

**WPŁYW HETEROGENICZNOŚCI POWIERZCHNI
BIOKOŁOIDÓW NA ICH ROZDZIELANIE
ELEKTROFORETYCZNE**

**INFLUENCE OF HETEROGENEITY BIOCOLLOIDS
SURFACE ON THEIR ELECTROPHORETIC
SEPARATION**

Bogusław Buszewski*, Paweł Pomastowski

*Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki
Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń
e-mail: bbusz@chem.umk.pl

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głęba,
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Morfologia i budowa komórek mikroorganizmów

1.1. Techniki instrumentalne w oznaczaniu aktywnych grup funkcyjnych mikroorganizmów

2. Fizykochemia powierzchni biokolooidów

2.1. Podwójna warstwa elektryczna

2.2. Potencjał zeta

2.3 Zastosowanie teorii DLVO do opisu zjawiska agregacji i adhezji biokolooidów

3. Techniki elektromigracyjne w oznaczaniu biokolooidów

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Prof. dr hab. Bogusław Buszewski ukończył studia na Wydziale Matematyki-Fizyki-Chemii Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej (UMCS) w Lublinie. W 1986 otrzymał tytuł doktora na Wydziale Technologii Chemicznej Słowackiego Uniwersytetu Technicznego w Bratysławie, Czechosłowacji. W 1992 uzyskał tytuł doktora habilitowanego a w 1994 został profesorem UMK. W 1999 otrzymał tytuł profesora chemii, a w 2000 r. stanowisko profesora zwyczajnego. Od 1994 roku zaczął organizować grupę badawczą na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika (UMK) i został kierownikiem Zakładu Chemii Środowiska i Ekoanalitiky, który w 2006 roku przekształcony został w Katedrę Chemii Środowiska i Bioanalitiky. Do chwili obecnej piastuje to stanowisko. Od 2010 jest kierownikiem Centrum Edukacyjno-Badawczego Metod Separacyjnych i Biomedycznych BioSep. Prof. Buszewski był stypendystą Fundacji Alexandra Humboldta na Uniwersytecie w Tübingen (Niemcy) oraz profesorem wizytującym na kilku uniwersytetach w: USA, Japonii, UK, Republice Południowej Afryki, Holandii, Austrii, Chinach, na Tajwanie jak również na wielu innych uniwersytetach w Europie. Ponadto jest prezesem Polskiego Towarzystwa Chemicznego (PTChem) (2009–2014), wiceprzewodniczącym Komitetu Chemii Analitycznej PAN, członkiem koresp. Austriackiej Akademii Nauk, członkiem rad wydawniczych 26 krajowych i zagranicznych czasopism naukowych i autorem albo współautorem 15 książek, licznych patentów (większość z nich zostało już wdrożonych), wykładów i ponad 350 artykułów naukowych. Jest jednym z najczęściej cytowanych chemików w Polsce (ponad 6000 cytowań) (h ponad 38). Prof. B. Buszewski był prezesem European Society for Separation Science (EuSSS) (2010–2014), prezesem Societas Humboldtiana Polonorum (2007–2013), członkiem prezydium w Division of Environmental Chemistry of the European Association for Chemical and Molecular Science (EuCheMS). Prof. B. Buszewski jest laureatem licznych nagród i wyróżnień zarówno krajowych jak i zagranicznych organizacji (wliczając tytuły doktora honoris causa). Główne zainteresowania naukowe: analiza środowiskowa i biomedyczna, chromatografia i techniki pokrewne teoria i zastosowania (HPLC, SPE, GC, CZE, adsorpcja, przygotowanie próbek), spektroskopia, utylizacja odpadów i ścieków, chemometria. Analityka i monitoring chemiczny i biologiczny, jakościowe i ilościowe oznaczanie substancji toksycznych i ksenobiotyków organicznych i nieorganicznych w różnych matrycach. Biomarkery i techniki wczesnego wykrywania chorób nowotworowych. Biokumulacja i specjacja. Analityka: produktów żywnościowych, farmaceutyczna, medyczna-kliniczna, biochemiczna, proteomika i metabolomika z wykorzystaniem najnowszych technik instrumentalnych w warunkach stacjonarnych i terenowych.

Mgr Paweł Pomastowski urodził się w 1988 r. w Toruniu. Jest absolwentem toruńskiego Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, a także doktorantem Wydziału Chemii UMK. Realizuje pracę doktorską pod kierunkiem prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego. Aktywnie uczestniczy w życiu społeczno-naukowym Uniwersytetu. Wyniki swoich prac opublikował w czasopiśmie polskich, międzynarodowych znajdujących się na „liście filadelfijskiej” oraz na konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym. Do jego zainteresowań badawczych należą fizykochemia powierzchni biokoloidów, poszukiwanie nowych substancji – efektywnie wspierających antybiotykoterapię oraz badania wykorzystujące techniki elektroforetyczne sprzężone ze spektrometrią mas.

ABSTRACT

Electrical properties of biocolloids, due to the unique structure and properties of the walls and cell membranes are altered by ions present in the environment. This change in the surface properties of bacterial cells has a major impact on the effects of cell-cell or cell-surface during the formation of aggregates or biofilm. Each microorganism has a complex and characteristic cell wall composition, which surface charge originates from the ionization of carboxyl, phosphate or amino groups and the adsorption of ions from solution. Consequently, the charged cell wall groups determine the spontaneous formation of the electrical double layer (EDL). The properties of the EDL affect the behavior of biocolloid including cell-to-cell and cell-to-capillary surface interactions. In addition, the inner wall surface of capillary groups (modified and/or unmodified) interact with the solvent and the analyte. Biocolloids effect of aggregation and adhesion to the surface of the capillary is unfavorable phenomenon occurring during the electrophoretic separation. These phenomena are highly correlated with the acid-base properties of the bacterial cells. Interactions between molecules are unstable, hence the analytes adsorbed on the surface concerned can be removed using a variety of solvents or physico-chemical and mechanical factors. However, when the bacterial cells are in close proximity to the charged surface of the capillary may be subject to specific and non-specific short-range interactions, which are characterized by high stability.

It has been shown the characteristics of the microbial surface in order to determine their role in adhesion and aggregation phenomena during the electrophoretic separation.

The use of experimental techniques, including instrumental, electrochemical and electrophoretic allowed the description of the relationship between the acid-base properties of pathogens and their behavior.

The review summarizes the research on biocolloids which are helpful in understanding the interactions that occur during electrophoretic analysis.

Keywords: biocolloids, electric double layer, zeta potential, capillary zone electrophoresis

Słowa kluczowe: biokoloidy, warstwa dielektryczna, potencjał zeta, strefowa elektroforeza kapilarna

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

C	– czynnik elektrostatyczny Coulomba
CEC	– elektrochromatografia (ang. <i>electrochromatography</i>)
CWPs	– białka związane kowalencyjnie z polisacharydami ściany komórkowej drożdży (ang. <i>cell-wall proteins</i>)
CZE	– kapilarna elektroforeza strefowa (ang. <i>capillary zone electrophoresis</i>)
DCBT	– teoria mostków kationów dwuwartościowych (ang. <i>divalent cation bridging theory</i>)
DLVO	– teoria Derjagin, Landau, Vervej i Overbeek
EDL	– podwójna warstwa elektryczna (ang. <i>electrical double layer</i>)
EOF	– przepływ elektroosmotyczny (ang. <i>electroosmotic flow</i>)
FA	– siła przyciągania (ang. <i>attraction</i>)
FTIR	– furierowska spektroskopia w podczerwieni (ang. <i>fourier transform infrared spectroscopy</i>)
FR	– siła odpychania (ang. <i>repulsion</i>)
FVdW	– siły van der Waalsa (ang. <i>forces of Van der Waals</i>)
GPI-CWPs	– białka glikolipidowe (ang. <i>glycosylphosphatidylinositol</i>)
IHP	– wewnętrzna warstwa Sterna-Helmholtzta (ang. <i>inner Helmholtz plane</i>)
ITP	– izotachoforeza (ang. <i>isotachaphoresis</i>)
K	– katoda
K _d	– stała równowagi deprotonacji
K _p	– stała równowagi protonacji
K _r	– rzeczywista stała równowagowa
LOD	– granica wykrywalności (ang. <i>limit of detection</i>)
NMR	– spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
OHP	– zewnętrzna warstwa Sterna-Helmholtzta (ang. <i>outer Helmholtz plane</i>)
PEO	– poli(tlenku etylenu), glikol polietylenowy
pI	– punkt izoelektryczny
Pir-CWPs	– podgrupa CWPs (ang. <i>protein with internal repeats</i>)
PWE	– podwójna warstwa elektryczna
SCM	– model SCM (ang. <i>surface complexation model</i>)
SEM	– skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. <i>scanning electron microscopy</i>)
TBE	– bufor (TRIS, kwas borowy, EDTA)
TEM	– elektronowa mikroskopia transmisyjna (ang. <i>transmission electron microscopy</i>)

TMV	- wirus mozaiki tytoniowej (ang. <i>tobacco mosaic virus</i>)
VdW	- van der Waals
XDLVO	- rozszerzona teoria DLVO (ang. <i>extend DLVO</i>)
XPS	- spektroskopia fotoelektronów (ang. <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>)
μ	- ruchliwość elektroforetyczna
μ_{eo}	- ruchliwość elektroosmotyczna

WPROWADZENIE

Większość mikroorganizmów to gatunki chorobotwórcze dla ludzi, zwierząt. Współczesna analiza mikrobiologiczna w szpitalach, ośrodkach medycznych opiera się na czasochłonnych metodach posiewowych, dzięki którym możliwe jest wykonanie niezbędnych antybiogramów. Istnieją laboratoria diagnostyki mikrobiologicznej, które do identyfikacji chorobotwórczych grzybów wykorzystują drogie techniki biologii molekularnej. Alternatywą dla czasochłonnych i kosztownych metod identyfikacji mikroorganizmów może się stać tania i szybka analiza elektromigracyjna mikroorganizmów z zastosowaniem kapilarnej elektroforezy strefowej.

Charakterystyka powierzchni mikroorganizmów pod kątem fizykochemicznym, przy wykorzystaniu instrumentarium analitycznego niezbędna jest do zrozumienia, dotychczas niejasnego, zachowania się ich podczas oznaczeń elektroforetycznych i wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za ten proces.

Komórki mikroorganizmów, traktowane jako biokoloidey, charakteryzują się złożoną topografią powierzchni oraz heterogennym rozmieszczeniem ładunku elektrycznego. Znajomość powierzchniowego ładunku biokoloidu, identyfikacja powierzchniowych grup funkcyjnych odpowiedzialnych za agregację, adhezję czy wiązanie metali oraz wyznaczenie ich udziału pozwala przewidzieć warunki separacji elektroforetycznej.

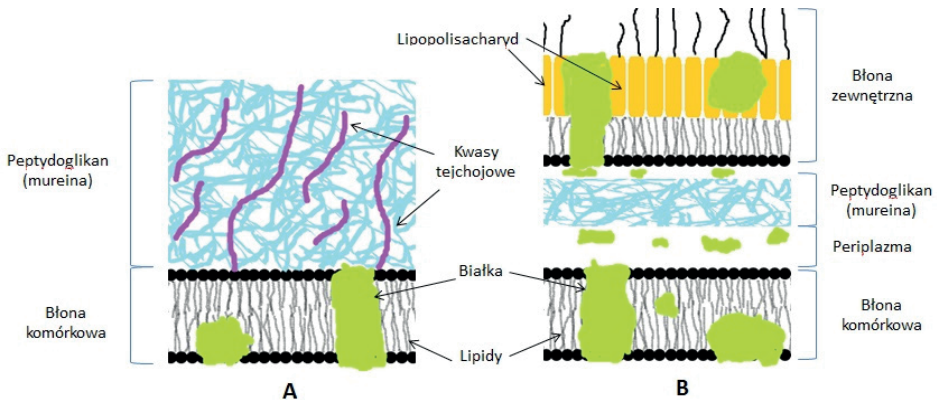
Ewolucja poglądów na temat budowy podwójnej warstwy elektrycznej układów koloidalnych czy/lub biokoloidalnych, pokazuje złożoność problemu jakim jest rozkład powierzchniowego ładunku elektrycznego. Charakteryzowany on jest przez parametr fizykochemiczny – potencjał zeta. W poniższych rozdziałach zdefiniowano jego rolę, znacznie i udział w zjawiskach powierzchniowych, jakim ulegają biokoloidey. Ponadto, scharakteryzowano najczęściej stosowane modele teoretyczne opisujące zjawiska agregacji i adhezji.

Niniejsza praca ukazuje relacje pomiędzy heterogenicznością powierzchni, ładunkiem elektrycznym biokoloidu, a zachowaniem badanego mikroorganizmu podczas analizy elektroforetycznej.

1. MORFOLOGIA I BUDOWA KOMÓREK MIKROORGANIZMÓW

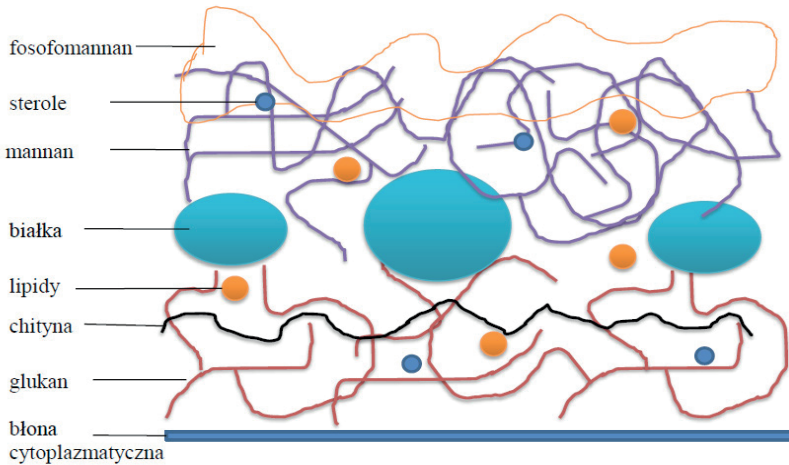
Ściana komórkowa jest stosunkowo sztywną barierą oddzielającą komórkę od środowiska zewnętrznego. W związku z tym, chroni komórkę mikroorganizmu przed uszkodzeniem mechanicznym, utrzymuje prawidłowy kształt i turgor komórki oraz uniemożliwia przedostanie się zbyt dużych cząsteczek do wnętrza komórki [1]. Komórka bakteryjna otoczona jest błoną oraz ścianą komórkową. Ściana bakterii Gram-dodatnich składa się w 90% z wielu warstw peptydoglikanu (mureiny), do którego przyłączone są kwasy tejchojowe, zbudowane z polimerów glicerolu bądź rybitolu, połączonych wiązaniem fosfodiesterowym ujemnym. Pod względem chemicznym mureina jest polimerem zbudowanym z powtarzających

się jednostek utworzonych z *N*-acetyloglukozoaminy oraz kwasu *N*-acetylomuraminowego, połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym [2]. Do każdej cząsteczki przyłączone są krótkie boczne łańcuchy peptydowe, które mogą być sieciowane między sobą poprzecznymi mostkami peptydowymi. W skład ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich wchodzi dodatkowo białka i/lub lipidy. U bakterii Gram-ujemnych bezpośrednio przy błonie komórkowej znajduje się przestrzeń periplazmatyczna, nad którą mieści się pojedyncza warstwa peptydoglikanu zbudowanego z mureiny, stanowiąca ok 10 - 20% materiału ściany komórkowej. Nad nią znajduje się lipidowo – białkowa błona zewnętrzna, której wewnętrzną warstwę stanowią fosfolipidy natomiast zewnętrzną - cząsteczki lipopolisacharydu (LPS), który nadaje komórce ładunek ujemny. LPS zbudowany jest z trzech składników: lipidu A, wielocukru rdzeniowego i O-swoistego łańcucha cukrowego. Błona zewnętrzna nie zawiera kwasów teichojowych i jest w niewielkim stopniu przepuszczalna dla substancji o charakterze hydrofilowym. Dyfuzja substancji do wnętrza komórki zachodzi poprzez specjalne białka zwane porynami [3,4]. Różnice w budowie ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych przedstawia Rysunek 1.



Rysunek 1. Model budowy ściany bakterii: A. Gram-dodatniej; B. Gram-ujemnej
Figure 1. Model of bacteria walls: A. Gram-positive; B. Gram-negative

W przypadku drożdżaków w skład ściany komórkowej wchodzi polisacharydy (około 70–80%), białka (około 10%), lipidy (8–9%) oraz sterole – ergosterol oraz dehydroergosterol (1–2%). Glukany połączone są wiązaniem β -1,3- oraz β -1,6-glikozydowym. W chitynie występuje połączenie β -1,4-glikozydowe, zaś w mannanie α -1,4-glikozydowe. Rozgałęziona struktura glukanów determinuje mechaniczną wytrzymałość ściany komórkowej. Procesy syntezy i degradacji β -1,3-glukanu i β -1,6-glukanu skorelowane są bezpośrednio z procesami rozbudowy i rozpadu całej ściany komórkowej drożdży [5, 6]. Dodatkowo obecność mannanów oraz glukanów powoduje stabilizację enzymów hydrolitycznych wytwarzanych przez komórkę (Rys. 2).



Rysunek 2. Model warstwowy ściany komórkowej drożdży
 Figure 2. Model layered of yeast cell wall

Białka ściany komórkowej związane z danym polisacharydem można podzielić na kilka grup. Pierwszą grupę stanowią białka połączone niekowalencyjnie z polisacharydem. Łączą się one przeważnie z mannanem (mannoproteiny). Kolejną grupę stanowią białka połączone kowalencyjnie odpowiednio z β -1,3-glukanem i/lub β -1,6-glukanem. Białka związane kowalencyjnie określane się mianem – CWP (ang. *cell-wall proteins*). Białka te zostały podzielone na dwie podgrupy: Pir – CWP (ang. *Protein with internal repeats*), które łączą się z mniej rozgałęzionym glukanem (β -1,3-glukan) oraz białka glikolipidowe – GPI-CWP (ang. *Glycosylphosphatidylinositol*) łączące się z β -1,6-glukanem, związanym z β -1,3-glukanem i/lub chityną. Ostatnią grupę stanowią białka połączone z polisacharydami mostkami dwusiarczkowymi [7–10].

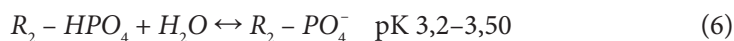
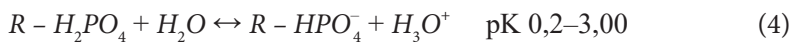
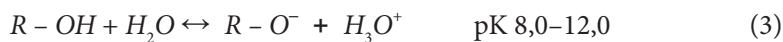
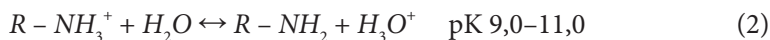
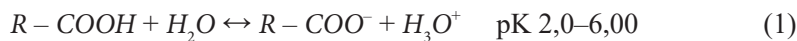
Powierzchniowe komponenty komórek mikroorganizmów rozpatruje się jako układy zbudowane z rdzenia oraz danej powierzchniowej grupy funkcyjnej. Dla wszystkich polisacharydów zakłada się, iż rdzeniem jest heksagonalny pierścień węglowy. W przypadku fosfomananu wyróżnia się: powierzchniową grupę hydroksylową ($-\text{OH}$) oraz (di)wodorofosforanową ($-\text{H}_2\text{PO}_4^- / -\text{HPO}_4^{2-}$).

Tabela 1. Komponenty powierzchniowe komórek mikroorganizmów i odpowiadające im powierzchniowe grupy funkcyjne

Table 1. Surface components of microbial cells and the corresponding surface functional groups

Komponent ściany/błony komórkowej	Powierzchniowe grupy funkcyjne
Mannan	-OH
Peptydoglikan	-OH, $H_2PO_4^-$ / $-HPO_4^{2-}$, $-NH_2$,
Glukan	-OH
Fosfomannan	-OH, $H_2PO_4^-$ / $-HPO_4^{2-}$
Chityna	-OH, $-NH-$ / $-NH_2^+$, $-CO-$
Lipidy	$-COOH$, $-C=C-$
Sterole	$-C=C-$, $-OH$
Białka	$-OH$, $-NH-$ / $-NH_2^+$, $-CO-$, $-COOH$, $H_2PO_4^-$ / $-HPO_4^{2-}$, $-SH$, $-SO_3^{2-}$, $-NH_2$

Danemu składnikowi ściany komórkowej odpowiadają charakterystyczne mu powierzchniowe grupy funkcyjne (Tab. 1), które ulegają na powierzchni mikroorganizmu reakcjom protonacji oraz deprotonacji nadając tym samym powierzchniowy ładunek elektryczny.



1.1. TECHNIKI INSTRUMENTALNE W OZNACZANIU AKTYWNYCH GRUP FUNKCYJNYCH MIKROORGANIZMÓW

Powierzchniowe grupy funkcyjne mikroorganizmów, identyfikuje się głównie na drodze analizy spektroskopowych w podczerwieni (FTIR), przy wykorzystaniu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz analizy potencjometrycznej sprzężonej z modelowaniem teoretycznym [11].

Stałe równowagowe powierzchniowych grup funkcyjnych mikroorganizmów oraz ilości powierzchniowych grup funkcyjnych są wyznaczone na drodze miareczkowania potencjometrycznego. Wynika to z reakcji protonacji oraz deprotonacji zachodzących na powierzchni danego mikroorganizmu opisanych przez model SCM (ang. *Surface Complexation Model*) [12]. Mechanizm modelu SCM opiera się na zależnościach:



gdzie: $\sim R$ oznacza rdzeń, zaś AH dane grupy funkcyjne mieszczące się na powierzchni mikroorganizmu.



Równanie 7 dotyczy równowagi protonacji, której odpowiada stała równowagi protonacji (K_p), równanie 8 dotyczy równowagi deprotonacji, której odpowiada stała równowagi deprotonacji (K_d). Zgodnie z prawem zachowania masy K_p i K_d przypisuje się wyrażenia:

$$K_p = \frac{a_{\sim RAH_2^+}}{a_{\sim RAH} \cdot a_{H^+_{aq}}} \quad (9)$$

$$K_d = \frac{a_{\sim RA^-} \cdot a_{H^+_{aq}}}{a_{\sim RAH}} \quad (10)$$

gdzie: a_i – aktywność stężeniowa jonów oksoniowych oraz powierzchniowych protonowanych/deprotonowanych danych grup funkcyjnych biokoloidu.

Danej grupie funkcyjnej odpowiada równowaga protonacyjno-deprotonacyjna, zaś równowagom protonacyjno-deprotonacyjnym odpowiadają stałe równowagowe K_i , gdzie i – powierzchniowa grupa funkcyjna.

$$K_{R-COOH} = \frac{a_{R-COO^-} \cdot a_{H_3O^+}}{a_{R-COOH}} \quad (11)$$

$$K_{R-NH_3^+} = \frac{a_{R-NH_2} \cdot a_{H_3O^+}}{a_{R-NH_3^+}} \quad (12)$$

$$K_{R-OH} = \frac{a_{R-O^-} \cdot a_{H_3O^+}}{a_{R-OH}} \quad (13)$$

$$K_{R-H_2PO_4} = \frac{a_{R-HPO_4^-} \cdot a_{H_3O^+}}{a_{R-H_2PO_4}} \quad (14)$$

$$K_{R-HPO_4^-} = \frac{a_{R-PO_4^{2-}} \cdot a_{H_3O^+}}{a_{R-HPO_4^-}} \quad (15)$$

$$K_{R_2-HPO_4} = \frac{a_{R_2-PO_4^-} \cdot a_{H_3O^+}}{a_{R_2-HPO_4}} \quad (16)$$

Dodatek kwasu warunkuje zmiany pH roztworu w każdym etapie miareczkowania. W przypadku doprowadzenia układu do zerowej zdolności przyjmowania protonów, całkowita równowagowa liczba protonów (ΔH_{cal}^+) w układzie jest sumą protonów wymienianych przez wodę (ΔH_w^+) oraz przez powierzchnię biokoloidu (ΔH_{bio}^+).

$$\Delta H_{cal}^+ = \Delta H_w^+ + \Delta H_{bio}^+ \quad (17)$$

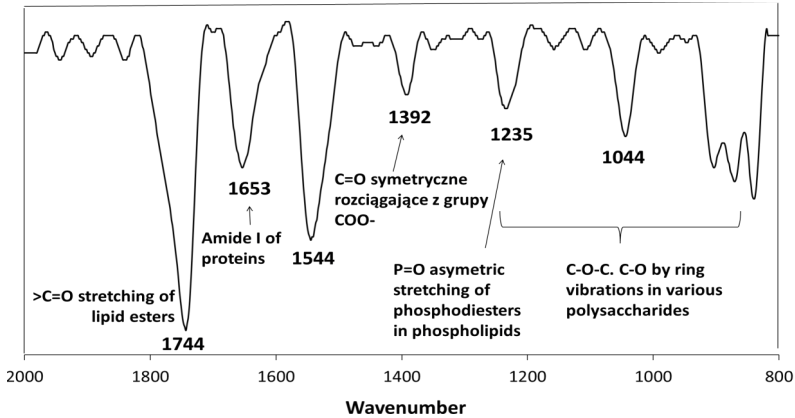
Wartości ΔH_w^+ , ΔH_{cal}^+ są znane bezpośrednio z danych pomiarowych. Normalizując ΔH_{bio}^+ do masy biokoloidu uzyska się wyrażenia opisujące liczbę protonów wymiennych z adsorbentem i na tej podstawie ilości powierzchniowych grup funkcyjnych.

$$Q_{ads} = \frac{\Delta H_{bio}^+}{m} \quad (18)$$

(gdzie: Q_{ads} – liczba protonów wymienianych przez biokoloid, m – masa biokoloidu)

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego dla ciała stałego z użyciem polaryzacji krzyżowej dla znaczonych atomów węgla (^{13}C CP MAS NMR) oraz fourierowska spektroskopia w podczerwieni (FTIR) jest szeroko stosowaną techniką w identyfikacji powierzchniowych grup funkcyjnych mikroorganizmów. Wykonanie widm NMR czy FTIR dla danego biokoloidu pozwala na wskazanie odpowiednio przesunięć chemicznych czy drgań, które przypisane są odpowiednio grupom aminowym/hydroksylowym, karboksylowym czy fosforanowym. Ponadto, techniki te pozwalają na analizę porównawczą widm przed i po modyfikacji powierzchni mikroorganizmu, objawiającej się pojawieniem nowego piku i/lub przesunięciem pierwotnego drgania. Porównanie widm pomocne jest w wyjaśnieniu mechanizmu biosorpcji, agregacji/adhezji oraz oddziaływań powierzchniowych komponentów biokoloidów. Oczywiście wąskim gardłem oznaczeń jest metodyka przygotowania próbek z wykorzystaniem liofilizacji. Chodzi o wyeliminowanie negatywnego efektu spowodowanego przez cząsteczki wody. Według Nichols i wsp., [13] widma FTIR bakterii można rozpatrywać jako obraz daktyloskopowy, ze względu na unikalny wzór absorpcji danej grupy funkcyjnej tzw.

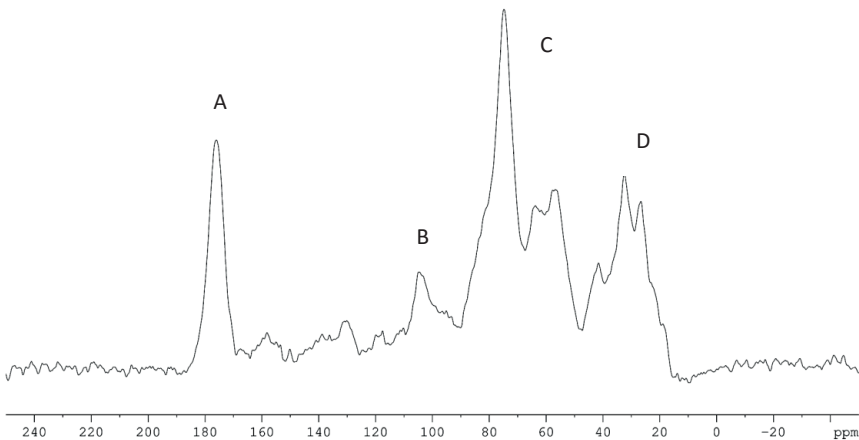
odcisk palca (z ang. *fingerprint*). Zazwyczaj są to pasma pochodzące od złożonych drgań szkieletowych z zakresu liczb falowych $\nu = 2000\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ (Rys. 3).



Rysunek 3. FTIR spektrum *E. coli*

Figure 3. FTIR spectra of *E. coli*

W przypadku widm NMR Buszewski i in. [14] wskazał obszar przesunięć chemicznych $\delta = 200\text{--}20\text{ ppm}$, umożliwiający rozróżnienie szczepów bakterii Gram-dodatnich i -ujemnych (Rys. 4).



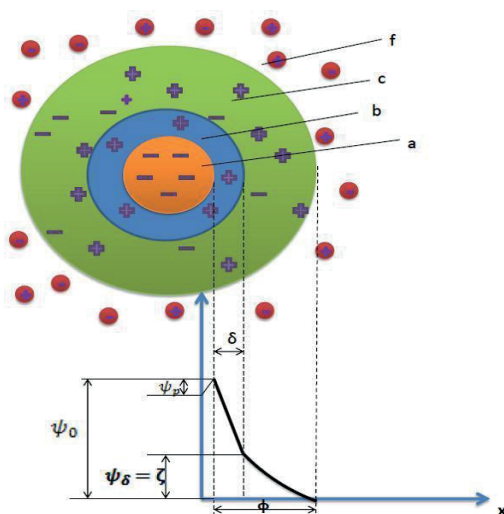
Rysunek 4. ^{13}C CP/MAS NMR *E. coli* gdzie: A – $\delta = 170\text{--}180\text{ ppm}$ odpowiada wiązaniu C=O występujące w białkach, peptydach i kwasach tłuszczowych, B – $\delta = 105\text{--}140\text{ ppm}$ odpowiada wiązaniu C=C występującemu w tyrozynofenylanilinie, tryptofanie, C – $\delta = 80\text{--}70\text{ ppm}$ odpowiada wiązaniu C-OH (polisacharydy), D – $\delta = 70\text{--}20\text{ ppm}$, któremu odpowiada ugrupowanie alkilowe z kwasów tłuszczowych, aminokwasów i fosfolipidów

Figure 4. ^{13}C CP/ MAS NMR of *E. coli* where: A – $\delta = 170\text{--}180\text{ ppm}$ corresponds C=O bonds present in proteins, peptides and fatty acids; B – $\delta = 105\text{--}140\text{ ppm}$ corresponds C=C bonds present in tyrosinephenylaniline, tryptophan; C – $\delta = 80\text{--}70\text{ ppm}$ correspond C-OH bond (polysaccharides); D – $\delta = 70\text{--}20\text{ ppm}$ corresponds to the alkyl group of the acid fatty acids, amino acids and phospholipids

2. FIZYKOCHEMIA POWIERZCHNI BIOKOLOIDÓW

Określenie „biokoloidy” wywodzi się bezpośrednio od terminu „koloidy” (*gr. kolla – klej*), który został wprowadzony przez Grahma w 1861 r. Na podstawie ogólnych prawidłowości jakie wykazują koloidy Ostwald w latach trzydziestych XX wieku zdefiniował koloidy jako układy rozproszone zbudowane z cząstek o średnicy 1–100 nm. Układy, w których średnica cząstek przekracza 1 μm nazywane są zawiesinami (suspensjami). Szybkość opadania cząstek zawiesin jest znacznie większa w porównaniu z układami koloidalnymi [15]. Współcześnie, koloidami nazywa się układy dyspersyjne, w których cząstki jednej substancji są rozproszone w innej. Ośrodek rozpraszający jest określany mianem ośrodka dyspersyjnego, fazą dyspergowaną. Dla cząstek rozproszonych stosuje się nazwę fazy rozproszonej. Stwierdzono, że układy koloidalne są termodynamicznie nietrwałe, stabilne kinetycznie. Za „biokoloidy” uznaje się układy biologiczne heterogenne będące stanem pośrednim pomiędzy roztworami rzeczywistymi, a zawiesinami. Układy heterogeniczne w odróżnieniu od układów homogenicznych posiadają granice międzyfazowe, w których substancje mieszczące się w obrębie granicy faz wykazują inne własności w stosunku do cząstek znajdujących się w fazie objętościowej (głębia roztworu). W biokoloidach cząstki fazy rozproszonej nazywane są mikronami, średnica (d) ich cząstek wynosi: $0,1 \text{ mm} > d > 0,2 \mu\text{m}$. Biokoloidy klasyfikuje się na liofobowe (odpychające ośrodek dyspersyjny) i liofilowe (wykazujące powinowactwo fazy rozproszonej do fazy rozpraszającej) [16].

Powierzchnia biokoloidów jest powierzchnią rzeczywistą czyli układem, na którym mieszczą się warstwy zaadsorbowane. Pierwszą z nich stanowi warstwa, nieodwracalnie związana z powierzchnią rzeczywistą biokoloidu, chemisorbcyjna. Druga warstwa powstaje w wyniku odwracalnej adsorpcji fizycznej. Biokoloid posiadający ładunek powierzchniowy nosi nazwę miceli (Rys. 5). Stabilność kinetyczna biokoloidów determinowana jest przez istnienie ładunku powierzchniowego.

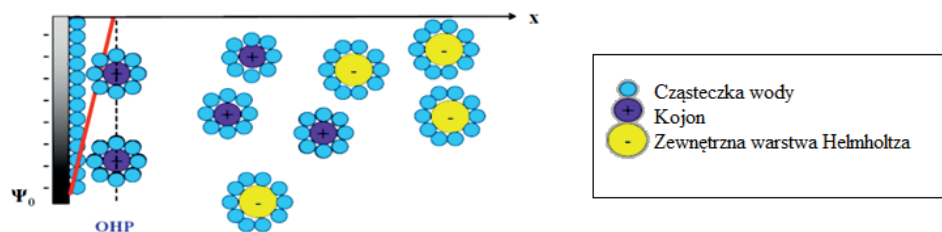


Rysunek 5. Budowa koloidu – micelli. Zmiana potencjału powierzchniowego w funkcji odległości od powierzchni koloidu (lewa strona). ψ_0 – potencjał powierzchniowy, δ – grubość warstwy Sterna, ψ_δ – potencjał rozmytej warstwy podwójnej, ξ – potencjał zeta, ζ – potencjał zeta, b – warstwa adsorpcyjna, c – warstwa dyfuzyjna, f – faza objętościowa (głębina roztworu)

Figure 5. Model of colloid – micelle. The change of surface potential as a function of the colloid surface distance (left side). ψ_0 – the surface potential, δ – Stern thickness, ψ_δ – potential of fuzzy double layer, ξ – zeta potential, b – adsorption layer, c – diffusion layer, f – phase volume (depth solution)

2.1. PODWÓJNA WARSTWA ELEKTRYCZNA

W 1861 roku Quinck stworzył podwaliny elementarnej teorii zjawisk elektrokinetycznych. Za przyczynę powstania ładunku elektrycznego cząstek fazy rozproszonej przyjęto efekt tarcia ich o wodę, w skutek czego kontaktujące się cząsteczki wody zyskują przeciwny znak względem cząsteczek fazy rozproszonej. W latach 1870–1879 Helmholtz postulował, iż za bezpośrednią przyczynę powstania ładunku elektrycznego koloidów odpowiada zjawisko adsorpcji jonów pochodzących z elektrolitu. W konsekwencji wprowadził on pojęcie podwójnej warstwy elektrycznej – nazywaną odtąd warstwą Helmholtza (Rys. 6). Helmholtz założył, iż potencjał powierzchniowy ψ_0 w funkcji odległości (x) spada prostoliniowo do wartości $\psi = 0$, dla x odpowiadającego promieniowi solwatowanego przeciwnjonu [17].



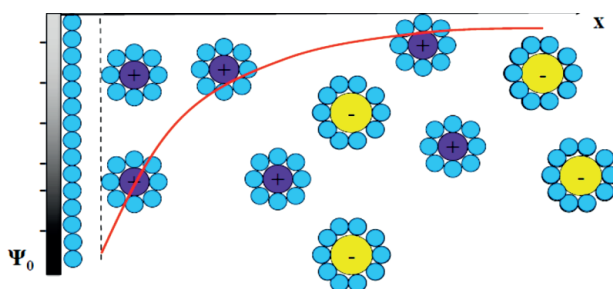
Rysunek 6. Model podwójnej warstwy elektrycznej według Helmholtza

Figure 6. The Helmholtz model of electrical double layer

W 1913 roku Gouy wraz z Chapmanem zmodyfikowali teorię Helmholtza zakładając dyfuzyjny charakter podwójnej warstwy elektrycznej, płaską budowę PWE oraz jony jako ładunki punktowe. Podwójna warstwa elektryczna składa się z dwóch warstw. Pierwsza warstwa zdeterminowana jest poprzez istnienie powierzchniowego ładunku elektrycznego (δ_0). Druga warstwa (dyfuzyjna) składa się z przeciwnionów, których sumaryczny ładunek (δ_d) neutralizuje ładunek powierzchniowy.

$$\delta_0 + \delta_d = 0 \quad (19)$$

W konsekwencji ustala się równowaga dynamiczna, w której wartości bezwzględne potencjału powierzchniowego (ψ_0) i potencjału warstwy dyfuzyjnej (ψ_d) są sobie równe. Potencjał powierzchniowy (ψ_0 w funkcji odległości (x)) spada wykładniczo do wartości $\psi = 0$, dla x odpowiadającego promieniowi solwatowanego przeciwnionu (Rys. 7).



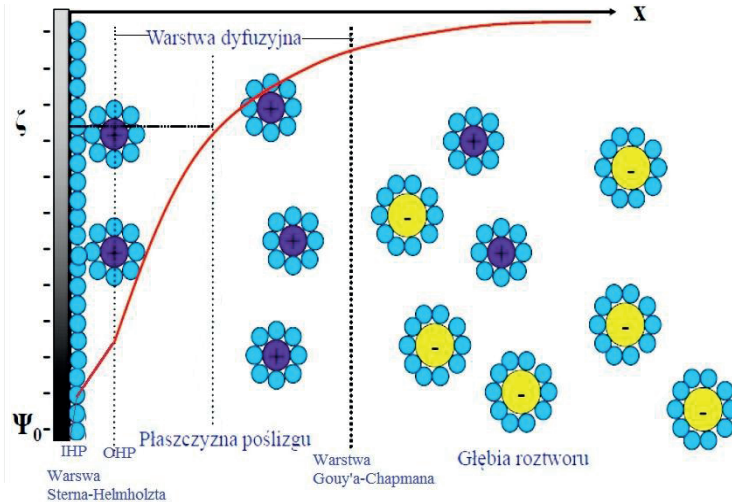
Rysunek 7. Model podwójnej warstwy elektrycznej według Gouy'a-Chapmana

Figure 7. The Gouy-Chapman model of electrical double layer

Jedenaste lat później Stern połączył koncepcje Helmholtza oraz Gouy'a i Chapmana nadając tym samym adsorpcyjno-dyfuzyjny charakter podwójnej warstwy elektrycznej. W 1947 roku Grahm uzupełnił hipotezę Sterna o założenie, iż ładunek przenoszony jest z roztworu na powierzchnię koloidu – warstwy Helmholtza (od tej pory zamiennie nazywaną warstwą Sterna-Helmholtza) – oraz warstwy dyfuzyjnej (Gouy'a-Chapmana). Warstwa Sterna-Helmholtza składa się

z warstwy wewnętrznej IHP (ang. *inner Helmholtz plane*) oraz z warstwy zewnętrznej OHP (ang. *outer Helmholtz plane*). Ładunek powierzchniowy δ_0 neutralizowany jest przez ładunek pochodzący z warstwy dyfuzyjnej δ_d (obszar solwatacji jonów) oraz adsorpcyjnej δ_a (obszar desolvatacji jonów, chemisorpcji) [15–17] (Rys. 8).

$$\delta_0 + \delta_d + \delta_a = 0 \quad (20)$$



Rysunek 8. Model podwójnej warstwy elektrycznej według Sterna-Helmholza
Figure 8. The Stern-Helmholtz model of electrical double layer

Niemalý wkład w formowanie się koncepcji podwójnej warstwy elektrycznej i w rezultacie ugruntowaniu pojęcia potencjału ξ wykazali dwaj Polacy. Profesor Stanisław Glixelli z Uniwersytetu Poznańskiego, udowodnił że rozkład ładunku elektrycznego w układzie koloidów jest zdeterminowany zarówno przez zjawiska adsorpcji fizycznej, jak i chemicznej. Natomiast, Marian Smoluchowski profesor Uniwersytetu Jagiellońskiego, wyprowadził równanie łączące ruchliwość elektroforetyczną z potencjałem elektrokinetycznym ζ [18].

$$\zeta = \frac{\mu_e \cdot \eta}{\varepsilon} \quad (21)$$

gdzie: μ_e – ruchliwość elektroforetyczna, η – lepkość ośrodka ε – stała dielektryczna

Z niniejszego równia wynika, że potencjał zeta zależy proporcjonalnie od ruchliwości elektroforetycznej będącej parametrem charakterystycznym dla danego układu koloidalnego, znajdującego się w określonym ośrodku dyspersyjnym o zdefiniowanej lepkości i odwrotnie proporcjonalnie od stałej dielektrycznej tego ośrodka. Ponadto Smoluchowski wyjaśnił przyczynę występowania termicznych ruchów koloidów, określanych mianem tzw. „ruchów Browna”, tłumacząc je za wynik losowych zderzeń koloidów z molekułami rozpuszczalnika [15–18].

2.2. POTENCJAŁ ZETA

Dominująca część indywiduów, składających się na układ koloidalny, posiada ładunek elektryczny. Ładunek ten uzależniony jest od charakteru cząstki i otoczenia. Powstawanie ładunku powierzchniowego wynika z trzech głównych fizykochemicznych przyczyn: dysocjacji grup funkcyjnych znajdujących się na powierzchni, transportu jonów z powierzchni cząstek oraz zjawiska powierzchniowej adsorpcji jonów. Konsekwencją obecności ładunku powierzchniowego jest wzrost ilości przeciwjonów w obrębie powierzchni koloidu i formowanie się warstwy adsorpcyjnej. Ze względu na niewielką kompensację ładunku powierzchniowego oraz na obecność ruchów Browna, tworzy się warstwa dyfuzyjna, której charakter zależy od rodzaju i stężenia elektrolitu. Solwatowane jony znajdujące się w warstwie adsorpcyjnej determinują liniowy spadek powierzchniowego potencjału ψ_0 do krytycznej wartości potencjału Sterna, nazywanego inaczej potencjałem rozmytej warstwy podwójnej (ψ_δ). W przypadku warstwy dyfuzyjnej potencjał ψ_δ w funkcji odległości od granicy faz (x) maleje wykładniczo [19].

Zarówno powierzchniowy potencjał ψ_0 jak i potencjał Sterna ψ_δ ze względu na trudności bezpośredniego pomiaru, nie nadaje się do opisu właściwości elektrycznych cząstek układu dyspersyjnego. Do tego celu wprowadza się – potencjał zeta (ζ), który definiuje się jako potencjał elektrokinetyczny występujący na granicy między związaną, a swobodną cieczą, między jonami związanymi nieruchomo w warstwie adsorpcyjnej i swobodnymi przeciwjonami warstwy dyfuzyjnej, zwanej płaszczyzną ścięcia (Rys. 5). W konsekwencji potencjał zeta jest proporcjonalny do gęstości ładunku na powierzchni koloidu, który zależy od pH. W związku z tym wartość potencjału zeta będzie różna w zależności od pH oraz stężenia elektrolitu. W przypadku wzrostu stężenia jonów elektrolitu następuje zmniejszenie grubości podwójnej warstwy elektrycznej w wyniku niespecyficjnej adsorpcji jonów, co determinuje zmniejszenie wartości tego potencjału.

Przyjmuje się, że dla standardowych układów koloidalnych, które są stabilizowane przez oddziaływania elektrostatyczne, wartość potencjału zeta w granicach od $\zeta = -30$ do $\zeta = +30$ mV oznacza układ niestabilny. Odchylenie potencjału elektrokinetycznego poza te granice świadczy o stabilizacji układu [18, 19].

Im większy ładunek na powierzchni koloidu tym silniejsze oddziaływania. Wartość potencjału zeta warunkuje charakter oddziaływań odpychających lub przyciągających. Siły odpychania uwidaczniają się w momencie zbliżenia się dwóch cząsteczek, kiedy to ich podwójne warstwy elektryczne (powierzchnie międzyfazowe) zaczynają nakładać się na siebie. Natomiast przyciągająca siła van der Waalsa szybko wzrasta i staje się dominująca przy bardzo małych odległościach ($< 0,5$ nm).

Ruch cząstki znajdującej się w polu elektrycznym zależy od: potencjału zeta, lepkości, stałej dielektrycznej roztworu oraz natężenia przyłożonego pola. Pomiar prędkości naładowanego koloidu znajdującego się w polu elektrycznym, umożliwia wyliczenie ruchliwości elektroforetycznej, która powiązana jest z potencjałem zeta zależnością matematyczną [18–20].

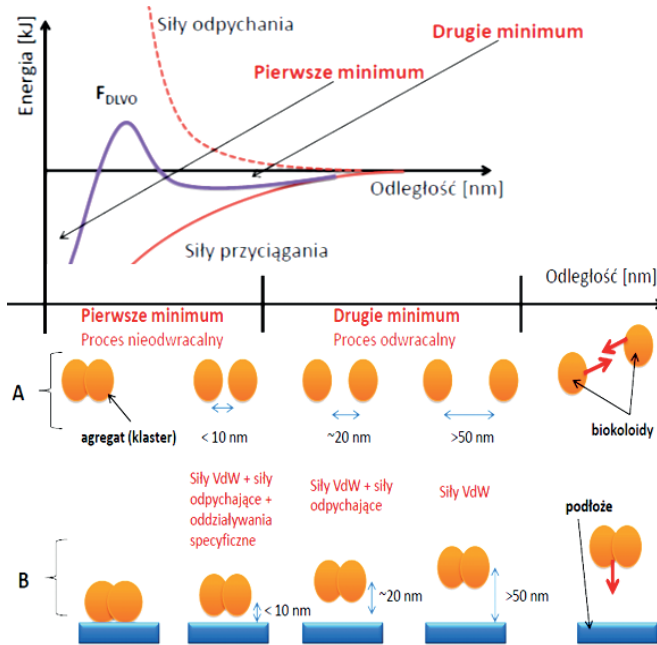
2.3. ZASTOSOWANIE TEORII DLVO DO OPISU ZJAWISKA AGREGACJI I ADHEZJI BIKOLOIDÓW

Cechą charakterystyczną biokolidów jest ich zdolność do agregacji, adhezji oraz tworzenia klastrów. Opis termodynamicznego problemu agregacji sprowadza się do stwierdzenia, że w wyniku tworzenia klastrów powierzchnia rzeczywista układu ulega zmniejszeniu, w wyniku czego stabilność biokolidów wzrasta. Teoria DLVO jest jednym z najczęściej stosowanych modeli teoretycznych, pozwalających na wyjaśnienie tego rodzaju zjawisk. Skrót DLVO pochodzi od pierwszych liter nazwisk twórców niniejszej teorii: Derjagin, Landau, Verveij i Overbeek. Klasyczna teoria DLVO zakłada istnienie sił odpychających i sił przyciągających [21].

$$F_{DLVO} = F_A + F_R \quad (22)$$

gdzie: F_{DLVO} – siła DLVO, F_A – siła przyciągania, F_R – siła odpychania.

Siły odpychania są sumą cząstkowych sił elektrostatycznych opisywanych przez prawo Coulomba. W wyniku zbliżenia się jednoimiennie naładowanych biokolidów, ich rozmyte podwójne warstwy nakładają się, w wyniku czego następuje odpychanie elektrostatyczne. Zjawisko to determinowane jest przez dwie składowe: elektrostatyczną oraz osmotyczną (w obrębie przenikania występuje większe stężenie jonów w porównaniu ze stężeniem jonów objętościowych). Siły przyciągania określa się jako siły van der Waalsa, czyli siły orientacyjne (Keesom–van der Waalsa), indukcyjne (Debye’a–van der Waalsa), siły dyspersyjne (Londona–van der Waalsa) oraz siły hydrofobowe. Siły orientacyjne występują co najmniej między dwoma układami o stałym momencie dipolowym. Przykładem tego typu sił jest oddziaływanie wodorowe. Konsekwencją występowania, w danym układzie, wiązań wodorowych jest istnienie sił hydrofobowych. Siły te, tworzone są przez oddziaływanie molekuł niepolarnych, znajdujących się w wodzie [22]. Siły indukcyjne determinowane są w przypadku kiedy jeden z dwóch układów posiada stały moment dipolowy. Układ, w którym składowe nie posiadają stałych właściwości dipolowych wyznacza siły dyspersyjne. Duża odległość pomiędzy powierzchniami rzeczywistymi biokolidów wyznacza spadek sił odpychania. Siły elektrostatyczne w koloidalnym układzie wodnym, nie znikają zgodnie z klasycznym prawem Coulomba, ponieważ w wyniku zbliżania się powierzchni rzeczywistych (hydratowanych) następuje wymiana jonów przez wodę, co determinuje powstanie różnicy potencjałów.



Rysunek 9. Oddziaływania odpowiedzialne za proces agregacji (A) oraz adhezji (B) w ujęciu teorii DLVO
 Figure 9. Interactions responsible for the aggregation process (A) and adhesive (B) in terms of the theory of DLVO

Siły odpychające znikają wykładniczo. Siły przyciągania pojawiają się wolniej w miejscu znikających sił elektrostatycznych. W rezultacie, w funkcji odległość – energia oddziaływania, tworzy się drugie, płytkie minimum energetyczne. Cechą charakterystyczną drugiego minimum jest odwracalność procesu agregacji (analogicznie adhezji do podłoża). W przypadku dalszego zmniejszenia odległości pomiędzy danymi biokoloidami następuje przekroczenie bariery potencjału, czego efektem jest nieodwracalny proces tworzenia agregatu. Układ znajduje się w pierwszym minimum energetycznym [23] (Rys. 9).

Zastosowanie teorii DLVO do opisu procesów agregacji, adhezji koloidów w tym mikroorganizmów (biokoloidów), możliwe było dzięki zastosowaniu szeregu założeń teoretycznych. Micele traktowane są jak jednorodne kule o stałej średnicy, stałym i homogennym ładunku powierzchniowym oraz posiadają hydrofobową, spolaryzowaną powierzchnię. Teorię DLVO stosuje się głównie do wyjaśnienia nieodwracalnych procesów agregacji oraz adhezji. Konsekwencją założeń klasycznej teorii DLVO jest rozbieżność między modelem teoretycznym, a rzeczywistymi układami biologicznymi. Komórki mikroorganizmów charakteryzują się złożoną topografią powierzchni oraz heterogennym rozmieszczeniem ładunku powierzchniowego. W rezultacie następuje wypłaszczenie studni potencjału drugiego minimum energetycznego oraz zmniejszenie bariery potencjału prowadzącej do pierwszego minimum. Biokoloidy w wyniku oddziaływania z powierzchnią i/lub między

sobą ulegają zniekształceniom (rozpłaszczeniom, wygięciom). Skutkuje to różną odległością między zespołem mikroorganizmów i/lub podłożem, prowadzącej do różnych typów oddziaływań w obrębie danego układu. Heterogeniczny rozkład ładunków powierzchniowych może powodować efekty nakładania bądź znoszenia się składowych elektrostatycznych, determinujących zmiany kształtu w danych komponentach powierzchniowych. Stan ten dodatkowo zniekształca krzywą energii w funkcji odległości proponowaną przez teorię DLVO [21–23] (Rys. 9).

W celu udoskonalenia teorii DLVO, wprowadza się „poprawkę” w postaci siły krótkozasięgowej (F_D). Teoria DLVO ze zmodyfikowanymi założeniami, które mają na celu przybliżenie modelu teoretycznego do rzeczywistych układów biologicznych nosi nazwę rozszerzonej teorii DLVO, w skrócie XDLVO (ang. *extend DLVO*).

$$F_{\text{XDLVO}} = F_{\text{DLVO}} + F_D \quad (23)$$

Jedną z pierwszych, scharakteryzowanych sił krótkozasięgowych była „siła hydratacyjna”. W wyniku usunięcia wody z powierzchni modelowych następuje zmniejszenie oddziaływania elektrostatycznego. Zgodnie z teorią mostków kationów dwuwartościowych dodatek kationów Mg^{2+} i/lub Ca^{2+} przyspiesza agregację biokoloidów. Na tej podstawie można wywnioskować, że akwakompleksy metali dwuwartościowych ($\text{Mg}^{2+}_{\text{aq}}$, $\text{Ca}^{2+}_{\text{aq}}$) ekranują ładunki składające się na siły elektrostatyczne, wiążą się z ujemnie naładowanymi powierzchniowymi grupami funkcyjnymi (głównie z karboksylowymi) wypierając molekuly wody z warstwy Sterna-Helmholza zwiększając tym samym ładunek układu [21–24].

3. TECHNIKI ELEKTROMIGRACYJNE W OZNACZANIU MIKROORGANIZMÓW

Ładunek na powierzchni, determinowany przez charakterystyczne właściwości grup funkcyjnych błon i/lub ściany komórkowej biokoloidu, wpływa na zachowanie mikroorganizmów w polu elektrycznym. Fenomen ten warunkuje własną ruchliwość umożliwiającą separację elektroforetyczną biokoloidów. Jednakże z analizą tak skomplikowanych układów związany jest szereg problemów, tj. agregacja i/lub adhezja do powierzchni wewnętrznej kapilary.

Pierwsze doniesienie wykorzystujące technikę elektromigracyjną do separacji biokoloidów pochodzi z 1987 roku. Stelan Hjertén przeprowadzając separację elektroforetyczną, wirusa mozaiki tytoniowej oraz *Lactobacillus cesei*, zaobserwował ich migrację z przepływem elektroosmotycznym. Zastosowane przez niego warunki analizy nie pozwoliły na skuteczne rozdzielenie badanych mikroorganizmów [25].

W 1993 roku Ebersole i McCormick przeprowadzili rozdzielanie elektroforetyczne *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* i *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*. Analizowane bakterie tworzyły agregaty, co skutkowało niepewtarzalnością analizy oraz poszerzeniem pasma [26].

W kolejnych latach liczne grupy badawcze stosując bufor fosforanowy, TBE wyznaczyli ruchliwość elektroforetyczną różnych mikroorganizmów (np. *Saccharomyces cerevisiae*). Zauważono, że wraz ze wzrostem siły jonowej następuje zwężenie pasma. Na podstawie niniejszej obserwacji stwierdzono zależność między powierzchniowym ładunkiem określonego mikroorganizmu a otaczającym go środowiskiem [27].

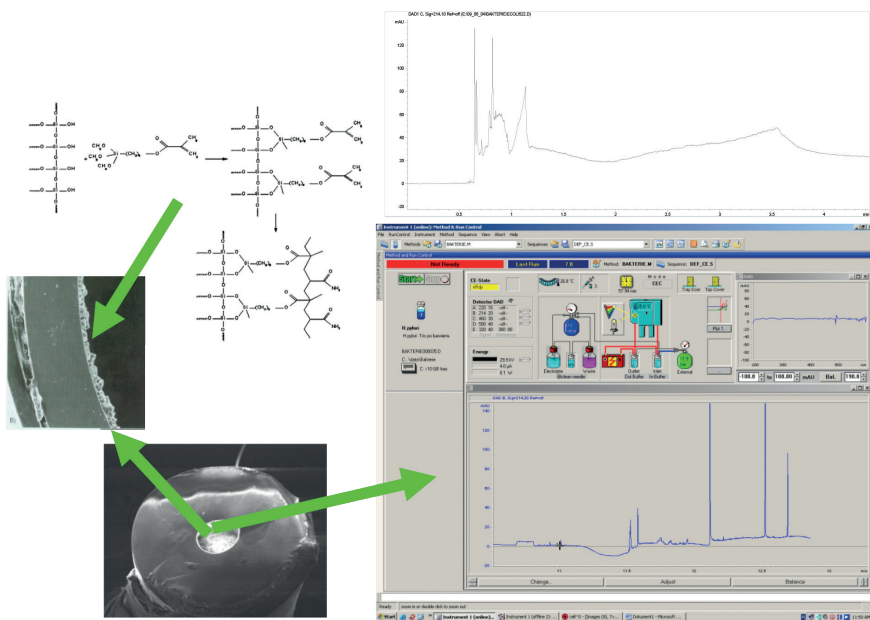
Pod koniec lat dziewięćdziesiątych XX wieku, Armstrong i in. [28] wprowadzili innowacyjne rozwiązanie skutkujące polepszeniem selektywności i rozdzielczości separacji elektroforetycznej. Zastosowanie dodatku poli(tlenku etylenu) (PEO, glikol polietylenowy) w buforze spowodowało zmniejszenie ruchliwości elektroosmotycznej oraz prawdopodobnie zredukowanie oddziaływania elektrostatycznego pomiędzy mikroorganizmami i ścianą kapilary [28].

Armstrong i in. [28] oraz Zheng i Yeung [29] zaproponowali trzy modele formowania się agregatów mikroorganizmów podczas rozdzielania elektroforetycznego:

- model indukcji pola (ang. *Field-Induced Model*). Mikroorganizmy traktowane są jako układ cieczy elektoreologicznej (ang. *Electrorheological Fluid*), której lepkość zmienia się zależnie od przyłożonego pola elektrycznego. Podczas analizy separacyjnej, w wyniku przyłożonej różnicy potencjałów, układ mikroorganizmów formuje agregat w kształcie dysku, który znajduje się prostopadle do kierunku pola elektrycznego. Czas migracji zależy od polaryzacji jego powierzchni klastra;
- model „włochatych cząstek” (ang. *Hairy-Particle Model*). Mikroorganizmy traktowane są jako micelle (biokoloidy, makrojonny) o ujemnie naładowanej powierzchni. Zasadniczą rolę przypisuje się PEO, który dodawany jest w określonym stężeniu do buforu wiodącego. Zakłada się, że w wyniku adsorpcji glikolu polietylenowego („włochata cząstka”) na powierzchni danego mikroorganizmu, następuje zmiana ruchliwości elektroforetycznej biokoloidu. Zmodyfikowana ruchliwość elektroforetyczna małych makrojonów jest mniejsza, w stosunku do większych makrojonów. Konsekwencją tego jest formowanie się gradientu przewodności układu mikrobiologicznego (tworzenie się przeciwprądu) oraz redukcja odpychających oddziaływań elektrostatycznych między biokoloidami, skutkujących w tworzeniu agregatów. Wektor ruchliwości elektroforetycznej danego klastra skierowany jest w kierunku elektrody dodatniej, jednak wypadkowa ruchliwość elektroosmotyczna układu powoduje migrację w kierunku katody;
- model „indukcji kształtu” (ang. *Shaped - Induced Model*). Zakłada się, że mikroorganizmy znajdujące się w kapilarze, formują agregaty w wyniku losowych zderzeń. Stworzone agregaty migrują z charakterystyczną dla nich ruchliwością elektroforetyczną zgodnie z kierunkiem EOF. PEO traktowany jest jako mediator w oddziaływaniach pomiędzy mikroorganizmami.

Wykorzystanie przez Zheng i Yeung [29] kamery z matrycą CCD do obserwacji migracji elektroforetycznej mikroorganizmów w kapilarze poszerzyło znacznie wiedzę na temat zjawiska agregacji (adhezji). Zauważono, że wraz ze wzrostem rozmiaru klastra, wzrastała szybkość agregacji, a rozmiar formującego się agregatu zależy od różnicy potencjałów. Wykazano również, że wraz ze wzrostem siły jonowej buforu, szybkość tworzenia agregatów wzrasta.

Kolejnymi sposobami poprawienia selektywności i rozdzielczości analizy elektroforetycznej mikroorganizmów było wprowadzenie modyfikacji wewnętrznej powierzchni kapilary (akryloamidem, diwinylobenzenem, trimetylochlorosilanem) przez Buszewskiego i in. [27, 30] Wprowadzenie powyższych modyfikacji skutkowało większą hydrofobowością powierzchni i prawdopodobnym wystąpieniem oddziaływań typu mikroorganizm–ligand (np. π - π) przyczyniających się do poprawy selektywności (Rys. 10).



Rysunek 10. Wpływ chemicznej modyfikacji powierzchni kwarcowej kapilary (typu *fused silica*) na selektywność separacji bakterii [27, 30]

Figure 10. Effect of chemical modification of the surface of the quartz capillary (such as fused silica) for selective separation of bacteria [27, 30]

Innym rozwiązaniem poprawiającym selektywność separacji elektroforetycznej było przeprowadzenie przez Dziubakiewicz i Buszewskiego [30] i/czy Oukacine i in. [31] elektroseparacji bakterii przy zastosowaniu mechanizmu przejściowej izotachoforezy (ITP). Według badaczy, metoda ta odznacza się wysoką selektywnością i powtarzalnością. Ponadto, wykazano, iż wraz ze wzrostem ilości komórek bak-

teryjnych w próbce, istnieje zależność liniowa względem intensywności sygnałów (wysokość pików na elektroferogramie) [27, 30].

Lopez-Leon i in. [32] zaproponowali rozwiązanie w separacji mikroorganizmów wprowadzając ujemnie zjonizowane układy polimer–przeciwiało. Kompleksy te oddziałują selektywnie z danym biokoloidem powodując poprawę selektywności rozdzielania [27, 30].

Buszewski i in. [33] przeprowadzili elektroseparatorie bakterii izolowanych bezpośrednio z matrycy biologicznych m.in. moczu. Badania te wykazały, iż kapilarna elektroforeza strefowa, może stać się powszechnie stosowanym, czułym narzędziem w diagnostyce medycznej.

UWAGI KOŃCOWE

Obecnie na świecie publikuje się rocznie dziesiątki publikacji dotyczących elektroseparatorie mikroorganizmów przy zastosowaniu elektroforezy kapilarnej. Jednakże, pomimo znaczącej wiedzy na temat zjawisk powierzchniowych zachodzących podczas separacji elektroforetycznej biokoloidów, w celu zrozumienia przemian fizykochemicznych zachodzących na granicy faz, niezbędne jest przeprowadzanie dalszych szczegółowych badań i studiów dotyczących tych interesujących fenomenów.

PODZIĘKOWANIA

Finansowanie: projekt badawczy Narodowego Centrum Nauki Symfonia I Nr. 2013/08/W/N28/0070, Maestro-6, Preludium Nr.: 2013/11/N/ST4/01835 oraz 2012/07/N/ST4/01856

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Z. Libudzisz, K. Kowal, Z. Żakowska, *Mikrobiologia techniczna. T.1, Mikroorganizmy i środowiska ich występowania*, PWN, Warszawa 2007.
- [2] K. Kavanagh, *Fungi, Biology and Application*, A John Wiley & Sons, New Delhi 2001.
- [3] H.G. Schlegel, *Mikrobiologia Ogólna*, PWN, Warszawa 2002.
- [4] E. Cabib, S.J. Silverman, J.A. Shaw, S.D. Gupta, Hee-Moon Park, J.T. Mullins, P.C. Mol, B. Bower, *Pure & Appl. Chem.*, 1991, **63**, 483.
- [5] E. Zinser, G. Daum, *Yeast*, 1995, **11**, 493.
- [6] V. Aimanianda, C. Clavaud, C. Simenel, T. Fontaine, M. Delepierre, J.P. Latge, *JBC*, 2009, **284**, 13401.
- [9] L. Jaafar, J. Zueco, *Microbiology*, 2004, **150**, 53.
- [10] M. Suphantharika, P. Khunrae, P. Thanardkit, C. Verduyn, *Bioresource Technol.*, 2003, **88**, 55.
- [11] J. Ojeda, M. Romero-Gonzalez, R. Bachmann, R. Edyvean, S. Banwart, *Langmuir*, 2008, **24**, 4032.
- [12] L. Leone, D. Ferri, C. Manfredi, P. Persson, A. Shchukarev, *Environ Sci. Technol.*, 2007, **41**, 6465.

- [13] P.D. Nichols, M. Henson, J.B. Guckert, D.E. Nivens, D.C., J. Microbiol. Methods, 1985, **4**, 79.
- [14] B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, P. Pomastowski, K. Hrynkiewicz, J. Płoszaj-Pyrek, E. Talik, M. Kramer, K. Albert, JABT, 2015, **6**, 1000232.
- [15] H. Sonntag, *Koloidy*, PWN, Warszawa 1982.
- [16] A. Scheludko, *Chemia koloidów*, Wyd. Naukowo-Techniczne, Warszawa 1963.
- [17] A. Basiński, *Zarys fizykochemii koloidów*, PWN, Warszawa 1957.
- [18] S. Bocian, E. Dziubakiewicz, B. Buszewski, J. Sep. Sci., 2015, **38**, 2625
- [19] P. Pomastowski, E. Dziubakiewicz, B. Buszewski, Analityka, 2012, **2**, 19
- [20] P. Pomastowski, M. Sprynskyy, B. Buszewski, Col. Surf. B., 2014, **120**, 21.
- [21] A. Vilinska, K. H. Rao, Minerals & Metallurgical processing, 2011, **28**, 151.
- [22] S. Przewalski, J. Hładyszowski, KOSMOS Problemy nauk biologicznych, 2003, **52**, 137.
- [23] M. Hermansson, Coll. Surf. B, 1999, **14**, 105.
- [24] J.A. Brant, A.E. Childress, Environ. Eng. Sci., 2002, **19**, 413.
- [25] J. Petr, V. Maier, Trends Anal. Chem., 2012, **31**, 9.
- [26] M. Desai, D. Armstrong, Mol. Biol. Rev., 2003, **67**, 38.
- [27] B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, M. Szumski, *Techniki elektromigracyjne*, Malamut, Warszawa 2015.
- [28] D. Armstrong, J. Schneiderheinze, J. Kullman, L. He, FEMS Microb. Lett., 2001, **194**, 33.
- [29] J. Zheng, E.S. Yang, Anal. Chem., 2003, **75**, 818.
- [30] B. Buszewski, M. Szumski, E. Kłodzińska, H. Dahm J. Sep. Sci., 2003, **26**, 1045.
- [31] F. Oukacine, L. Garrelly, B. Romestand, D. Goodall, T. Zou, H. Cottet, Anal. Chem., 2011, **83**, 1571.
- [31] E. Dziubakiewicz, B. Buszewski, Electrophoresis, 2014, **35**, 1160.
- [32] T. Lopez-Leon, E.L.S. Carvalho, B. Seijo, J.L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-Gonzalez, J. Colloid & Inter. Sci., 2005, **283**, 344
- [33] E. Kłodzińska, M. Szumski, E. Dziubakiewicz, K. Hrynkiewicz, E. Skwarek, W. Janusz, B. Buszewski, Electrophoresis, 2010, **31**, 1590.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 października 2015