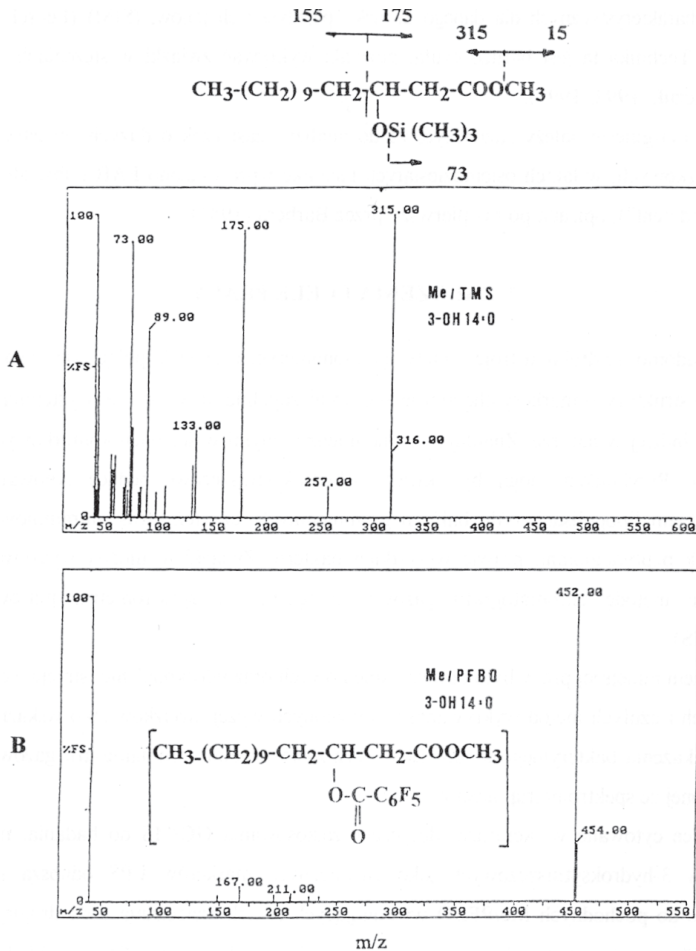


Rysunek 3. Chromatogramy jonowe próbki klinicznej zanieczyszczonej bakteriami otrzymane przez analizę GC/MS pochodnych Me/PFBO (A) lub Me/TMS (B) estrów metyloowych kwasów 3-hydroksy [80]
 Figure 3. Ion chromatograms of pharmacological samples contaminated with bacteria obtained by GC/MS analysis of Me/PFBO (A) or Me/TMS (B) derivatives of methyl esters of 3-hydroxyacids[80]

Na Rysunku 3 przedstawiono chromatogramy jonowe (SIM) pochodnych Me/PFBO, (A) oraz pochodnych trimetylosililowych (TMS) estrów metyloowych Me/TMS, (B) kwasów 3-hydroksy tłuszczowych próbki klinicznej zanieczyszczonej bakteriami.

Do rozdzielu kwasów najczęściej stosowanymi kolumnami są kwarcowe kolumny kapilarne o długości 15–30 m i średnicy wewnętrznej 0,25 mm, ze związaną fazą stacjonarną o grubości filmu 0,25 μm (np. CP-Sil 5 CB-MS, SE-54, OV-1).

5. PRZYKŁADOWE WIDMA MAS POCHODNYCH KWASÓW 3-HYDROKSYTŁUSZCZOWYCH



Rysunek 4. Widmo mas kwasu 3-hydroksymirystynowego – głównego składnika LPS *E. coli* – jako pochodnej Me/TMS (A) lub Me/PFBO (B) [80]

Figure 4. Mass spectrum of 3-hydroxy myristic acid – the main component of LPS of *E. coli* – a derivative of Me/TMS (A) or Me/PFBO (B) [80]

Rysunek 4 przedstawia widma mas kwasu 3-hydroksymirystynowego – głównego składnika LPS *E. coli* – jako pochodnej Me/TMS (A) lub Me/PFBO (B). Przykładowo zaznaczono również fragmentację związku.

Widma mas pochodnych Me/TMS kwasów 3-hydroksytłuszczowych charakteryzują się dwoma bardzo silnymi jonami: jeden o stosunku m/z równym M-15, związany z utratą grupy metylowej (np. dla kwasu 3-OH 14:0 jest to jon 315), i drugi o wartości m/z równym 175, (występujący we wszystkich kwasach 3- hydroksytłuszcz-

czowych) związany z rozerwaniem wiązania między czwartym a piątym węglem w cząsteczce. Jon $m/z = 73$ występuje we wszystkich pochodnych TMS (nie tylko w kwasach) i jest związany z grupą $-(CH_3)_3Si$. W zakresie wyższych mas występuje jon $m/z 257$ (M-73), związany utratą grupy $-(CH_3)_3Si$.

Dla pochodnej Me/PFBO kwasu 3-OH C14:0 w widmie mas występuje intensywny jon $m/z = 452$.

6. ZASTOSOWANIA PRAKTYCZNE

6.1. OBLICZANIE ZAWAROŚCI LIPOPOLISACHARYDU W PRÓBKACH (DLA POCHODNYCH ME/TMS)

Łatwo można oznaczyć lipopolisacharydy zawarte w materiale wyjściowym w stężeniu kilku nanogramów. Dotyczy to obu rodzajów pochodnych: Me/TMS oraz Me/PFBO.

Krzywe kalibracyjne dla oznaczania LPS *E.coli* w zakresie stężeń do 600 ng (stosując jako marker *E. coli* kwas 3-OH 14:0 i standard wewnętrzny kwas 3-OH 13:0) charakteryzują się równaniami:

$$\text{dla pochodnych Me/TMS: } y = (4,7x - 54,4)10^{-3}$$

$$\text{dla pochodnych Me/PFBO: } y = (3,9x - 50,6)10^{-3}$$

gdzie:

x = zawartość LPS w próbce,

y = stosunek pola jonu oznaczanego kwasu do pola jonu wzorca wewnętrznego
Współczynnik korelacji w obu przypadkach wynosił 0,9937.

Minimum detekcji wynosiło odpowiednio 3 pg dla pochodnych Me/TMS oraz 1 pg dla Me/PFBO, przy stosunku sygnału do szumu wynoszącym 4. Wartości te otrzymano w rutynowych warunkach analitycznych, przy monitorowaniu jonów metodą SIM.

Przy obliczaniu zawartości endotoksyn w środowisku, przyjęto założenie, że 1 mol lipidu A zawiera 4 mole 3-hydroksykwasów [20] oraz że średni ciężar cząsteczkowy LPS wynosi 8000 [69, 70].

Kolejność obliczeń:

1. obliczenie ilości moli 3-hydroksylovanego kwasu (3-OHK) w próbce:
według wzoru:

$$3\text{-OHK} = \frac{\text{pole jonu } m/z 175 \text{ danego kwasu} \times 50 \times 10^{(-9)}}{\frac{\text{pole jonu } m/z 175 \text{ standardu wewnętrznego}}{\text{ciężar cząsteczkowy kwasu}}}$$

gdzie: pola jonów $m/z 175$ mierzone przez GC/MS,

$50 \times 10^{(-9)}$ ilość wzorca (IS) dodanego do próbki – 50 ng kwasu 3-OH 13:0

Ciężar cząsteczkowy kwasów 3-hydroksylowych (mole):

kwas:	10:0	12:0	13:0	14:0	16:0	18:0
mole:	188	216	244	272	300	328

2. obliczenie sumy moli wszystkich kwasów w próbce (S3-OHK)

3. obliczenie ilości moli LPS (IMLPS)

$$\text{IMLPS} = \text{S3-OHK}/4$$

gdzie: 4 jest (umowną) ilością cząsteczek kwasów w cząsteczce LPS

4. obliczenie ilości ng LPS w próbce

$$\text{LPS}(\text{ng}) = \text{IMLPS} \times 8000$$

Przykład obliczeń:

Stężenie lipopolisacharydów oznaczano w próbce zebranej na filtrze Millipore 0,45 mm zasysając przez 2 godziny kurz (ok. 3 mg) z powietrza w laboratorium, próżniową pompką wodną. Wykryto następujące kwasy 3-hydrokstłuszczowe:

C12:0 C14:0 C16:0 C18:0

poła kwasów w jednostkach umownych wynosiły odpowiednio:

166 305 405 113

pole standardu wewnętrznego (kwas 3-OH C13:0) : 294

ilość moli poszczególnych kwasów (3-OHK):

0,13 0,19 0,23 0,06

suma moli wszystkich kwasów (S3-OHK) : 0.61

ilość moli LPS (IMLPS): 0,15

obliczona zawartość LPS w próbce: 1200 ng

Chromatogramy jonowe otrzymano z liofilizowanej próbki klinicznej, po przeprowadzeniu hydroksykwasów do pochodnych Me/TMS i Me/PFBO. Próbka zawierała kwasy: 3-OH 12:0, 3-OH 14:0, 3-OH 16:0 i 3-OH 18:0, zidentyfikowane metodą GC/MS w układzie SCN. Obliczona ilość LPS w próbce wynosiła, 576 ng, dla pochodnych Me/PFBO i 776 ng dla pochodnych Me/TMS.

Podobne postępowanie analityczne zastosowano w przypadku analizy próbek kurzu pobranych z odkurzacza z pomieszczeń mieszkalnych, komputera oraz wody pitnej w Lund, Szwecja [38].

Najwyższą zawartość LPS stwierdzono w kurzu zebrany z komputera (ok. 350 ng/mg kurzu) oraz z pokoju rekreacyjnego (ok. 170 ng/mg). Zawartość LPS w wodzie pitnej była bardzo niska (ok. 25 ng/100 ml).

We wszystkich przypadkach dominował kwas 3-hydroksypalmitynowy (3-OH 16:0), stanowiący średnio 50% zawartości wszystkich kwasów, charakterystyczny dla *Pseudomonas cepatia*, występujących powszechnie w glebie, wodzie oraz mikro środowisku szpitalnym. W wodzie stwierdzono ponadto znaczne ilości kwasu 3-hydroksymirystynowego (3-OH 14:0), charakterystycznego np. dla pałeczek *Salmonella*.

Zawartość procentowa LPS oznaczona w 1 mg suchej masy bakterii *H. pylori*, *P. mirabilis* i *E. coli*. wynosiła odpowiednio: 0,20, 0,82, 0,43% (1972, 8213 i 4291 ng/mg) przy stosunku jak 1,0: 4,1: 2,2. Najwięcej LPS posiada więc *P. mirabilis*.

W przypadku lipidu A *H. pylori* (NCTC 11637) dominującym kwasem jest 3-hydroksystearynowy (3-OH 18:0), przy czym udziały procentowe kwasów 3-OH wynosiły odpowiednio: dla 3-OH 14:0, (0,9%), 3-OH 16:0, (31,6%) oraz 3-OH 18:0, (67,5%). Należy nadmienić, że stężenie LPS w *H. pylori* jest zależne od szczepu bakterii, natomiast udziały procentowe poszczególnych kwasów ulegają jedynie bardzo małym wahaniom (własne nie publikowane dane [71]).

Dla *E. coli* i *P. mirabilis*, dominującym jest kwas 3-hydroksymirystynowy (3-OH 14:0) stanowiący ponad 99% kwasów 3-hydroksytłuszczowych.

PODSUMOWANIE

Wiele symptomów chorobowych (np. alergię, astma i inne) może być wywołanych wdychaniem mikroorganizmów obecnych w środowisku. Próby powiązania niektórych objawów klinicznych, z zawartością LPS w kurzu wdychanym z powietrzem jest zjawiskiem opisanym w literaturze [72–74]. Symptomy te związane są z określonymi bakteriami zawierającymi struktury chemiczne warunkujące ich aktywność biologiczną. Są one często bardzo skomplikowane, unikalne, nie występujące nigdzie indziej w naturze, złożone z połączonych ze sobą monomerycznych składników zwanych markerami chemicznymi.

Chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas (GC/MS) pozwala na wykrywanie i identyfikację tych markerów, co często umożliwia określenie składu mikrobiologicznego analizowanej próbki [75].

Lipopolisacharyd (LPS), jest przykładem złożonej struktury zawierającej kwasy 3-hydroksytłuszczowe, które są chemicznymi markerami prawie wszystkich bakterii gram-ujemnych.

Spośród wielu metod, chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS), wydaje się być najdogodniejszą metodą analityczną dla wykrywania i oznaczania ilościowego kwasów tłuszczowych [76]. Analiza kwasów 3-hydroksytłuszczowych metodą GC/MS, pozwala na dokładne ilościowe oznaczenie endotoksyn nawet w skomplikowanych próbkach pobranych ze środowiska. Kwasy te są

składnikami lipidu A, który jest częścią struktury LPS odpowiedzialnego za efekt endotoksyczny [77].

Skład kwasów 3-OH jest różny dla poszczególnych bakterii, a analiza GC/MS może dostarczyć informacji o pochodzeniu LPS. Na przykład, kwas 3-OH 14:0 jest dominującym w pałeczkach z rodziny *Enterobacteriaceae*, (*E. coli*, *P. mirabilis*), podczas gdy 3-OH 10:0, 3-OH 12:0, i 3-OH 16:0 w pałeczkach gram-ujemnych z rodziny *Pseudomonadaceae*, a 3-OH 18:0 w *H. pylori*. W niektórych bakteriach identyfikowane były również kwasy 3-hydroksytłuszczowe z nieparzystą liczbą atomów węgla [78]. Informacje uzyskane metodą GC/MS mogą być przydatne np. dla określenia pochodzenia zanieczyszczenia bakteriami gram-ujemnymi.

Uwolnienie kwasów tłuszczowych z LPS można osiągnąć stosując zarówno hydrolizę kwasową, jak i zasadową. Obie metody uwalniają kwasy z wiązań estrowych jak i amidowych, którymi są połączone z glukozoaminą. Z wielu względów takich jak tworzące się artefakty, czy też dłuższą procedurę, preferowana jest hydroliza metanolowym roztworem chlorowodoru. Hydroliza i przeprowadzenie kwasów do estrów metylowych, zachodzą w tym samym etapie przygotowania próbki [79–81]. Do ilościowego oznaczania LPS metodą GC/MS konieczne jest jeszcze przeprowadzenie kwasów 3-hydroksytłuszczowych w pochodne Me/TMS lub Me/PFBO.

Pochodne TMS były badane wcześniej [82], przy czym minimum detekcji LPS (metodą EI^+), wynosiło ok. 100 ng w 1 ml badanej próbki. Sonesson [83] wykazał, że stosując pochodne PFBO w analizie GC/MS metodą CI^- , możliwe jest wykrywanie 1 ng (10^{-9} g) LPS w próbce wyjściowej. Czulość metody CI^- zastosowanej do analizy pochodnych Me/PFBO nie odbiegała od podawanej w literaturze [83], tzn. 1 ng LPS w próbce wyjściowej jest wykrywalny w rutynowych warunkach analizy.

Różnica w czulości metod (CI^-) i (EI^+), przy zastosowaniu pochodnych Me/PFBO lub Me/TMS, okazała się mniejsza niż przypuszczano. Szczególnie jest to widoczne dla kwasu 3-OH 14:0, gdzie oznaczane ilości były takie same dla obu rodzajów pochodnych. Wyższe wartości ilościowe uzyskiwano dla pochodnej Me/TMS kwasu 3-OH 18:0 w porównaniu z pochodną Me/PFBO. Z doświadczeń własnych wynika również, że w celu uzyskania maksymalnej czulości i powtarzalności opisywanej metody zalecane jest:

1. użycie szkła (głównie probówek) z nieaktywną powierzchnią oraz nakrętek z teflonowymi podkładami,
2. unikanie zanieczyszczeń związkami pochodzącymi z detergentów, odczynników itp., w trakcie przygotowywania próbki,
3. użycie szklanego wkładu w dozowniku chromatografu gazowego, który powinien być dezaktywowany i czyszczony regularnie, szczególnie przy nowej serii oznaczeń, ze spodziewanymi, małymi stężeniami markerów w próbce,
4. użycie krótkiego odcinka kolumny (ok. 0,5–1 m), od strony dozownika, który powinien być wymieniany po serii oznaczeń, w celu uniknięcia

adsorpcji, i/lub rozkładu próbki na aktywnej powierzchni kolumny pokrytej cząsteczkami węgłonego materiału, głównie z węglowodorów, jak np. heksan, używanych jako rozpuszczalników,

5. źródło jonów spektrometru masowego powinno być rutynowo czyszczone,
6. do każdej serii oznaczeń powinna być dołączona „ślepa” próba tylko z odczynników przechodząca przez wszystkie etapy przygotowania właściwej próbki. Pozwala to nie tylko na ocenę „czystości” procedury, ale również stanu aparatury.

Jednakże, przygotowanie pochodnych Me/TMS jest łatwiejsze, reakcja jest szybka (15 min. w 80°C), oraz nie wymaga dodatkowych ekstraktji, jak w przypadku pochodnych Me/PFBO. Dodatkową korzyścią jest bardzo niski poziom szumów analitycznych w przypadku oznaczania pochodnych Me/TMS, nawet wówczas gdy analizowano bardzo małe ilości LPS.

Stwierdzoną prawidłowością jest także fakt dłuższej pracy włókna (korzyści ekonomiczne) w źródle jonów spektrometru mas pracującego w trybie jonizacji dodatniej EI^+ aniżeli w trybie ujemnej jonizacji chemicznej CI^- .

Kwasy 3-OH (poza LPS) były wykrywane w fosfolipidach np. w grupie *Flavobacterium* – *Cytophaga* [84], jak również w bardzo małych ilościach w lipidach ścian komórkowych *Mycobacterium* [85]. Dane o występowaniu tych kwasów w różnych rodzajach bakterii gram-ujemnych podaje Wilkinson [86].

Zastosowanie metody GC/MS umożliwia ich rozróżnienie przez wykrywanie charakterystycznych dla nich jonów.

Pochodne Me/TMS kwasów 3-OH są wykrywane przez rejestrowanie jonu $m/z = 175$. Występowanie określonych jonów w widmie mas dla pochodnych Me/PFBO uzyskanych metodą CI^- zależy od temperatury źródła jonów, czego nie obserwowano dla pochodnych Me/TMS analizowanych metodą EI^+ .

Obserwowany był jednak częściowy rozkład próbki podczas reakcji przeprowadzanej w 150°C w czasie 1 godziny.

Reakcja powstawania pochodnych Me/TMS zachodzi po ogrzewaniu próbki w 80°C przez 15 minut.

Oba rodzaje pochodnych są chemicznie stabilne podczas przechowywania przez kilka tygodni w temperaturze 4°C (dane nie publikowane).

Porównanie oznaczeń LPS metodą GC/MS z połączonym testem kolorymetrycznym i Limulus, wykazało, że np. w kurzu występują inne niż LPS aktywne substancje [87]. Dla ilościowego oznaczania kwasów 3-hydroksytyluszczowych niezbędne jest użycie standardu wewnętrznego. Jako najbardziej przydatne okazały się kwasy: 3-hydroksynonanowy (3-OH 9:0) [83] oraz 3-hydroksytridekanowy (3-OH 13:0) [80, 81]. Obydwa związki zawierają nieparzystą liczbę atomów węgla, posiadają identyczne właściwości chemiczne jak oznaczane kwasy co powoduje, że dodane w określonej, zawsze tej samej ilości do próbki, przechodzą przez wszystkie etapy jej przygotowania, podobnie jak kwasy zawarte w próbce.

E. coli jest pewnego rodzaju standardem, naturalną florą naszego organizmu, ale z drugiej strony są szczepy chorobotwórcze wywołujące np. biegunki u dzieci. Drobnoustrój ten występuje powszechnie w naszym środowisku i jest wskaźnikiem jego skażenia (miano coli), pośrednio wskazując na występowanie innych bakterii.

P. mirabilis, z klinicznego punktu widzenia jest ważny w przypadku zakażenia dróg moczowych. Bardzo rozpowszechniony w szpitalach (zakażenia wewnątrzszpitalne), łatwo namnaża się. Częstą przyczyną zakażeń może być np. cewnikowanie, stąd ważna jest kontrola bakteriologiczna używanego sprzętu medycznego, płynów itd.

P. aeruginosa może powodować powikłania np. w leczeniu ran pooperacyjnych.

H. pylori jest drobnoustrojem, klinicznie związanym z chorobą wrzodową żołądka i dwunastnicy zarówno u dorosłych jak i dzieci. Jest on bardzo intensywnie badany przez wiele ośrodków naukowych na świecie, stąd wynika potrzeba opracowania nowych, czułych metod jego wykrywania i identyfikacji. Metoda GC/MS i bardzo charakterystyczne spektrum kwasów LPS tej bakterii (m.in. wyjątkowa dominacja kwasu 3-OH 18:0) wydaje się być idealna do osiągnięcia tego celu [88]. Metoda GC/MS może służyć do wczesnego i szybkiego wykrycia skażenia bakteriami urządzeń produkcyjnych, reaktorów, surowców itp. używanych w procesach biotechnologicznych, fermentacyjnych w przemyśle farmaceutycznym, czy też spożywczym.

Wczesne wykrycie skażenia bakteriami, jeszcze przed rozpoczęciem procesu technologicznego, może przynosić wymierne korzyści ekonomiczne przyczyniając się do zmniejszenia strat finansowych przez uniknięcie strat w produkcji, czy też poprawę jakości wyrobu gotowego.

Należy nadmienić, że niedostateczna kontrola bakteriologiczna może prowadzić nie tylko do obniżenia jakości wytwarzanego produktu czy nawet jego całkowitego zniszczenia, ale może stanowić zagrożenie dla personelu i środowiska.

Obecnie ciągle jeszcze stosowane metody kontroli bakteriologicznej opierają się głównie na hodowlach badanych próbek i różnego rodzaju testach biochemicznych co może trwać od kilku godzin do kilku dni.

Rosnące zagrożenie skażeń bakteriami szpitali, sanatoriów, środowiska (np. wody), żywności, powoduje, że istnieje zapotrzebowanie na opracowanie nowych, czułych i szybkich metod oceny mikrobiologicznej wyżej wymienionych zagrożonych obszarów. Metoda GC/MS oznaczania specyficznych markerów ścian komórkowych bakterii, może być zastosowana do wykrywania zakażeń bakteryjnych u ludzi. Wykrywanie markerów chemicznych metodą GC/MS może znaleźć zastosowanie także do oceny mikrobiologicznej zanieczyszczenia systemów wentylacyjnych i klimatyzacyjnych.

Pomiary te mogą być wykonane bezpośrednio z pobranej próbki, bez uprzedniej, często długiej i trudnej hodowli bakterii.

Ogólnie można powiedzieć, że markerów chemicznych bakterii należy szukać przede wszystkim tam, gdzie w normalnych warunkach, skażenie bakteriami nie powinno mieć miejsca.

Zastosowanie chromatografii gazowej i spektrometrii mas jako metody analitycznej w mikrobiologii jest jedynie alternatywą do innych biologicznych metod badania drobnoustrojów. Może stanowić podstawę do znalezienia korelacji pomiędzy np. wdychaniem organicznego kurzu z określonego środowiska, a występującymi objawami klinicznymi.

Można przewidywać, że dalszy rozwój zastosowania metody GC/MS do wykrywania i ilościowego oznaczania markerów chemicznych ścian komórkowych bakterii może znaleźć zastosowanie np. do:

- a) szybkiego wykrywania zakażeń bakteryjnych u ludzi,
- b) oceny mikrobiologicznej skażeń procesów fermentacyjnych i biochemicznych w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym,
- c) oceny mikrobiologicznej zanieczyszczenia środowiska naturalnego, (wody, powietrza), szpitalnego i sanatoryjnego, płynów infuzyjnych, dializacyjnych, hodowli tkankowych,
- d) oceny mikrobiologicznej zanieczyszczenia systemów wentylacyjnych i klimatyzacyjnych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Z. Mielniczuk, K. Bal, *Wiad. Chem.*, 2012, **66**, 445.
- [2] K. Bal, L. Larsson, E. Mielniczuk, Z. Mielniczuk, *J. Microbiol. Meth.*, 2002, **48**, 267.
- [3] A. Saraf, L. Larsson, *Adv. Mass Spectr.*, 1998, **14**, 449.
- [4] S.M. Hammon, P.A. Lambert, A.N. Rycroft, *The bacterial cell surface*, Croom Helm, Becknham, U.K. 1984.
- [5] E.Th. Rietschel, U. Brade, U. Schade, U. Seydel, S. Zahringer, S. Kusumoto, H. Brade, *Bacterial endotoxins: properties and structure of biologically active domains* [w:] *Surface structures of microorganisms and their interactions with the mammalian host*, (E. Schrinner, M.H. Richmond, G. Seibert, U. Schwarz), VHC Publishers, Weinheim, 1997.
- [6] A. Fox, S.L. Morgan, L. Larsson, G. Odham, *Analytical microbiology methods. Chromatography and mass spectrometry*, Plenum Press, New York 1990.
- [7] P.J. Hitchcock, L. Leive, P.H. Makela, E.Th. Rietschel, W. Strittmatter, D.C. Morrison, *J. Bacteriol.*, 1986, **166**, 699.
- [8] I.C. Hancock, I.R. Poxton, *Separation and purification of surface components* [w:] *Bacterial cell surface techniques*, John Wiley and Sons, Chichester, 1988, 67.
- [9] Z. Sidorczyk, U. Zahringer, E.Th. Rietschel, *Eur. J. Biochem.*, 1983, **137**, 15.
- [10] H. Mayer, U.R. Bhat, H. Masoud, J. Radziejewska-Lebrecht, C. Widemann, J.H. Krauss, *Pure and Appl. Chem.*, 1989, **61**, 1271.
- [11] E.Th. Rietschel, H.W. Wollenwebe, H. Brade U. Zahringer, B. Lindner, U. Seydel, O. Bradaczek, H. Barnickel, H. Labischinski, P.W. Giesbrecht, *Handbook of Endotoxin*, Vol. 1, Chemistry of Endotoxin (E.Th. Rietschel, Red.), Elsevier, Amsterdam, 1984, str. 187.

- [12] A. Fox, J. Gilbert, S.L. Morgan, *Analytical microbiology: a perspective w Analytical microbiology methods. Chromatography and mass spectrometry*, (A. Fox, S.L. Morgan, L. Larsson, G. Odham, Red.), Plenum Press, New York 1990, str. 1.
- [13] S.G. Wilkinson, *Gram-negative bacteria [w:] Microbial lipids*, Vol. 1, (C. Ratledge, S.G. Wilkinson Red.), Academic Press 1988, Jovanovich H.B., Publishers.
- [14] H. Nikaido, T. Nakae, *The outer membrane of Gram-negative bacteria str.163-250 [w:] Advances in microbial physiology*, (A.H. Rose, J.G. Morris, Red.), Vol. 20, Academic Press, London 1979.
- [15] M. Vaara, H. Nikaido, *Molecular organization of bacterial outer membrane*, [w:] *Handbook of endotoxin*, (E.Th. Rietschel, Red.), vol. 1, Chemistry of endotoxin, Elsevier, Amsterdam 1984, str. 1.
- [16] O. Westphal, O. Luederitz, Ch. Galanos, H. Mayer, E.Th. Rietschel, *The story of bacterial endotoxin*, [w:] *Advances in Immunolopharmacology 3* (L. Chedid, J.W. Hadden, F. Spreafico, P. Dukor, D. Willoughby, Red.), Pergamon Press, Oxford 1986, 13.
- [17] A.C. McCartney, A.C. Wardlaw, *Endotoxic activities of lipopolysaccharides [w:] Immunolgy of bacterial cell envelope*, (D.E.S. Stewart-Tull, M. Davis, Reds.), John Wiley and Sons Ltd., Chichester, 1985, 203.
- [18] C.A. Dinarello, J.G. Cannon, S.M. Wolff, H.A. Bernheim, B. Beutler, A. Cerami, I.S. Figari, M.A. Palladino Jr., J.V. O'Connor, *J. Exp. Med.*, 1986, **163**, 1433.
- [19] G.D. Matrich, R.L. Danner, M. Ceska, A.F. Suffredini, *J. Exp. Med.*, 1991, **173**, 1021.
- [20] H. Takada, S. Kotani, *Crit. Rev. Microbiol.*, 1989, **16**, 477.
- [21] Ch. Galanos, O. Luederitz, E.Th. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M. Freudengerg, U. Schade, M. Imoto, H. Yoshimura, S. Kusumoto, T. Shiba, *Eur. J. Biochem.*, 1985, **148**, 1.
- [22] P. Malmberg, *Am. J. Indust. Med.*, 1990, **17**, 7.
- [23] R. Rylander, *Am. J. Indust. Med.*, 1990, **17**, 39.
- [24] R. Rylander, *Am. J. Indust. Med.*, 1987, **12**, 687.
- [25] R.M. Castellan, S.A. Olenchock, K.B. Kinslay, J.L. Hankinson, *N. Engl. J. Med.*, 1987, **317**, 605.
- [26] D.C. Morrison, J.L. Ryan, *Ann. Rev. Med.*, 1987, **38**, 417.
- [27] Z. Markiewicz, *Struktura i funkcje osłon bakteryjnych*, Wydaw. Naukowe PWN, Warszawa, 1993, str. 45.
- [28] J. Aleksandrowicz, Z. Kudelski, *Roczn. PZH*, 1997, **48**, 275.
- [29] J.F. Cooper, J. Levin, H.N. Wagner Jr., *J. Lab. Clin. Med.*, 1971, **78**, 138.
- [30] P. Friberger, M. Knos, L. Mellstam, *A quantitative endotoxin assay utilizing LAL and a chromogenic substrate*, [w:] *Endotoxins and their detection with the Limulus amoebocyte lysate test* (S.W. Watson, J. Levin, T.J. Novitsky, Red.), *Prog. Clin. Biol. Res.*, vol. 93, Alan R. Liss, New York, 1982, str. 195.
- [31] G.H. Zhang, L. Beak, C.J. Koch, *J. Clin. Microbiol.*, 1988, **26**, 1464.
- [32] T.L. Dwelle, L.M. Dunkle, L. Blair, *J. Clin. Microbiol.*, 1987, **25**, 856.
- [33] K. Ikemura, K. Ikegami, T. Shimazu, T. Yoshioka, T. Sugimoto, *J. Clin. Microbiol.*, 1989, **27**, 1965.
- [34] S. Iwanaga, T. Morita, T. Harada, Harada T, S. Nakamura, M. Niwa, K. Takada, T. Kimura, S. Sakakibara, *Haemostasis*, 1978, **7**, 183.
- [35] R.I. Harris, P.C.W. Stone, J. Stuart, *J. Clin. Pathol.*, 1983, **36**, 1145.
- [36] A. Sonesson, L. Larsson, A. Schutz, L. Hagmar, T. Hallberg, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**, 1271.
- [37] S.J. Reynolds, D.K. Milton, D. Heederik, P.S. Thorne, K.J. Donham, E.A. Croteau, K.M. Kelly, J. Douwes, D. Lewis, M. Whitmer, I. Connaughton, S. Koch, P. Malmberg, B.-M. Larsson, J. Deddens, A. Saraf, L. Larsson, *J. Environ. Monit.*, 2005, **7**, 1371.
- [38] Z. Mielniczuk, E. Mielniczuk, L. Larsson, *J. Microbiol. Meth.*, 1993, **17**, 91.
- [39] A. Saraf, L. Larsson, *J. Mass Spect.*, 1996, **31**, 389.
- [40] B. Christensson, J. Gilbert, A. Fox, S.L. Morgan, *Arthritis Rheum.*, 1989, **32**, 1268.
- [41] M. Walters, D. Milton, L. Larsson, T. Ford, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 996.

- [42] Z. Mielniczuk, E. Mielniczuk, L. Larsson, Determination of bacterial endotoxin and peptidoglycan by GC/MS after a selective extraction procedure, Third, International Symposium Analytical Chemistry in Environmental Microbiology, March 12–16, 1995, Knoxville, Tennessee, USA.
- [43] K. Abel, H. deSchmertzling, J.I. Peterson, *J. Bacteriol.*, 1963, **85**, 1039.
- [44] D.B. Drucker, *Analysis of structural components of microorganisms by gas chromatography*, [w:] *Microbiological application of gas chromatography*, Cambridge University Press, Cambridge 1981.
- [45] P. Whittaker, F.S. Fry, S.K. Curtis, S.F. Al-Khaldi, M.M. Mossoba, M. Pete Yurawecz, V.C. Dunkel, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 3735.
- [46] N.M. Morris, E.A. Catalano, R.J. Berni, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1988, **49**, 81.
- [47] A. Sonesson, L. Larsson, A. Fox, G. Westerdaahl, G. Odham, *J. Chromatogr. Biomed. Applic.*, 1988, **431**, 1.
- [48] A. Sonesson, L. Larsson, A. Schutz, L. Hagmar, T. Hallberg, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**, 1271.
- [49] Y1 Li, S. Wu, L. Wang, Y. Li, F. Shi, X. Wang, *J. Sci. Food Agric.*, 2010, **90**, 1380.
- [50] H.-W. Wollenbenweber, E.Th. Rietschel, *J. Microbiol. Meth.*, 1990, **11**, 195.
- [51] S.K. Maitra, R. Nachum, F.C. Pearson, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, **52**, 510.
- [52] W. Gradowska, L. Larsson, *J. Microbiol. Meth.*, 1994, **20**, 55.
- [53] I. Mattsby-Baltzer, Z. Mielniczuk, L. Larsson, K. Lindgren, S. Goodwin, *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 4383.
- [54] S.G. Wilkinson, *Gram-negative bacteria* [w:] *Microbial lipids*, Vol. 1, (C. Ratledge, S.G. Wilkinson, Red.), Academic Press, London 1988, str. 299.
- [55] C.O. Thoen, A.G. Karlson, R.D. Ellefson, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1972, **24**, 1009.
- [56] E. Jantzen, K. Bryn, *Whole cell and lipopolysaccharide fatty acids and sugars of gram-negative bacteria*, [w:] *Chemical methods in bacterial systematics*, (M. Goodfellow, D.E. Minnikin, Red.), The Society for Applied Bacteriology Technical Series No. 20, Academic Press, London 1985.
- [57] S.L. Morgan, A. Fox, J. Gilbert, *J. Microbiol. Meth.*, 1989, **9**, 57.
- [58] A. Fox, J. Gilbert, S.L. Morgan, *Analytical microbiology: a perspective*, [w:] *Analytical microbiology methods. Chromatography and mass spectrometry*, (A. Fox, S.L. Morgan, L. Larsson, G. Odham Red.), Plenum Press, New York 1990, str. 1.
- [59] S. Alugupalli, F. Porataels, L. Larsson, *J. Bacter.*, 1994, **176**, 2962.
- [60] E. Jantzen, K. Bryn, *Analysis of cellular constituents from Gram-negative bacteria* [w:] *Chemical methods in prokaryotic systematics*, (M. Goodfellow, A.G. O'Donnell, Reds.), John Wiley & Sons, Chichester, 1994, 21.
- [61] G. Kawai, *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, **1001**, 185.
- [62] H. Spreitzer, G. Spiteller, *Monatsh. Chem.*, 1989, **120**, 1139.
- [63] B. Szponar, E. Norin, T. Midtvedt, L. Larsson, *J. Microbiol. Methods*, 2002, **50**, 283.
- [64] C. Hines, M. Waters, L. Larsson, M. Petersen, A. Saraf, D. Milton, *Indoor Air*, 2003, **13**, 166.
- [65] L. Larsson, *J. Environ. Monit.*, 2008, **10**, 301.
- [66] A. Nilsson, E. Kihlström, V. Lagesson, B. Wessén, B. Szponar, L. Larsson, C. Tagesson, *Indoor Air*, 2004, **14**, 74.
- [67] J. Park, B. Szponar, L. Larsson, D.R. Gold, D.K. Milton, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70**, 262.
- [68] D. Pomorska, L. Larsson, C. Skorska, J. Sitkowska, J. Dutkiewicz, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2007, **14**, 291.
- [69] A.A. Peterson, A.A., E.J. McGroarty, *J. Bacteriol.*, 1985, **162**, 738.
- [70] M. Rivera, L.E. Bryan, R.E. Hancock, E.J. McGroarty, *J. Bacteriol.*, 1980, **170**, 512.
- [71] Z. Mielniczuk, *Oznaczanie niektórych chemicznych markerów ścian komórkowych bakterii metodą chromatografii gazowej i spektrometrii mas*, Praca habilitacyjna, Warszawa, 1966.
- [72] R. Rylander, *Am. J. Indust. Med.*, 1987, **12**, 687.

- [73] R.M. Castellan, S.A. Olenchock, J.L. Hankinson, P.H. Millner, J.B. Cocke, C.K. Bragg, H.H. Perkins Jr., R.R. Jacobs, *Ann. Int. Med.*, 1984, **101**, 157.
- [74] S.A. Olenchock, J.J. May, D.S. Pratt, P.R. Morey, *Occupational exposures to airborne endotoxins in agriculture [w:] Detection of bacterial endotoxins with the Limulus Ameboctyte Lysate Test*, (S.W. Watson, J. Levin, T.J. Novitsky, Reds.) 1987, 475.
- [75] L. Larsson, *APMIS*, 1994, **102**, 161.
- [76] A. Kukis, *Handbook of lipid research*, Vol. 1. Fatty acids and glycerydes, (D.J. Hanahan Red.), Plenum Press, New York 1982, str. 1.
- [77] C. Galanos, O. Lüderitz, E.Th. Rietschel, O. Westphal, Galanos, *Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides, with special reference to their lipid A component*, [w:] *Biochemistry of lipids II. International review of biochemistry*, vol. 14, (T.W. Goodwin Red.), University Park Press, Baltimore 1977, str. 239.
- [78] *Microbial lipids*, (C. Ratledge, S.G. Wilkinson (Red.)), Vol. 1, Academic Press, London 1988.
- [79] H.-W. Wollenweber, E.Th. Rietschel, *J. Microb. Meth.*, 1990, **11**, 195.
- [80] Z. Mielniczuk, S. Alugupalli, E. Mielniczuk, L. Larsson, *J. Chromatogr.*, 1992, **623**, 115.
- [81] Z. Mielniczuk, E. Mielniczuk, L. Larsson, *J. Microbiol. Meth.*, 1993, **17**, 91.
- [82] S.K. Maitra, R. Nachum, F.C. Pearson, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, **52**, 510.
- [83] A. Sonesson, L. Larsson, G. Westerdahl, G. Odham, *J. Chromatogr.*, 1987, **417**, 11.
- [84] H. Oyaizu, K. Komagata, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1981, **27**, 57.
- [85] S. Alugupalli, F. Porataels, L. Larsson, *J. Bacter.*, 1994, **176**, 2962.
- [86] S.G. Wilkinson, *Gram-negative bacteria [w:] Microbial lipids*, Vol. 1, (C. Ratledge, S.G. Wilkinson, Red.), Academic Press, 1988, Jovanovich H.B., Publishers.
- [87] A. Sonesson, L. Larsson, A. Schutz, L. Hagmar, T. Hallberg, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**, 1271.
- [88] I. Mattsby-Baltzer, Z. Mielniczuk, L. Larsson, K. Lindgren, S. Goodwin, *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 4383.

Praca wpłynęła do Redakcji 18 stycznia 2016

