

# Spektroskopia w podczerwieni w ocenie modyfikacji powierzchniowych mikroorganizmów

Agata Zdarta, Izabela Gajewska, Wojciech Smulek, Ewa Kaczorek\*

Modyfikacje powierzchniowe mikroorganizmów są zmianami zachodzącymi na powierzchni komórek indukowanymi przez czynniki środowiskowe. Dzięki nim możliwa jest adaptacja drobnoustrojów do warunków otoczenia, która zapewnia im przetrwanie i efektywne wykorzystanie substratów metabolicznych. W przeprowadzonych analizach jako czynniki modyfikujące wykorzystano naturalne środki powierzchniowo czynne – saponiny. Surfaktanty te występują powszechnie w ekstraktach z różnych części roślin wyższych. W przedstawionych badaniach podjęto próbę oceny efektywności wykorzystania spektroskopii w podczerwieni w analizie modyfikacji właściwości powierzchniowych komórek mikroorganizmów zachodzących w wyniku dostępności określonych substratów w hodowli. Uzyskane wyniki potwierdzają, że spektroskopia FTIR może być stosowana jako metoda szybkiej i efektywnej identyfikacji zmian właściwości powierzchniowych bakterii.

## Wprowadzenie

Wszystkie organizmy żyjące w danym środowisku muszą się dostosować do zmian zachodzących na skutek zamierzonych, bądź przypadkowych, działań człowieka i wypadków oraz zmian klimatycznych. W ich wyniku nieustannej modyfikacji ulega skład pierwiastkowy, wilgotność, temperatura i inne parametry otoczenia. Mikroorganizmy bardzo szybko adoptują się do przemian zachodzących w otaczającym je środowisku, dostosowując swoje właściwości oraz metabolizm, aby zapewnić sobie przetrwanie. Komórkę bakterijną od środowiska zewnętrznego oddziela ściana komórkowa, która zbudowana jest z mureiny (peptydoglikanu). W przypadku bakterii Gram ujemnych warstwa mure-

iny jest cienka i dodatkowo otoczona błoną zewnętrzną. Składają się na nią przemienne ułożone reszty kwasu mureaminowego i glukozoaminy połączone wiązaniami  $\beta_{(1\rightarrow4)}$ -glikozydowymi. W mureinie wolna grupa karbonylowa jest akceptorem aminokwasu, najczęściej L-alaniny. Z mureiną mogą być związane również kwasy tejchojowe, lipotejchojowe oraz tejchuronowe [2, 3]. Do warstw zewnętrznych komórki należy również błona cytoplazmatyczna, która uczestniczy w pobieraniu pokarmu, umieszczone są w niej enzymy i przekaźniki elektronów czynne w procesach oddychania i magazynowania energii. Błona cytoplazmatyczna bakterii zbudowana jest z dwóch warstw fosfolipidowych. Ponadto zawiera białka, wśród których wyróż-

niamy białka integralne, przechodzące przez całą błonę oraz białka peryferyjne, które znajdują się na powierzchni błony. Aby zachować płynność błony cytoplazmatycznej w fosfolipidach występują również kwasy tłuszczowe nasycone i nienasycone [3]. Najbardziej zewnętrzną osłoną ściany komórkowej w przypadku niektórych mikroorganizmów jest warstwa substancji śluzowych. Tą tak zwaną otoczkę tworzą naturalne polimery wielocukrowe czy białkowe. Otoczki cechują się bardzo zróżnicowaną budową chemiczną, nawet w obrębie jednego gatunku bakterii. Najczęściej spotykanymi jednostkami strukturalnymi w otoczkach są monosacharydy takie jak np. D-galaktoza czy D-glukoza. Poza cukrami, ważnym składnikiem otoczek

jest fosforan, który stanowi łącznik fosfodiesterowy między cukrami. W środowisku możemy spotkać także bakterie, które wytwarzają otoczki składające się z aminokwasów [1,4].

Jedną z podstawowych funkcji wymienionych struktur zewnętrznych komórek jest ochrona organelli komórkowych przed niekorzystnymi zmianami środowiska oraz działaniem toksycznych substancji. Zarówno struktura, jak i proporcje między składnikami budulcowymi tych struktur, nie są niezmiennie i mogą być przez komórkę modyfikowane. Na zmianę właściwości powierzchniowych komórek istotny wpływ mają parametry fizykochemiczne środowiska zewnętrznego, jak odczyn środowiska czy stężenie soli. Bardzo wyraźna jest rola



temperatury, ponieważ przy jej wzroście rośnie udział nasyconych kwasów tłuszczowych komórek.

Kontakt z rozpuszczalnikami organicznymi czy surfaktantami może także wpływać na skład ściany i błony komórkowej. W rezultacie może nastąpić wzrost płynności błony komórkowej oraz zmniejszenie stosunku kwasów tłuszczowych nasyconych do nienasyconych. Ponadto oddziaływanie z takimi związkami prowadzi do modyfikacji powierzchni komórki, co przejawia się zwiększeniem lub zmniejszeniem udziału grup hydrofobowych obecnych na jej powierzchni [5].

Analiza wymienionych zmian może dostarczyć szeregu cennych informacji na temat

mechanizmów adaptacyjnych komórek. Wśród metod badania modyfikacji właściwości powierzchniowych komórek należy wymienić metody oceny hydrofobowości powierzchni komórek, jak np. bakteryjna adhezja do węglowodorów, chromatografia hydrofobowych oddziaływań czy pomiar potencjału dzeta. Osobną grupę analiz stanowi określenie profili komórkowych kwasów tłuszczowych, które wyznacza się poprzez przeprowadzenie kwasów w estry metylowe i ich analizę ilościową na chromatografie gazowym [5, 6].

Wymienione metody są stosunkowo czasochłonne lub charakteryzują się niską dokładnością. Metodą alternatywną, łączącą w sobie czu-

łość i prostotę analizy, może stać się spektroskopia w podczerwieni. Ponadto, tradycyjne różnicowanie bakterii poprzez posiewy wymaga kilkudniowej inkubacji hodowli, dlatego konieczne jest wykorzystanie alternatywnej, szybszej metody identyfikacji. Spektroskopia w podczerwieni była wielokrotnie demonstrowana przez liczne zespoły badawcze jako jedna z metod identyfikacji i klasyfikacji materiału biologicznego [7]. Technika ta odznacza się wysoką czułością, małą inwazyjnością w komórkę oraz możliwością analizy stosunkowo niewielkich próbek [8].

Dzięki spektroskopii w podczerwieni możliwa jest identyfikacja grup funkcyjnych obecnych na powierzchni ko-

mórki, co pozwala stworzyć unikatowy i powtarzalny model widma charakterystycznego dla określonego typu komórek [7-9]. Duże znaczenia ma także minimalne przygotowanie materiału do badania, pozwalające ograniczyć inwazyjność w strukturę komórki. Metoda ta umożliwia także pełną automatyzację analizy, nie niszczy struktury badanej materii, daje pomiar zarówno jakościowy, jak i ilościowy oraz pozwala na szybkie uzyskanie kompletnych wyników. Biorąc pod uwagę względy ekonomiczne i skalę prowadzonych badań nie bez znaczenia pozostają też niskie koszty związane z metodą [7]. Analiza w zakresie podczerwieni była wykorzystywana dotychczas do identyfikacji



#### AKREDYTOWANE LABORATORIUM WZORCUJĄCE

przez Polskie Centrum Akredytacji, sygnatariusza porozumień EA MLA i ILAC MRA dotyczących wzajemnego uznawania świadectw wzorcowania.



#### — O NAS

Nasze laboratorium oferuje materiały odniesienia oraz wzorcowanie (kalibrację) przyrządów w zakresie pomiarów konduktometrycznych, lepkości, gęstości, temperatury, wilgotności, pH i analizatorów wydechu.

Posiadamy Certyfikat Akredytacji Laboratorium Wzorcującego nr AP 021 wg normy PN-EN ISO/IEC 17025:2005 wydany przez Polskie Centrum Akredytacji.



#### — WZORCUJEMY

- komory klimatyczne i termostatyczne
- konduktometry i czujniki konduktometryczne
- pehametry i elektrody pH
- termometry szklane
- termometry elektryczne (elektroniczne)
- analizatory wydechu (alkotesty)
- wiskozymetry
- piknometry
- termohigrometry i psychrometry

#### — WYTWARZAMY

- wzorce konduktometryczne
- wzorce pH
- wzorce lepkości (wiskozymetryczne)

#### — ROZSZERZYLIŚMY ZAKRES AKREDYTACJI:

- wzorce redoks
- wzorcowanie elektrod redoks
- wzorcowanie termostatów cieczowych
- wzorcowanie pieców



#### — DANE KONTAKTOWE

**LabStand P.P.U.**  
ul. Grunwaldzka 114  
60-308 Poznań

tel. +48 61 867 28 47  
fax +48 61 662 02 61

www.labstand.com.pl  
labstand@labstand.com.pl



Aby przejść bezpośrednio na naszą stronę zeskanuj kod QR

i charakterystyki mikroorganizmów, grzybów, drożdży, spor i prionów.

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano surfaktanty pochodzenia roślinnego jako jedyne źródło węgla w hodowli. Te glikozydy posiadające zdolność redukcji napięcia powierzchniowego są obecne w roślinach takich jak mydlnica lekarska (*Saponaria officinalis* L.), orzechy piorące (*Sapindus mukorossi*) czy bluszcz pospolity (*Hedera helix*) [10]. Saponiny, będące głównym składnikiem tych ekstraktów znajdują szerokie zastosowanie w farmacji i medycynie [11], wykazują także duży potencjał jako środki wspomagające bioremediację terenów zanieczyszczonych substancjami hydrofobowymi [12]. Celem prowadzonych badań była ocena wpływu surfaktantów pochodzenia roślinnego na właściwości powierzchniowe komórek mikroorganizmów za pomocą spektroskopii w podczerwieni.

### Materiały i metody

Materiałem do badań były mikroorganizmy wyizolowane z próbek gleby pobranej z terenów wysoce narażonych na skażenie substancjami pochodzenia petrochemicznego. Bakterie zostały poddane charakterystyce biochemicznej (VITEK®, bioMérieux, Francja) i zidentyfikowane jako *Pseudomonas fluorescens* oraz *Acinetobacter genomospecies*. Ekstrakcję saponin z materiału roślinnego prowadzono w aparacie Soxhleta przez 8 h, jako rozpuszczalnik zastosowano metanol w proporcji 10 ml na 5 g próbki. Po za-

kończeniu ekstrakcji rozpuszczalnik odparowano na wyparce próżniowej Rotavapor R-210 (Büchi, Niemcy). W celu określenia krytycznego stężenia micelizacji uzyskanych ekstraktów przeprowadzono szereg analiz napięcia powierzchniowego badanych roztworów w rozcieńczeniach w zakresie 0,001 ÷ 3 g/l. Na podstawie wyników wyznaczono krytyczne stężenia micelizacji, które dla orzechów *Sapindus mukorossi* wyniosło 0,1 g/l; dla mydlnicy (*Saponaria officinalis*) 1 g/l; dla bluszcza (*Hedera helix*) 2,5 g/l.

Aby określić wpływ surfaktantów na właściwości powierzchniowe mikroorganizmów, wyizolowane pojedyncze szczepy zostały namnożone w 50 ml hodowli płynnej, skład której został opisany przez Smulek i in. [13]. Jako jedyne źródło węgla w hodowlach stosowano otrzymane ekstrakty roślinne w ilości pozwalającej na uzyskanie w hodowli stężenia surfaktantu równego 2 CMC. Hodowle prowadzono w szklanych zakręcanych butelkach o pojemności 250 ml, pozostawiając wystarczającą ilość powietrza w fazie nadpowierzchniowej i inkubowano w temperaturze 30°C przez 3 miesiące. Mikroorganizmy były przesiewane na świeże podłoże o takim samym składzie co 14 dni, w celu zapewnienia odpowiedniego stężenia substratów w hodowli. Po zakończeniu 3-miesięcznego okresu hodowli, komórki odwirowano w temperaturze pokojowej i trzykrotnie przepłukano świeżą porcją medium. Po ostatnim wirowaniu usunięto supernatant i pod-

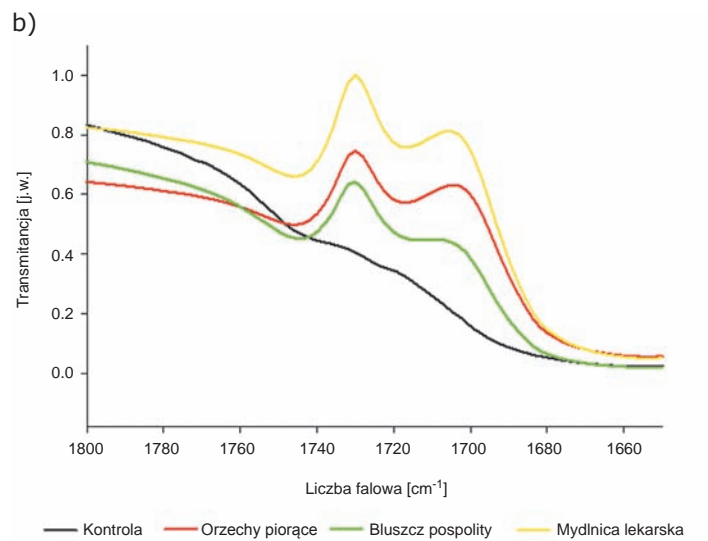
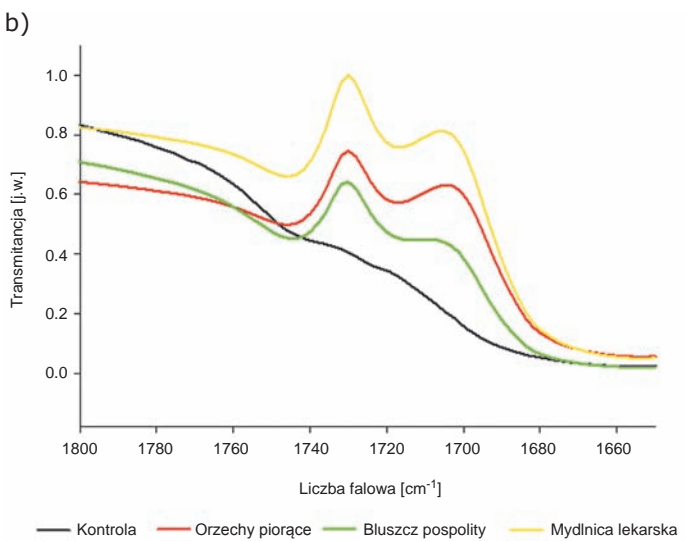
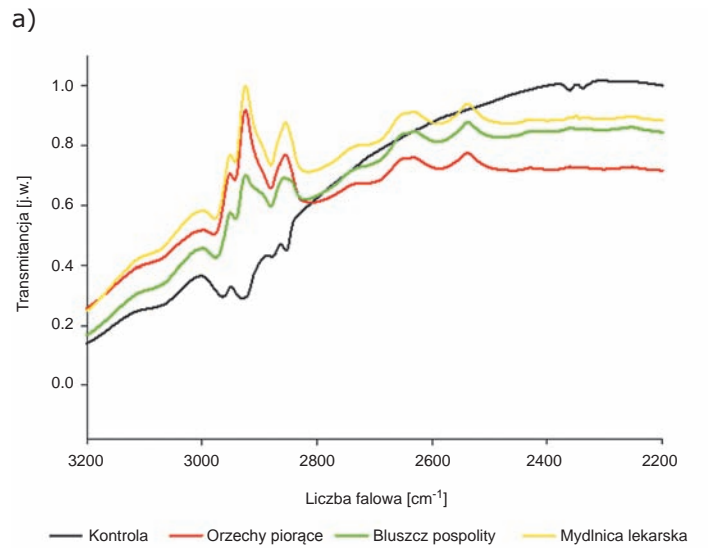
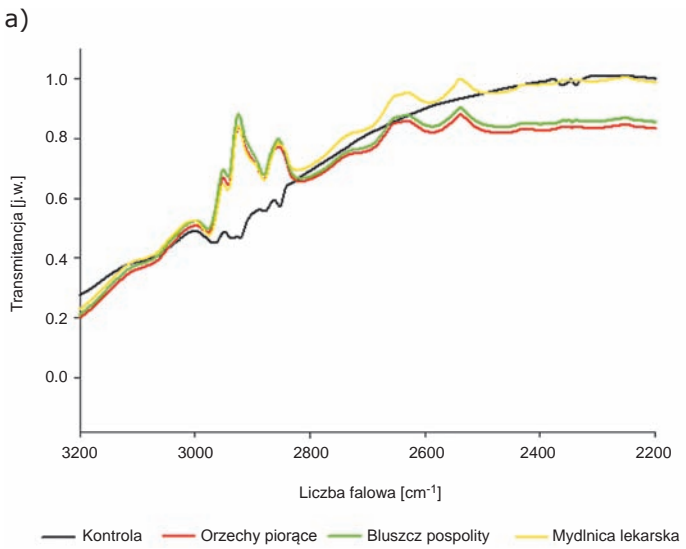
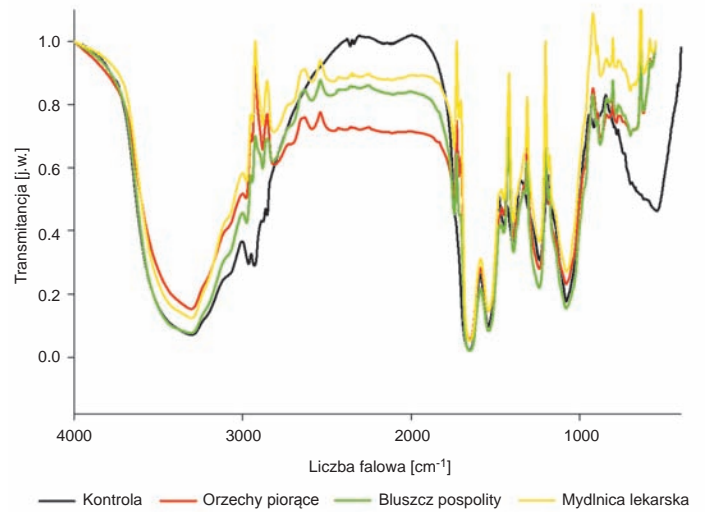
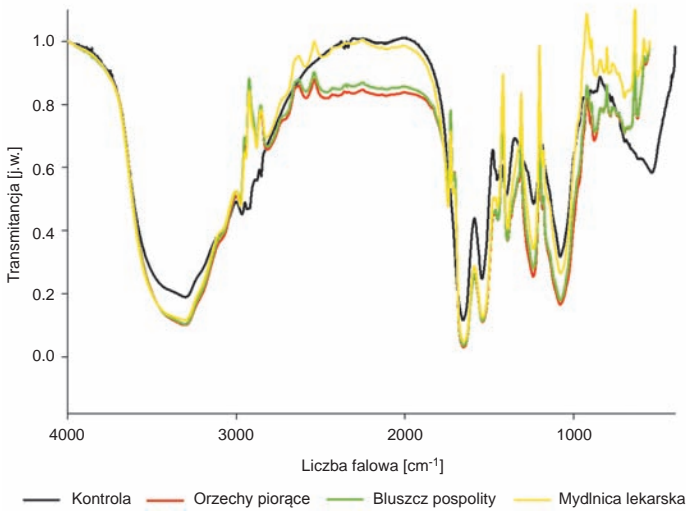
dano próbki liofilizacji na liofilizatorze Alpha 1.2 LD plus 1.2 (Christ), czas trwania procesu wynosił 48 h, temperatura -30°C, ciśnienie 0,37 mbar. Z uzyskanych odwodnionych komórek wykonano pastylkę mieszając 200 mg KBr z 2 mg próbki. Analizę wykonywano na aparacie Vertex 70 (Bruker, Niemcy). Ponadto modyfikację powierzchni mikroorganizmów w testowanych układach oceniano poprzez pomiar hydrofobowości powierzchni komórek wykorzystując zmodyfikowaną metodę mikrobiologicznej adhezji do węglowodorów (MATH) [14]. Wyniki poddano obróbce statystycznej w programie Statistica 12.0.

### Wyniki

Spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) wykorzystano do określenia rodzaju grup funkcyjnych znajdujących się na powierzchni badanych mikroorganizmów po hodowli ze standardowym źródłem węgla (glukoza) lub ekstraktem z wybranych roślin zawierającym saponiny. Wyniki analizy FTIR zaprezentowano na załączonych rysunkach 1 i 2. Przedstawione widma wykazują obecność sygnałów świadczących o modyfikacjach powierzchniowych zachodzących w komórkach na skutek oddziaływania różnych źródeł węgla. Różnice w odniesieniu do próby kontrolnej (hodowla na glukozie) odnotowano dla obu badanych szczepów. Zmiany te najbardziej widoczne są przy liczbie falowej ok. 2920 cm<sup>-1</sup> oraz 1730 cm<sup>-1</sup>. Przy liczbie

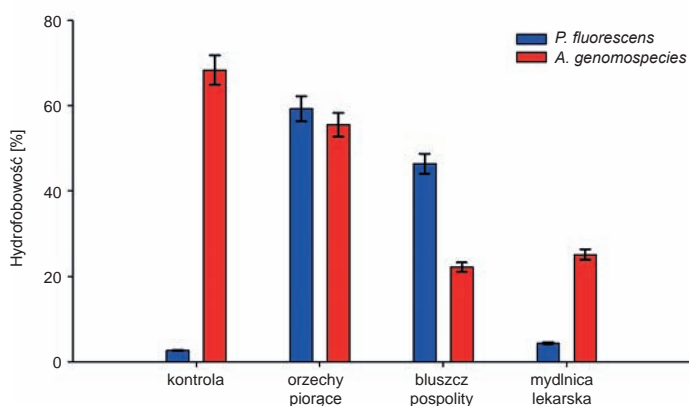
falowej 2921 cm<sup>-1</sup> obecne są charakterystyczne drgania rozciągające wiązań C-H, pochodzące od związków alifatycznych wchodzących w skład kwasów tłuszczowych ściany komórkowej. Występują one w hodowlach kontrolnych obu szczepów. Jednakże nie są obecne we wszystkich próbkach z hodowli na surfaktantach roślinnych dla szczepu *P. fluorescens*. Drgań tych nie obserwuje się również w przypadku szczepu *A. genomospecies* hodowanego na bluszczu. Ponadto, we wszystkich układach z ekstraktami zaobserwowano pojawienie się przy długości fali 1730 cm<sup>-1</sup> pasm pochodzących od dodatkowych drgań rozciągających grup C=O. Zmiany są obecne we wszystkich próbkach z ekstraktami roślinnymi, niezależnie od rodzaju szczepu.

Analiza hydrofobowości powierzchni komórek z wykorzystaniem metody MATH wykazała także wpływ testowanych surfaktantów na modyfikację właściwości powierzchniowych badanych szczepów bakteryjnych. W przypadku *A. genomospecies* zaobserwowano spadek, natomiast w przypadku *P. fluorescens* wzrost hydrofobowości powierzchni komórek. Największe zmiany komórki szczepu *A. genomospecies* wykazały podczas hodowli na podłożu z dodatkiem bluszcza pospolitego lub mydlnicy lekarskiej. Dla szczepu *P. fluorescens* największy wzrost hydrofobowości zaobserwowano podczas hodowli na podłożu z dodatkiem orzechów piorących oraz bluszczu pospolitego.



Rys. 1. Widma w podczerwieni w zakresie  $4000 \div 400 \text{ cm}^{-1}$  dla szczepu *Acinetobacter genospecies* po 3 miesiącach wzrostu na surfaktantach roślinnych, jako jedynym źródle węgla; kontrolę stanowiła hodowla na glukozie: a) zakres  $3200 \div 2200 \text{ cm}^{-1}$  b)  $1800 \div 1650 \text{ cm}^{-1}$

Rys. 2. Widma w podczerwieni w zakresie  $4000 \div 400 \text{ cm}^{-1}$  dla szczepu *Pseudomonas fluorescens* po 3 miesiącach wzrostu na surfaktantach roślinnych, jako jedynym źródle węgla; kontrolę stanowiła hodowla na glukozie: a) zakres  $3200 \div 2200 \text{ cm}^{-1}$  b)  $1800 \div 1650 \text{ cm}^{-1}$



Rys. 3. Wpływ surfaktantów pochodzenia roślinnego na hydrofobowość powierzchni komórek szczepów *Acinetobacter genomospecies* i *Pseudomonas fluorescens*

Jak zauważyli Zhong i in. [15] w badaniach poświęconych *P. aeruginosa*, wpływ surfaktantu obecnego w hodowli na parametry komórek mikroorganizmów, zależy od jego adsorpcji na powierzchni bakterii. Analizowane przez nich mono- i di-ramnolipidy powodowały zmianę stopnia hydrofobowości komórek zarówno w stronę właściwości bardziej hydrofobowych, jak również bardziej hydrofilowych w zależności od struktury surfaktantu oraz typu komórek mikroorganizmów, co warunkowało ich adsorpcję na powierzchni komórek bakterii. W przypadku badanych surfaktantów wyraźnie widoczna jest zależność oddziaływania komórek mikroorganizmów z poszczególnymi surfaktantami w zależności od ich budowy oraz rodzaju szczepu.

#### Podsumowanie

Porównując wyniki badań z danymi literaturowymi [7-9]

można potwierdzić przydatność spektroskopii FTIR jako jednej z czołowych metod w różnicowaniu struktury powierzchni mikroorganizmów. W obszarach opisywanych w literaturze jako charakterystyczne dla zmian właściwości powierzchniowych mikroorganizmów [8] zarejestrowano sygnały świadczące o zachodzących na ich powierzchni modyfikacjach. Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że powierzchnię szczepu *P. fluorescens* najsilniej modyfikuje dodatek orzechów piorących i mydlnicy lekarskiej, natomiast w przypadku szczepu *A. genomospecies* największe modyfikacje uzyskano na podłożu z dodatkiem bluszczu pospolitego. Zastosowana technika gwarantuje szybkość i nieinwazyjność pomiaru, dlatego może być efektywnie stosowana jako metoda różnicująca mikroorganizmy w za-

leżności od ich właściwości powierzchniowych.

#### Literatura

- [1] Baj J., Markiewicz Z., (red.) *Biologia molekularna bakterii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.
- [2] Kunicki-Goldfinger W.J.H., *Życie bakterii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
- [3] Salyers A.A., Whitt D.D., *Mikrobiologia. Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
- [4] Nicklin J., Graeme-Cook K., Killington R., *Mikrobiologia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.
- [5] Mroziak A., *Zmiany w składzie bakteryjnych kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w glebie* Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, Katowice 2009.
- [6] Van der Mei H.C., Van de Belt-Gritter B., Busscher H.J., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 5 (1995) 117–126.
- [7] Mularczyk-Oliwa M., Kwaśny M., Włodarski M., Kaliszewski M., *Biuletyn WAT*, 58 (2008) 239–257.
- [8] Maity J.P., Kar S., Lin C-M., Chen C-Y., Chang Y-F., Jean J-S., Kulp R.T., *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 116 (2013) 478–484.
- [9] Corte L., Tiecco M., Roscini L., Germani R., Cardinali G., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 116 (2014) 761–771.
- [10] Sparg S.G., Light M.E.,

van Staden J., *Journal of Ethnopharmacology* 94 (2004) 219–243.

- [11] Krasowska A., *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 64 (2010) 310–313.
- [12] Bustamante M., Durán N., Diez M.C., *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 12 (2012) 667–687.
- [13] Smulek W., Zdarta A., Guzik U., Dudzińska-Bajorek B., Kaczorek E., *Microbiological Research* 176 (2015) 38–47.
- [14] Górna H., Ławniczak Ł., Zgoła-Grzeškowiak A., Kaczorek E., 2011. *Bioresource Technology* 32, 3028–3033.
- [15] Zhong H., Zeng G.M., Liu J.X., Xu X.M., Yuan X.Z., Fu H.Y., Huang G.H., Liu Z.F., Ding Y., *Applied of Microbiology and Biotechnology* 79 (2008) 671–677.

#### Podziękowania

Badania zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2012/07/B/NZ9/00950.

Temat przedstawiony w artykule był prezentowany podczas sympozjum „Nauka i przemysł – metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości” (Lublin 2016). Jest również opublikowany w monografii pod tym samym tytułem.

\* Politechnika Poznańska, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Zakład Chemii Organicznej, e-mail: ewa.kaczorek@put.poznan.pl