

**SPEKTROMETRIA MAS W BADANIACH SKAŻEŃ  
MIKROBIOLOGICZNYCH ŚRODOWISKA. CZĘŚĆ I.  
KWAS MURAMINOWY JAKO BIOMARKER ŚCIAN  
KOMÓRKOWYCH BAKTERII**

INVESTIGATION (DETECTION) OF MICROBAL  
ENVIRONMENTAL CONTAMINATION BY MASS  
SPECTROMETRY. PART I. MURAMIC ACID  
AS A BIOMARKER OF THE MICROBIAL CELL WALLS

**Zbigniew Mielniczuk, Karol Bal**

*Centralny Ośrodek Badawczo-Rozwojowy Opakowań,  
ul. Konstancińska 11, 02-942 Warszawa  
e-mail: mielniczuk@cobro.org.pl, bal@cobro.org.pl*

---

Abstract

Wstęp

1. Markery chemiczne bakterii
  - 1.1. Wykrywanie skażeń mikrobiologicznych środowiska
2. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS) w badaniu markerów chemicznych ścian komórkowych bakterii
3. Przygotowanie próbek kwasu muraminowego do analizy metodą GC/MS – otrzymanie pochodnych trimetylosililowych (TMS)
  - 3.1. Obliczanie ilości komórek bakterii na podstawie zawartości peptydoglikanu

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---



**dr hab. inż. Zbigniew Maksym Mielniczuk**, urodzony w 1941 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. Doktor habilitowany nauk biologicznych – Uniwersytet Łódzki 1997 r. Obecnie zatrudniony jako Sekretarz Naukowy oraz Prof. nzw. w Centralnym Ośrodku

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



**dr 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. 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 Centralnym Ośrodku Badawczo-Rozwojowym Opakowań COBRO, Warszawa. Autor ponad 20 oryginalnych artykułów oraz około 30 innych publikacji w czasopismach krajowych i zagranicznych. Członek Polskiego Towarzystwa Chemicznego od 1975 r.

## 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). Specific sugars (e.g. heptoses) and 3-hydroxylated fatty acids are found in the endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) of gram-negative bacteria [42].

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

Additionally, culturing 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 [17].

Muramic acid (MuAc), an amino sugar, has been suggested for use as a chemical marker in gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) determination of bacterial peptidoglycan in both clinical and environmental samples. Several derivatives of MuAc have been applied, including the alditol acetate [1, 2], aldnonitrile [3], trifluoroacetyl [4] and trimethylsilyl [5], and methyl ester O-methyl acetate [6] derivatives.

Both the alditol acetate and TMS derivatives have proven suitable for the use with GC-ion-trap tandem MS [7].

The aim of our proposition is a 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 direct analysis of bacterial muramic acid as a biochemical marker.

A method is described for the quantitation of muramic acid, a marker of bacterial peptidoglycan as trimethylsilyl (TMS) derivatives using GC/MS method.

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

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

Keywords: muramic acid, peptidoglycan, gas chromatography-mass spectrometry  
Słowa kluczowe: kwas muraminowy, peptydoglikan, chromatografia gazowa, spektrometria mas

---

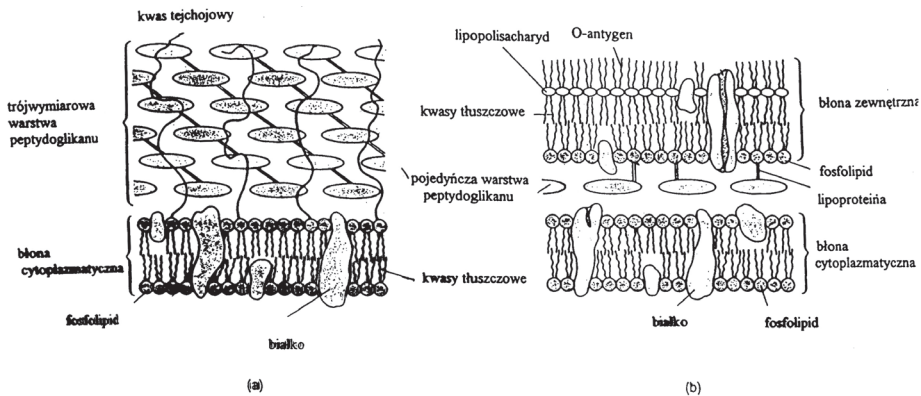
---

## WSTĘP

Powszechność występowania bakterii w naturze oraz ogromna ich rola, skłoniła naukowców do opracowania metod ich wykrywania i identyfikacji. Badanie struktur chemicznych komórek bakteryjnych, poznanie ich funkcji życiowych, pozwoliło lepiej zrozumieć zakres i znaczenie oddziaływania drobnoustrojów na otaczające środowisko.

Od dawna na przykład wiadomo, że wszystkie bakterie osłonięte są błoną komórkową. Komórki bakterii z wyjątkiem *Mycoplasmatales* i *Archaeobacterie* otoczone są leżącą na zewnątrz błony, ścianą komórkową tworzącą szkielet zewnętrzny decydujący m.in. o kształcie komórki. Dodatkowo u większości bakterii gram-ujemnych występuje zewnętrzna osłona, której brak u bakterii gram-dodatnich.

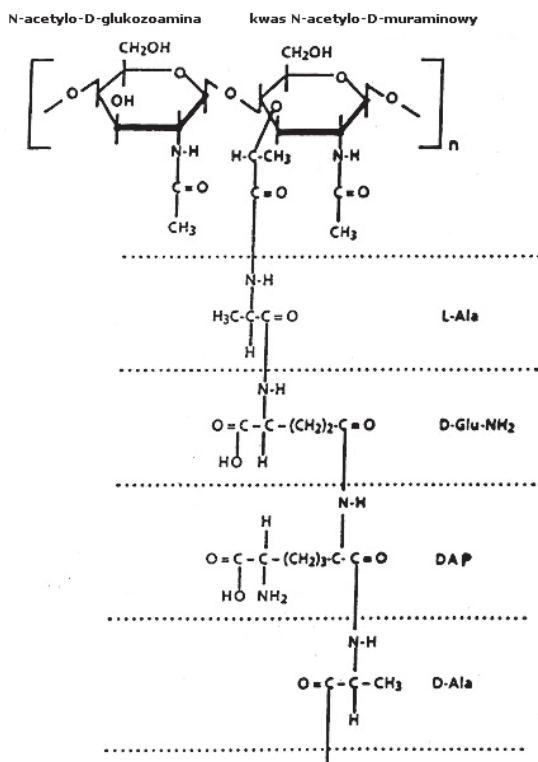
Ściana komórkowa odgrywa ważną rolę w funkcjach życiowych bakterii. Ona to właśnie zawiera wiele unikalnych związków chemicznych, będących składnikami peptydoglikanu (PG, mureina, mukopeptyd), i lipopolisacharydu (LPS, endotoksyna). Schemat struktury ścian komórkowych bakterii pokazano na Rysunku 1.



Rysunek 1. Schemat struktury ścian komórkowych bakterii: gram-dodatnich (a) i gram-ujemnych (b) [8], po modyfikacjach

Figure 1. Schematic structure of the bacterial cell wall: gram-positive (a) and gram-negative (b) [8], after modifications

U bakterii gram-dodatnich PG jest wielowarstwowy, stanowiący od 40% do 80% całkowitej masy komórki [9]. Natomiast cienki, jednowarstwowy peptydoglikan u bakterii gram-ujemnych jest dodatkowo otoczony zewnętrzną osłoną zbudowaną z białek oraz lipopolisacharydu (LPS). Strukturę chemiczną jednej warstwy peptydoglikanu przedstawiono na Rysunku 2.



Rysunek 2. Schemat struktury jednej warstwy peptydoglikanu. Gdzie: L-Ala, L-alanina; D-Glu-NH<sub>2</sub>, D-glutamina; DAP, kwas diaminopimelinowy; D-Ala, D-alanina [10], po modyfikacjach  
 Figure 2. Schematic structure of one layer of peptidoglycan. Where: L-Ala, L-alanine; D-Glu-NH<sub>2</sub>, D-glutamine, DAP, diaminopimelic acid, D-Ala, D-alanine [10], after modifications

Jest to polimer składający się z identycznych podjednostek, zawierający pochodne dwóch aminocukrów: *N*-acetyloglukozaaminy i kwasu *N*-acetylmuraminowego połączonych ze sobą wiązaniami beta 1,4-glukozydowymi w łańcuchy kilkudziesięciocłonowe [11]. Do grup karboksylowych kwasu *N*-acetylmuraminowego dołączone są krótkie, liczące po kilka aminokwasów peptydy. Ich skład bywa różny u różnych bakterii przy czym peptydy dwóch sąsiednich łańcuchów łączą się ze sobą z reguły poprzez kwas diaminopimelinowy (DAP) lub lizynę.

## 1. MARKERY CHEMICZNE BAKTERII

Złożone makrostruktury ścian komórkowych bakterii zawierają monomeryczne związki chemiczne, czasem zupełnie unikalne i nie występujące nigdzie indziej w naturze. W Tabeli 1 przedstawiono kilka przykładów markerów ścian komórkowych bakterii.

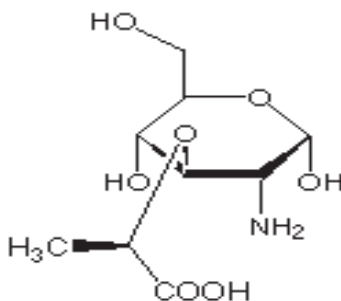
Tabela 1. Markery chemiczne bakterii  
Table 1. Chemical markers of bacteria

Marker	Struktura lub rodzaj drobnoustroju
Kwas muraminowy Alanina Kwas D-glutaminowy Kwas diaminopimelinowy	Składniki peptydoglikanu
Kwasy 3-hydroksytłuszczowe Heptoza Kwas 2-keto-3-deoksyoktonowy	Lipopolisacharyd (LPS) bakterii gram-ujemnych
D-arabinitol	Drożdżaki z rodzaju <i>Candida</i> , np. <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i>

Związki chemiczne wymienione w Tabeli 1, będące unikalnymi dla niektórych drobnoustrojów, nazywamy markerami chemicznymi bakterii. Niektóre z nich, jak np. kwas muraminowy, mogą występować w wielu grupach drobnoustrojów, inne jak np. kwasy 3-hydroksytłuszczowe mogą być bardzo specyficzne dla określonej grupy bakterii gram-ujemnych.

Kwas muraminowy (kwas [2-amino-3-O-(1-karboxyetylo)-2-deoksy-D-glucozowy], nie spotykany nigdzie indziej w naturze, składnik peptydoglikanu prawie wszystkich bakterii (wyjątkiem są *Archaeobakterie* posiadające sztywną strukturę osłony zwaną pseudomureiną oraz *Mycoplasmatales* otoczone błoną cytoplazmatyczną zawierającą m.in. cholesterol), może służyć jako chemiczny marker wykrywania zanieczyszczeń bakteryjnych w procesach biochemicznych [12], lub zakażeń w schorzeniach reumatycznych [13, 14]. Wykrywany był on w kurzu środowiska naturalnego [15–17], jak również w tkankach ssaków [18–20].

Strukturę chemiczną tego związku pokazano na Rysunku 3.



Rysunek 3. Wzór strukturalny kwasu muraminowego  
Figure 3. The structural formula of muramic acid

Kwas ten posiada bardzo złożoną budowę chemiczną, zawiera trzy różne, polarne grupy funkcyjne ( $-OH$ ,  $-COOH$  oraz  $-NH_2$ ). Występuje on wyłącznie w drobnoustrojach i dlatego też wykrycie tego związku w badanej próbce pozwala jednoznacznie stwierdzić skażenie bakteriami. Ma to ogromne znaczenie praktyczne.

Poza wyżej wymienionymi, również inne markery chemiczne zostały zidentyfikowane w strukturach peptydoglikanu, lipopolisacharydach i fosfolipidach. Są to m.in. kwasy tłuszczowe, węglowodany, aminokwasy, a także lotne metabolity jak alkohole i krótko łańcuchowe kwasy tłuszczowe [21–30]. Krótko łańcuchowe kwasy tłuszczowe są stosowane do wykrywania i różnicowania bakterii [31–33].

Drugorzędowe, długołańcuchowe alkohole są charakterystycznymi markerami bakterii z rodzaju *Mycobacterium* [34–36], np. 2-eikozanol dla *Mycobacterium avium* [37].

Kwas 27-hydroksy-oktakozanowy, zawierający 28 atomów węgla w cząsteczce, jest typowym składnikiem lipidu A [38].

### 1.1 WYKRYWANIE SKAŻEŃ MIKROBIOLOGICZNYCH ŚRODOWISKA

Kontrolę skażeń mikrobiologicznych szeroko rozumianego środowiska naturalnego można prowadzić metodami klasycznymi, takimi jak np. LAL (ang. *Limulus Amebocyte Lysate Test*) [39, 40], immunologicznymi [radioimmunologicznymi (RIA), immunofluorescencyjnymi (IF), immunoenzymatycznymi (ang. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) [41], genetycznymi, polegającymi na identyfikacji ściśle dobranego fragmentu materiału genetycznego z użyciem techniki PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) lub przez hodowlę drobnoustrojów na odpowiednich podłożach (np. agarowych).

Alternatywną do metod klasycznych może być zastosowanie chromatografii gazowej i spektrometrii mas (GC-MS), chromatografii cieczowej i spektrometrii mas (HPLC/MS/MS) do monitorowania unikalnych markerów, związków chemicznych bakterii, nie występujących nigdzie indziej w naturze, a tym samym do wykrywania skażeń mikrobiologicznych nie tylko w szeroko rozumianym środowisku naturalnym (np. w kurzu, powietrzu, wodzie), ale również np. w materiałach opakowaniowych i opakowaniach przeznaczonych do kontaktu z żywnością.

Chromatografia gazowa (GC), sprzężona najczęściej ze spektrometrią mas (MS) jest szczególnie użyteczną metodą do wykrywania i oznaczania ilościowego markerów chemicznych bakterii. Wysoka czułość i specyficzność tego układu analitycznego umożliwia oznaczenie markerów bezpośrednio w próbkach klinicznych i środowiskowych, bez uprzedniej, często długiej hodowli metodą płytkową [42].

Oznaczanie markerów metodą chromatografii i spektrometrii mas (GC/MS) jest bardzo przydatne w wykrywaniu i identyfikacji niewielkiej liczby drobnoustrojów znajdujących się w próbce [43, 44].

Metodę tę zastosowano między innymi do szybkiego wykrywania *Mycobacterium xenopi* w wodzie pitnej, poprzez oznaczanie zawartości 2-dokozanolu, drugorzędowego alkoholu tłuszczowego, markera charakterystycznego dla tej bakterii [45]. Znajduje ona również zastosowanie w mikrobiologicznej diagnostyce klinicznej [46–57]. Pozwala ona wykrywać zanieczyszczenia bakteriami w tak skompli-

kowanych próbkach jak np. kurz z powietrza [5, 58, 59], w próbkach materiałów klinicznych, czy też w glebie [60–62].

Chlorowcowanie hydroksykwasów, cukrów, aminokwasów, czy też alkoholi pozwala na zastosowanie czułych i specyficznych metod detekcji jakimi są techniki ECD lub GC/MS/CI<sup>-</sup> [63, 64].

Rozwój innych, nowych technik analitycznych jak wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) sprzężoną ze spektrometrią mas (MS) umożliwia wykrywanie bardziej złożonych struktur komórki bakteryjnej jak fosfolipidy i triglicerydy [65]. Jednak najbardziej uniwersalną techniką w zastosowaniu do wykrywania i ilościowego oznaczania markerów bakterii okazała się być chromatografia gazowa w połączeniu ze spektrometrią mas.

## 2. CHROMATOGRAFIA GAZOWA SPRZEŻONA ZE SPEKTROMETRIĄ MAS (GC/MS) W BADANIU MARKERÓW CHEMICZNYCH ŚCIAN KOMÓRKOWYCH BAKTERII

Chromatografia gazowa (GC) wprowadzona do laboratoriów kilkadziesiąt lat temu jest obecnie najbardziej wszechstronnie wykorzystywaną techniką analityczną w różnych dziedzinach nauki dla rozdzielania związków chemicznych. Przy czym stosuje się szereg detektorów (np. FID, ECD, NPD itp.), charakteryzujących się często wysoką selektywnością i czułością. Jeśli zamiast klasycznych detektorów, wymienionych wyżej, w chromatografii gazowej użyjemy spektrometr mas, otrzymamy znacznie czulszy układ GC/MS dostarczający więcej informacji o analizowanej próbce, łącznie z absolutną identyfikacją obecnych w niej związków.

Związki opuszczające kolumnę chromatografu gazowego są wprowadzane, do utrzymywanej w wysokiej próżni (ok.  $10^{-5}$  Tora) komory, gdzie zachodzi ich jonizacja. Jony mogą powstawać w różny sposób w zależności od wymagań analitycznych oraz posiadanego sprzętu. Najczęściej stosowany jest sposób zderzania analizowanych związków ze strumieniem elektronów („electron impact”, EI<sup>+</sup>), wytwarzanych przez włókno renowe.

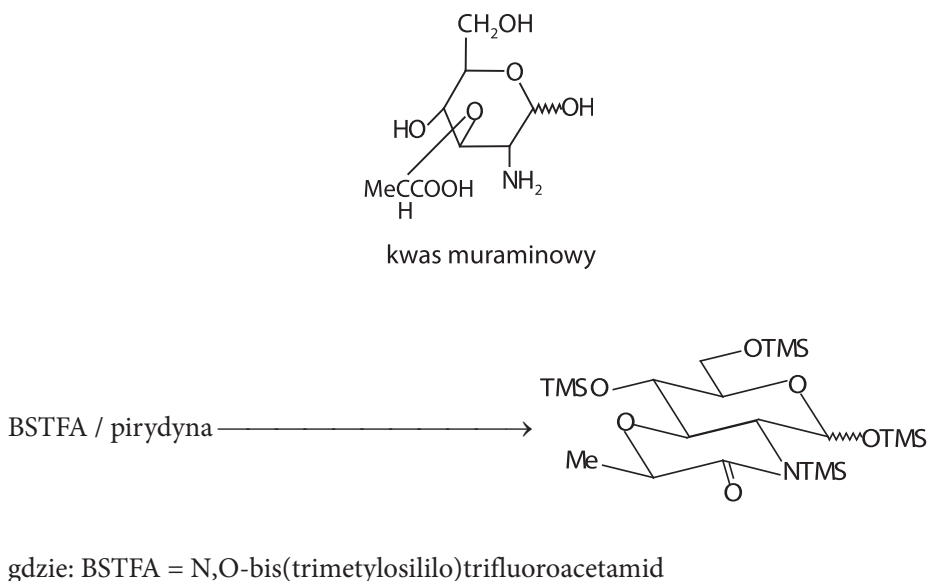
Jony są rozdzielane w analizatorze mas w zależności od stosunku ich masy do ładunku ( $m/z$ ), a następnie rejestrowane za pomocą powielacza elektronów. Typowym analizatorem jest kwadrupol, choć w przypadku markerów bakterii często stosowana jest pułapka jonowa [66] ze względu na swoją bardzo wysoką czułość [6].



### 3. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK KWASU MURAMINOWEGO DO ANALIZY METODĄ GC/MS – OTRZYMYWANIE POCHODNYCH TRIMETYLOSILILOWYCH (TMS)

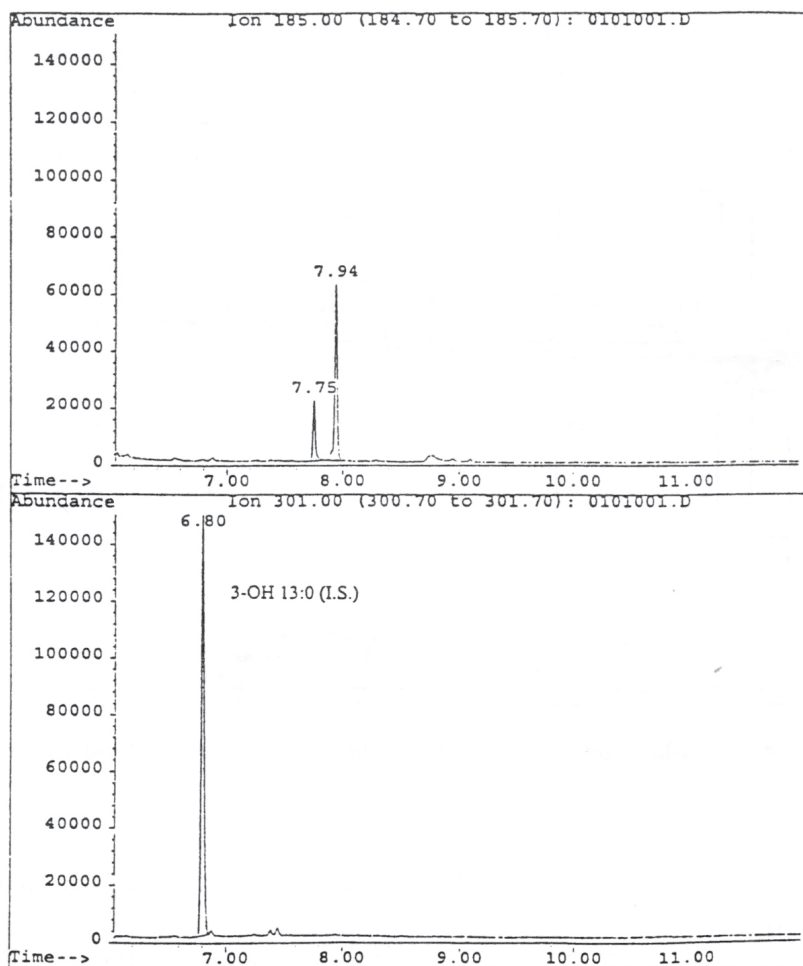
Próbki (np. bakterii, kurzu i innych matryc) do badań metodą GC/MS przygotowywano według procedury opisanej w pracy Mielniczuka i Pogorzelskiej [17]. Otrzymane pochodne TMS są trwałe w czasie długiego przechowywania (ponad miesiąc w temperaturze 4°C). Podobnie postępowano z wzorcem kwasu muraminowego (w zakresie stężeń 25–1000 ng).

Reakcja tworzenia pochodnej TMS kwasu muraminowego ma dość nieoczekiwany przebieg, gdyż zachodzi z cyklizacją i utworzeniem dodatkowego pierścienia laktamowego wg mechanizmu pokazanego na Rysunku 4 [6, 67].



Rysunek 4. Mechanizm powstawania pochodnej TMS kwasu muraminowego  
Figure 4. The mechanism of muramic acid TMS derivatisation

Próbki wzorca kwasu muraminowego do wykreślenia krzywych kalibracyjnych jak i pobrane z otoczenia analizowano za pomocą chromatografu gazowego wyposażonego w detektor mas (MSD). Związki były analizowane metodą EI w trybie monitorowania pojedynczych jonów (ang. *single ion monitoring*, SIM). Pochodna TMS kwasu muraminowego występuje na chromatogramie (Rys. 5) w postaci dwóch dobrze rozdzielonych związków o czasach retencji 7,75 i 7,94 min. (na dolnym chromatogramie znajduje się pik wzorca wewnętrznego – TMS pochodnej estru metyloвого kwasu 3-hydroksytridekanowego). Oznaczenia ilościowe pochodnych TMS kwasu muraminowego przeprowadza się monitorując jon  $m/z = 185$  [5, 17].

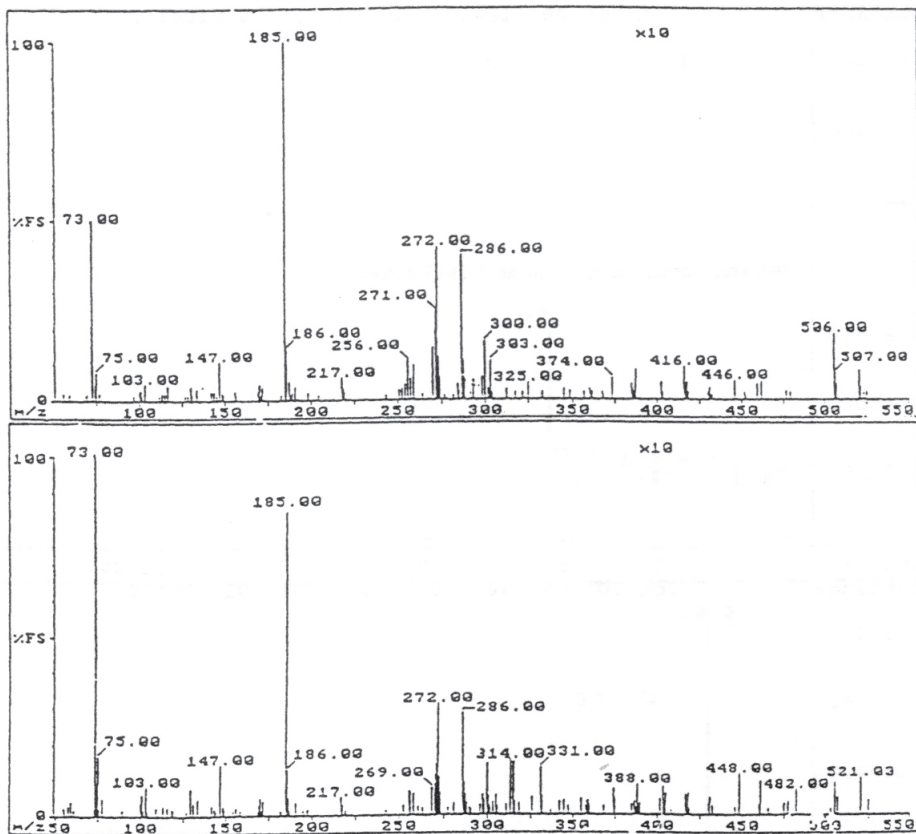


Rysunek 5. Chromatogram jonowy pochodnej trimetylosililowej kwasu muraminowego

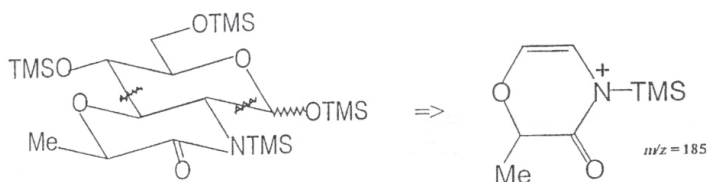
Figure 5. Ion chromatogram of muramic acid trimethylsilyl derivative

Oba piki są prawdopodobnie anomerami tworzącymi się na skutek obecności węgla anomerycznego  $C_1$  i mają one strukturę laktamu [6]. Występowanie kwasu muraminowego jako laktamu zostało opisane wcześniej [68–70]. Jest to również potwierdzone obecnością molekularnego jonu (M)  $m/z = 521$  i jonu  $m/z = 506$ , który jest związany z utratą przez TMS grupy metylowej (M-15). Oba związki mają bardzo podobne widma mas charakteryzujące się silnym jonem  $m/z = 185$  (Rys. 6), powstającym prawdopodobnie przez oderwanie m.in. dwóch grup  $-O(CH_3)_3Si$ , i jednej grupy  $-CH_2O(CH_3)_3Si$ . Struktura tego jonu (Rys. 7) została określona przez Bala i in. [71].

Dominującym jonem w rejonie niskich mas jest charakterystyczny jon o  $m/z = 73$  związany z obecnością grupy  $-(CH_3)_3Si$ .



Rysunek 6. Widma mas pochodnych trimetylosilowych dwóch anomerów kwasu muraminowego  
 Figure 6. Mass spectra of two anomers of muramic acid trimethylsilyl derivatives

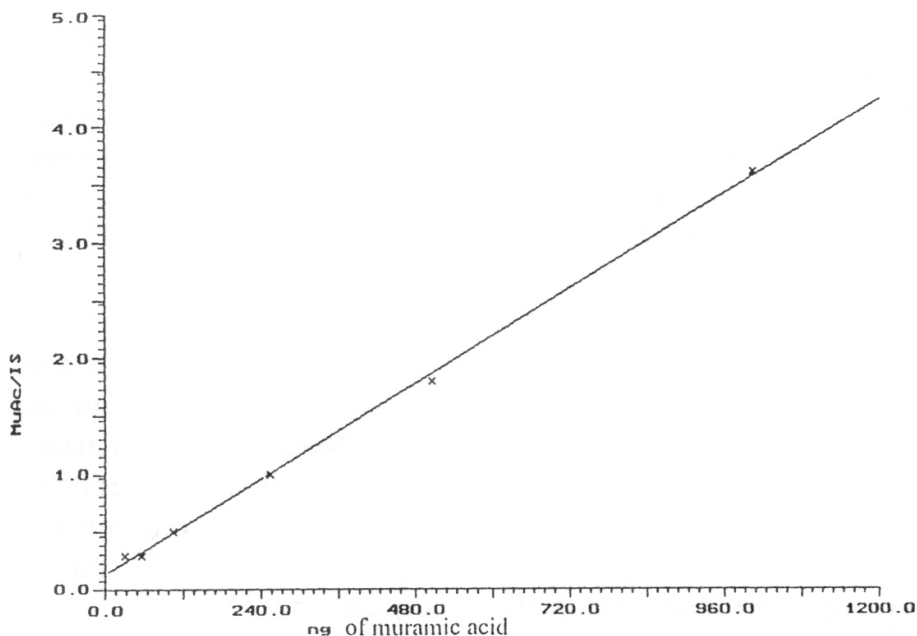


Rysunek 7. Mechanizm powstawania jonu  $m/z = 185$  z pochodnej TMS kwasu muraminowego  
 Figure 7. The mechanism of ion  $m/z = 185$  muramic acid TMS derivative formation

### 3.1. OBLICZANIE ILOŚCI KOMÓREK BAKTERII NA PODSTAWIE ZAWARTOŚCI PEPTYDOGLIKANU

W celu wykreślenia krzywej kalibracyjnej monitorowano jony:  $m/z = 301$ , dla pochodnej metylosililowej wzorca wewnętrznego 3-OH C13:O (3-OTMS-C13-COOCH<sub>3</sub>) oraz  $m/z = 185$ , dla pochodnej sililowej (TMS) kwasu muraminowego.

Krzywa kalibracyjna dla obliczeń ilościowych kwasu muraminowego (MuAc) jest liniowa w badanym zakresie stężeń 25–1000 ng (Rys. 8).



Rysunek 8. Krzywa kalibracyjna dla obliczeń ilościowych kwasu muraminowego

Figure 8. Calibration curve for quantitative calculations of the muramic acid concentration

Charakteryzuje się ona równaniem regresji:

$$y = 0,003x + 0,160,$$

gdzie:

$x$  = stężenie MuAc w badanej próbce (ng),

$y$  = stosunek pola jonu  $m/z$  185 dla MuAc do pola jonu  $m/z$  301 dla IS.

Znając stężenie kwasu muraminowego w badanej próbce, możliwe jest wyliczenie zawartości bakteryjnego peptydoglikanu (PG), wagi komórek bakteryjnych (MuAc stanowi około 7,7% wagi PG i około 0,5 % suchej masy komórek bakteryjnych [4]), jak również ilości komórek (średnia waga komórki bakteryjnej wynosi około  $3,55 \times 10^{-12}$  g [2]).

W tabeli poniżej podano przykłady zawartości MuAc, peptydoglikanu (PG), wagę komórek bakteryjnych (WBC) oraz ich ilość (QBC) w 1 mg badanej próbki (17).

Tabela 2. Przykładowe zawartości MuAc, peptydoglikanu (PG), waga komórek bakteryjnych (WBC) oraz ich ilość (QBC) w 1 mg badanej próbki

Table 2. Examples of muramic acid and peptidoglycan content, the weight of bacterial cells (WBC) and quantity (QBC) in 1 mg of the sample

Próbka	MuAc (ng)	PG (ng)	WBC (ng)	QBC
Kurz zebrany z plastiku (opakowanie znajdujące się w magazynie)	3,6	46,7	720,0	$203 \times 10^3$
Kurz zebrany z mebli laboratoryjnych	13,7	177,4	2732,0	$770 \times 10^3$

Uzyskane powyżej wartości, wskazują, że najmniej bakterii znajdowało się w zamkniętym magazynie z materiałami opakowaniowymi ( $203 \times 10^3$  komórek bakterii/mg kurzu), najwięcej na szafie stojącej na korytarzu ( $770 \times 10^3$  komórek bakterii/mg kurzu) co jest logicznie uzasadnione ciemnym i zamkniętym pomieszczeniem magazynowym.

Zawartość kwasu muraminowego w 1 mg suchej masy bakterii wynosiła odpowiednio: *E.coli*, 6,3  $\mu\text{g}$  (78,75  $\mu\text{g}$  PG/mg); *Ps.aeruginosa*, 1,4  $\mu\text{g}$  (17,50  $\mu\text{g}$  PG/mg) oraz *P.mirabilis*, 9,5  $\mu\text{g}$  (118,75  $\mu\text{g}$ PG/mg).

W wykonanej przez nas pracy kwas muraminowy oznaczano w komórkach takich bakterii jak *E.coli*, *P.mirabilis*, *P.aeruginosa*. Wybór takiego materiału badawczego nie był przypadkowy.

*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 ważny w przypadku zakażenia dróg moczowych. Bardzo rozpowszechniony w szpitalach (zakażenia wewnątrzszpitalne), łatwo namnaża się. Często 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.

## PODSUMOWANIE

Wiele symptomów chorobowych (np. alergie, astma i inne) może być wywołanych wdychaniem mikroorganizmów obecnych w środowisku. 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.

Kwas muraminowy, można oznaczyć ilościowo jako pochodną TMS stosując jako wzorzec wewnętrzny ester metylowy kwasu 3-OH 13:0, dodawany do próbki po hydrolizie i ekstrakcji ale przed silylacją. Jonem monitorowanym tego wzorca jest jon o  $m/z = 301$ . Jonem o największej abundancji pochodnej TMS kwasu muraminowego jest jon  $m/z = 185$ , który był użyty do obliczeń zawartości kwasu muraminowego w badanych próbkach środowiskowych i biologicznych (kurz, systemy klimatyzacyjne, itp.).

Można przypuszczać, że obserwowane na chromatogramie dwa piki pochodnej TMS kwasu muraminowego są prawdopodobnie spowodowane występowaniem dwóch anomerów związanych z centrum asymetrii na węglu  $C_1$ .

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Fox, G.E. Black, [w:] *Mass Spectrometry for the Characterization of Microorganisms*, Fenselau C. (Ed.), American Chemical Society, Washington, DC, 1994, Chapter 8, 107.
- [2] A. Fox, L. Wright, K. Fox, *J. Microbiol. Methods*, 1995, **22**, 11.
- [3] X. Zhang, W. Amelung, *Soil Biol. Biochem.*, 1996, **28**(9), 1201.
- [4] I. Elmroth, A. Fox, L. Larsson, *J. Chromatogr., Biomed. Sci. Appl.*, 1993, **628**, 93.
- [5] Z. Mielniczuk, E. Mielniczuk, L. Larsson, *J. Chromatogr., Biomed. Sci. Appl.*, 1995, **670**, 167.
- [6] K. Bal, L. Larsson, *J. Chromatogr., Biomed. Sci. Appl.*, 2000, **738**, 57.
- [7] A. Saraf, L. Larsson, *J. Mass Spectrom.*, 1996, **31**, 389.
- [8] *Basic Microbiology*, 7th edition. Harper Collins Publisher, 1992 Chapter 3, Bacterial Morphology str. 48.
- [9] Z. Markiewicz, *Struktura i funkcje osłon bakteryjnych*, Wydawnictwa Naukowe PWN, Warszawa 1993, str. 45.
- [10] *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, R.E. Buchanan, N.E. Gobbons. (Eds), 8<sup>th</sup> ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1974.
- [11] R. Dziarski, *The 70 kDa peptidoglycan/lipopolisaccharide receptor*, [w:] *Bacterial endotoxin: recognition and effector mechanisms*, Levin J. (Ed.), Experta Medica, 1993 (Proceedings of the 2nd Congress of the International Endotoxin Society), Vienna, 17–20 August 1992.
- [12] I. Elmroth, *Use of chromatography and mass spectrometry for detection of bacterial contamination in biotechnological processes*. Praca doktorska, 1993, Uniwersytet w Lund, Szwecja.
- [13] D.G. Pritchard, R.L., Settime, J.C. Bennett, *Arthritis and Rheumatism*, 1980, **23**, no 5, 608.
- [14] B. Christensson, J. Gilbert, A. Fox, S.L. Morgan, *Arthritis Rheumatism*, 1989, **32**, 1268.
- [15] R.H. Findlay, D.J.W. Moriarty, D.C. White, *Geomicrobiol. J.*, 1983, **3**, 135.
- [16] A. Fox, R.M.T. Rosario, L. Larsson, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, No. 12, 4354.
- [17] Z. Mielniczuk, Z. Pogorzelska, *Packag. Technol. Sci.*, 2002, **15**, 47.
- [18] A. Fox, J. Schwab, T. Cochran, *Infect. Immun.*, 1980, **526**, 29.
- [19] J. Gilbert, A. Fox, R.S. Whiton, S.L. Morgan, *J. Microbiol. Methods*, 1986, **5**, 271.
- [20] J. Gilbert, A. Fox, *Infect. Immun.* 1987, **55**, 1526.

- [21] A. Fox, S.L. Morgan, *The chemotaxonomic characterization of microorganisms by capillary gas chromatography and mass spectrometry*, [w:] *Instrumental methods for rapid microbiological analysis*, Nelson W.H. (Ed.), Verlag Chemi. Deerfield beach, Florida, 1985, str. 135.
- [22] A. Sonesson, L. Larsson, A. Fox, G. Westerdahl, G. Odham, J. Chromatogr. Biomed. Applic. 1988, **431**, 1.
- [23] S.K. Maitra, R. Nachum, F.C. Pearson., Appl. Environm. Microbiol., 1986, **52**, 510.
- [24] D.B. Druecker, *Analysis of structural components of microorganisms by gas chromatography*, Cambridge University Press, Cambridge, 1981.
- [25] E. Jantzen, *Analysis of cellular components in bacterial classification and diagnosis*, [w:] *Gas chromatography mass spectrometry. Application in microbiology*, Odham G., Larsson L., Mardh P.A. (Eds.), Plenum Press, New York, 1984.
- [26] E. Jantzen, K. Bryn, *Whole cell and lipopolysaccharide fatty acids and sugars of gram-negative bacteria*, [w:] *Chemical methods in bacterial systematics*, Goodfellow M., Minnikin D.E. (Eds.), The Society for Applied Bacteriology, Technical Series, No. 20, Academic Press, London, 1985.
- [27] E. Jantzen, K. Bryn, *Analysis of cellular constituents from Gram-negative bacteria*, [w:] *Chemical methods in prokaryotic systematic*, Goodfellow M., O'Donnell A.G., (Eds.), John Wiley & Sons, Chichester, 1994.
- [28] J. Gilbert, A. Fox, Insect. Immun., 1987, **55**, 1526.
- [29] L. Larsson, G. Odham, G. Westerdahl, B. Olsson, J. Clin. Microbiol., 1987, **25**, 893.
- [30] D.C. White, *Analysis of microorganisms in terms of quantity and activity in natural environments*, [w:] *Microbes in their natural environments*, Slater J.H., Whittenbury R., Wimpenny J.W.T. (Eds.), Thirty four symposium of the society for general microbiology, Cambridge University Press, Cambridge, 1983.
- [31] L. Larsson, E. Holst, Acta Path. Immunol. Scand. Sect. B., 1982, **90**, 125.
- [32] M.F. De La Cochetier-Collinet, L. Larsson, J. Chromatogr. Biomed. Appl., 1984, **305**, 178.
- [33] J.K. McLaughlin, C.L. Meyer, E.T. Papoutsakis, Biotechnol. Bioeng., 1985, **27**, 1246.
- [34] J. Jiminez, L. Larsson, J. Clin. Microbiol., 1986, **24**, 844.
- [35] E. Jantzen, T. Tangen, J. Eng, Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand., 1989, **97**, 1037.
- [36] M. Daffe, M.A. Laneelle, C. Asselineau, V. Levy-Frebault, H. David, Ann. Microbiol. B., 1983, **134**, 241.
- [37] S. Alugupalli, Z. Mielniczuk, L. Larsson, J. Microbiol. Meth., 1992, **15**, 229.
- [38] U.R. Baht, R.W. Carlson, M. Busch, H. Mayer, Inter. J. System. Bacteriology, 1991, **41**, 213.
- [39] J.F. Cooper, J. Levin, H.N. Jr. Wagner, J. Lab. Clin. Med., 1971, **78**, 138.
- [40] P. Friberger, M. Knos, L. Mellstam, *A quantitative endotoxin assay utilizing LAL and a chromogenic substrate*, [w:] *Endotoxins and their detection with the Limulus ameocyte lysate test*, Watson S.W., Levin J., Novitsky T.J. (Eds.), Prog. Clin. Biol. Res., vol. 93, Alan R. Liss, New York, 1982.
- [41] G.H. Zhang, L. Beak, C. Koch, J. Clin. Microbiol., 1988, **26**, 1464.
- [42] L. Larsson, Acta Pathologica Micobiol. Immun. Scand. (APMIS), 1994, **102**, 161.
- [43] A. Fox, J. Gilbert, S.L. Morgan, *Analytical microbiology: a perspective*, [w:] *Analytical microbiology methods. Chromatography and mass spectrometry*, Fox A., Morgan S.L., Larsson L., Odham G., (Eds), Plenum Press, New York, 1990.
- [44] S.L. Morgan, A. Fox, J. Gilbert, J. Microbiol. Meth., 1989, **9**, 57.
- [45] S. Alugupalli, L. Larsson, M. Slosarek, M. Jaresova, Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58**, 3538.
- [46] L. Larsson, P.A. Mardh, G. Odham, G. Westerdahl, Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 1981, **89**, 245.
- [47] L. Larsson, G. Odham, G. Westerdahl, B. Olsson, J. Cin. Microbiol., 1987, **25**, 893.
- [48] J. Roboz, R. Suzuki, J.F. Holland, J. Clin. Microbiol., 1980, **12**, 594.

- [49] H. Muranishi, M. Nakashima, R. Isobe, T. Ando, N. Shigematsu, *Diagnost. Microbiol. Infect. Dis.*, 1990, **13**, 235.
- [50] J. Roboz, O. Yu, J.F. Holland, *J. Microbiol. Methods*, 1992, **15**, 207.
- [51] B. Savić, U. Sjöbring, S. Alugupalli, L. Larsson, H. Míórner, *J. Infect. Dis.*, 1992, **166**, 1177.
- [52] D.C. White, *Hydrobiol. Beih. Efgbn. Limnol.*, 1988, **31**, 1.
- [53] A. Sonesson, L. Larsson, A. Schutz, L. Hagmar, T. Hallberg, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**, 1271.
- [54] A. Tunlid, D.C. White, *Use of lipid biomarkers in environmental samples*, [w:] *Analytical microbiology methods. Chromatography and mass spectrometry*, Fox A., Morgan S., L., Larsson L., Odham G., (Eds), Plenum Press, New York, 1990, str. 259.
- [55] P.D. Nichols, J.M. Henson, C.P. Antworth, J. Parsons, J.T. Wilson, D.C. White *Environ. Toxicol. Chem.*, 1987, **6**, 89.
- [56] G. Odham, A. Tunlid, G. Westerdahl, P. Marden, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, **52**, 905.
- [57] R.H. Findlay, D.J.W. Moriarty, D.C. White, *Geomicrobiol. J.*, 1983, **3**, 135.
- [58] *Gas chromatography-mass spectrometry. Application in microbiology*, G. Odham, L. Larsson, P.A. Mardh (Eds.), Plenum Press, 1984.
- [59] S.L. Morgan, A. Fox, J. Gilbert, *J. Microbiol. Meth.*, 1989, **9**, 57.
- [60] B. Christensson, J. Gilbert, A. Fox, S.L. Morgan, *Arthritis Rheum.*, 1989, **32**, 1268.
- [61] L. Zelles, *Biol. Fert. Soils*, 1988, **6**, 125.
- [62] G. Odham, A. Tunlid, G. Westerdahl, L. Larsson, J.B. Guckert, D.C. White, *J. Microbiol. Methods*, 1985, **3**, 331.
- [63] I. Elmroth, A. Fox, L. Larsson, *J. Chrom.*, 1993, **628**, 93.
- [64] A. Fox, R.M.T. Rosario, L. Larsson, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 4354.
- [65] M. Cole, C.G. Enke, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 1032.
- [66] J. Allison, R.M. Stepnowski, *Anal. Chem.*, 1987, **59**, 1072A.
- [67] K. Bal, Z. Mielniczuk, *Zastosowanie tandemowej spektrometrii mas w pułapce jonowej do analizy chemicznych markerów bakterii*” I Ogólnopolska Szkoła Spektrometrii Mas, Szczyrk, 6–9 maja 2001.
- [68] P.M. Caroll, *Nature*, 1963, **197**, 694.
- [69] D.L. Popham, J. Helin, C.E. Costello, P. Stelow, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1996, **93**, (26), 15406.
- [70] A.D. Warth, J.L. Strominger, *J. Biochemistry*, 1972, **11** (8), 1389.
- [71] K. Bal, L. Larsson, E. Mielniczuk, Z. Mielniczuk, *J. Microbiol. Meth.*, 2002, **48**, 267.

Praca wpłynęła do Redakcji 30 listopada 2011