



Porównanie technik spektroskopii FTIR stosowanych do identyfikacji materiału biologicznego

MONIKA MULARCZYK-OLIWA, MIROSŁAW KWAŚNY,
MAKSYMILIAN WŁODARSKI, MIRON KALISZEWSKI

Wojskowa Akademia Techniczna, Instytut Optoelektroniki,
00-908 Warszawa, ul. S. Kaliskiego 2

Streszczenie. Spektroskopia podczerwieni FTIR była wielokrotnie demonstrowana przez liczne zespoły badawcze jako jedna z głównych metod identyfikacji i klasyfikacji materiału biologicznego, jakim są żywe bakterie oraz ich spory. W niniejszej pracy porównano techniki, którymi dysponuje spektroskopia FTIR: klasyczną technikę transmisyjną, technikę wielokrotnego wewnętrznego odbicia — *Horizontal Attenuated Total Reflectance* (HATR) oraz technikę dyfuzyjnego rozproszenia — *Diffuse Reflectance Infra-red Fourier Transform* (DRIFT). Powyższe techniki zastosowano do analizy materiału biologicznego: bakterii i ich sporów, podłoża dla bakterii, pyłków, aminokwasów i białek. Stwierdzono powtarzalność wyników badań tej samej substancji wykonanych trzema technikami. Techniki HATR i DRIFT mogą stanowić alternatywę do tradycyjnej techniki transmisyjnej ze względu na możliwość bezpośredniego pomiaru materiału biologicznego bez wcześniejszej obróbki. Na podstawie analizy widm uzyskanych za pomocą HATR i DRIFT popartej dodatkowo analizą statystyczną — analizą głównych składowych (PCA), stwierdzono przydatność technik w rozróżnianiu żywych bakterii od ich form przetrwalnikowych oraz podłoża.

Słowa kluczowe: spektroskopia FTIR, HATR, DRIFT, bakteria żywa, spory

Symbole UKD: 579.6

1. Wstęp

Bioterroryzm łączy problem społeczny, jakim jest terroryzm, z problemem zdrowotnym, który jest wyzwaniem dla medycyny i nauki. Szczególnie pod koniec XX i na początku XXI wieku problem ten nasilił się z powodu zwiększonej często-

tliwości i skali ataków terrorystycznych, co przy ogólnie niskim koszcie produkcji broni biologicznej i stosunkowo prostym procesie jej wytwarzania, przyczyniło się do tego, że świat zaczął się zastanawiać nad tym, jak przeciwdziałać powstawaniu tejże broni. Najważniejszym zadaniem w trakcie przygotowywania się do obrony przed bioterroryzmem jest możliwość szybkiej identyfikacji czynników biologicznych, m.in. bakterii i ich form przetrwalnikowych.

Idealna metoda, służąca odróżnieniu bakterii od ich sporów oraz podłoża, na jakich były hodowane, wykazująca różnice pomiędzy rodzajami, a nawet określonymi szczepami bakterii, powinna spełniać szereg parametrów. Przede wszystkim podczas ataku czynnikiem biologicznym najważniejsza jest szybkość rozpoznania, z jakim czynnikiem mamy do czynienia, a zatem podstawowym parametrem dla metody identyfikującej i różnicującej bakterie powinna być szybkość. Tradycyjne różnicowanie bakterii poprzez posiewy wymaga godzin, a nawet dni, dlatego na potrzeby walki z bioterroryzmem wymagana jest alternatywna, szybsza metoda identyfikacji. Nie bez znaczenia okazuje się także minimalne przygotowanie materiału do badania, im mniej obróbki toksycznej substancji, tym mniejsza inwazyjność. Dobra metoda identyfikacji powinna umożliwiać bezpośredni pomiar materiału (bez dodatkowej obróbki i wprowadzania dodatkowych reagentów), powinna być w pełni zautomatyzowana, nieniszcząca struktury badanej materii, dająca pomiar zarówno jakościowy, jak i ilościowy. Biorąc pod uwagę względy ekonomiczne i skalę problemu bioterroryzmu nie bez znaczenia pozostają też niskie koszty związane z metodą [1, 2].

Identyfikacja bakterii i ich sporów za pomocą metody analitycznej, spełniającej wyżej wymienione parametry, nie jest sprawą prostą. W literaturze opisano wiele metod identyfikacji materiału biologicznego, które z dobrym rezultatem mogą służyć rozróżnianiu bakterii i sporów: spektroskopia FTIR w średnim obszarze podczerwieni, fotoakustyczna IR, spektroskopia Ramana, MALDI, MALDI-TOF MS, TOF-SIMS [3-17].

W niniejszej pracy podjęto próbę różnicowania czynnika biologicznego za pomocą technik, jakimi dysponuje spektroskopia IR: techniki transmisyjnej, techniki wielokrotnego wewnętrznego odbicia — *Horizontal Attenuated Total Reflectance* (HATR) oraz techniki dyfuzyjnego rozproszenia — *Diffuse Reflectance Infra-red Fourier Transform* (DRIFT). W celach porównawczych za pomocą wyżej wymienionych technik z zakresu średniej podczerwieni dokonano pomiarów widm substancji biologicznych: bakterii i ich sporów, podłoża dla bakterii, pyłków, aminokwasów i białek. Różnicowanie wymienionych grup materiałów poparto analizą statystyczną — analizą głównych składowych (PCA). Otrzymane widma w porównaniu z wynikami badań substancji białkowych licznie publikowanymi w literaturze [18-28] potwierdzają przydatność spektroskopii FTIR jako jednej z czołowych metod w różnicowaniu struktury małych molekuł białkowych [29], w szczególności zaś bakterii wegetatywnych i ich sporów oraz podłoża [30]. Stwierdzono powtarzalność wyników badań tej samej substancji wykonanych trzema technikami. Techniki HATR

i DRIFT mogą stanowić alternatywę dla tradycyjnej techniki transmisyjnej ze względu na możliwość bezpośredniego pomiaru materiału bez wcześniejszej obróbki oraz użycia małej ilości próbki. Zastosowane techniki gwarantują szybkość i nieinwazyjność pomiaru, spełniają więc wszelkie parametry, jakie wymagane są w stosunku do metod różnicujących czynnik biologiczny w dobie bioterroryzmu.

2. Materiały i metody pomiaru

Pomiarów widm dokonano za pomocą spektrometru furierowskiego FTIR GX Optica firmy Perkin Elmer, w zakresie odpowiadającym średniej podczerwieni 4000-650 cm^{-1} , z rozdzielczością 4 cm^{-1} . Zastosowano trzy techniki pomiarowe, jakimi dysponuje spektroskopia IR:

- transmisyjną (w modzie transmisyjnym %T),
- odbiciową (używając przystawki HATR),
- rozproszeniową (używając przystawki DRIFT).

Obie przystawki firmy Perkin Elmer należą do wyposażenia aparatu.

Materiałem do badań były próbki substancji biologicznej, zarówno w formie stałej, jak i ciekłej. W celach porównawczych użyto substancji białkowych należących do różnych typów: białek, aminokwasów, bakterii wegetatywnych, sporów, podłoża. Materiał badany zestawiono w tabeli (tab. 1).

Substancje badane tradycyjną techniką transmisyjną przygotowywano w formie tabletek z KBr i mierzono w modzie transmisyjnym. Metodyka pomiaru substancji badanych technikami DRIFT i HATR odpowiadała wybranej technice i została opisana poniżej.

TABELA 1

Materiały użyte do badań

| | |
|----------------------|---|
| Aminokwasy | Tryptofan L-fenylalanina L-treonina Tyrozyna |
| Białka | Albumina wołowa Kazeina Kolagen Żelatyna γ -globuliny Albumina z jaja kurzego |
| Bakterie spory | BG spory (Edgewood) BT spory (WIHE) BT spory (PvTT) |
| Bakterie wegetatywne | BG (WIHE) E. coli (WIHE) |

cd. tabeli 1

| | |
|---------|--|
| Podłoża | Agar Blood agar base Nutrient broth Luria broth |
| Pyłki | Bermuda grass smut — spor Kukurydza — pyłek Johnson grass smut — spor Walnut — pyłek Bermuda grass — pyłek Paper mulberry — pyłek Pecan — pyłek Ragweed — pyłek |
| Inne | Lakcid Ninhydryna Pepsyna Ryboflawina Bakteriofag MS1 |

2.1. Technika odbicia rozproszonego (DRIFT)

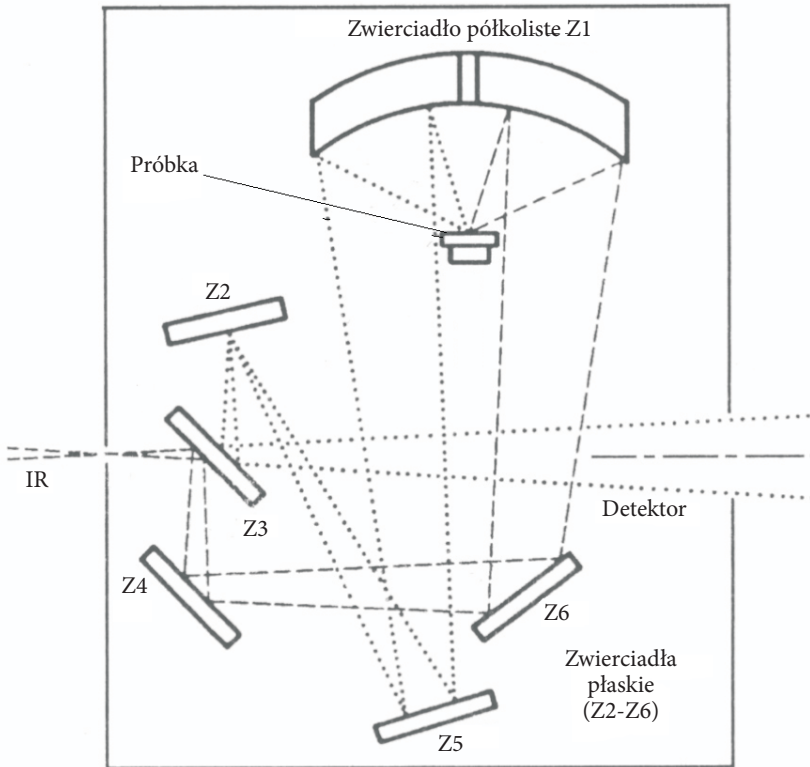
2.1.1. Podstawy teoretyczne techniki DRIFT

Technika odbicia rozproszonego stosowana jest najczęściej do pomiaru widm materiałów stałych bądź sproszkowanych, dla których użycie klasycznej techniki transmisyjnej staje się kłopotliwe bądź niemożliwe. Do powyższej grupy zalicza się substancje:

- słabo absorbujące promieniowanie IR,
- silnie rozpraszające promieniowanie IR,
- wrażliwe na przygotowania w formie pastylek z KBr.

W technice rozproszeniowej promieniowanie IR padające na badany materiał ulega zarówno odbiciu rozproszonemu (dyfuzyjnemu), jak i odbiciu zwierciadlanemu (spekularnemu), gdzie kąt padania jest równy kątowi odbicia. Otrzymane widmo odbiciowe (w %R) charakteryzuje więc zarówno promieniowanie rozproszone przez próbkę, jak i odbite kierunkowo od jej powierzchni. Składowa odbicia kierunkowego jest wynikiem niejednorodności próbki, gdy badana substancja nie jest rozdrobniona jednolicie, promieniowanie IR odbija się kierunkowo od jej większych cząstek. W przypadku próbki jednorodnej składowa kierunkowa jest nieskończenie mała i można ją zaniedbać, wtedy widmo odbiciowe (%R) charakteryzuje jedynie promieniowanie rozpraszane i jest porównywalne z widmem transmisyjnym (%T). Składowa odbicia rozproszonego jest skutkiem wnikania promieniowania IR w głąb analizowanego materiału. Promieniowanie, przechodząc przez materiał, ulega licznym załamaniom, absorpcji, odbiciu, ugięciu, zostaje więc wypromieniowane

we wszystkich kierunkach nim ponownie osiągnie powierzchnię. Wypromieniowane rozproszone światło jest zbierane przez półkolistwe zwierciadło i kierowane do detektora. Kąt padania promieniowania na zwierciadło półkolistwe wynosi 38° , co redukuje do około 5% wpływ składowej kierunkowej w widmie, która może pojawić się na skutek odbicia zwierciadlanego od kryształków KBr. Schemat zamieszczony na rysunku (rys. 1) przedstawia drogę optyczną w przystawce DRIFT.



Rys. 1. Schemat przystawki odbiciowej DRIFT

Wielkość promieniowania padającego na detektor jest funkcją stężenia badanego materiału. Powyższe stwierdzenie wywodzi się z teorii Kubelki-Munka, która jest teoretyczną podstawą dla techniki odbicia rozproszonego. Teoria odnosi się do substancji nieskończenie mocno jednolitych, wykazujących słabą absorpcję w zakresie promieniowania IR i zakłada zależność intensywności pasm w widmie od stężenia badanej substancji. Funkcja Kubelki-Munka ma postać:

$$F(R_{\infty}) = (1 - R_{\infty})^2 / 2 R_{\infty} = K/S, \quad (1)$$

gdzie: R_{∞} — współczynnik odbicia dla powłok nieskończenie mocno jednolitych;
 K — współczynnik absorpcji (proporcjonalny do stężenia badanej substancji, dla niskich stężeń $K = 2,303 \cdot a \cdot c$, gdzie a — absorpcyjność badanej substancji, c — stężenie);
 S — współczynnik rozproszenia.

Powyższa liniowa zależność pomiędzy funkcją Kubelka-Munk (R_{∞}) a stężeniem badanego materiału występuje, gdy spełnione są określone warunki:

- materiał jest jednolicie sproszkowany, wykazuje słabą absorpcję i silne rozpraszanie w zakresie promieniowania IR,
- badana substancja jest wymieszana z matrycą nieabsorbującą IR, np. proszek KBr, KCl,
- wartość współczynnika rozpraszania S musi być stała dla całego widma i nie ulega zmianie wraz ze zmianą stężenia substancji badanej,
- wartość składowej odbicia kierunkowego w widmie powinna mieć jak najmniejszą wartość, tak by można było ją pominąć [31].

2.1.2. Wady i zalety techniki w porównaniu z klasyczną techniką transmisyjną

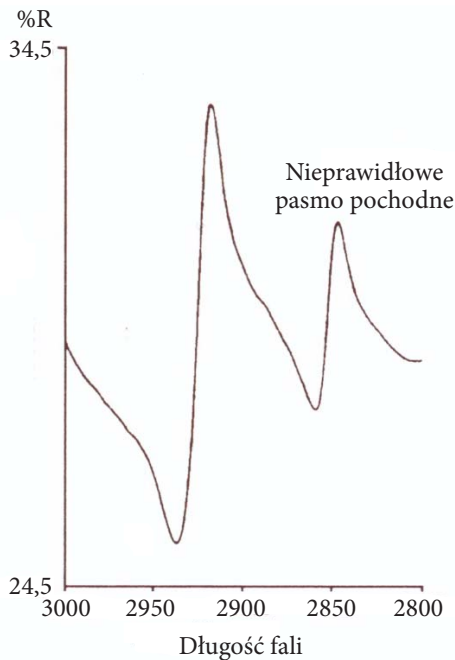
Podstawową zaletą techniki jest możliwość pomiaru próbek stałych w różnej formie (proszków, osadów z roztworów, naniesionej warstwy aerozoli, substancji lepkich lub woskowatych) bez specjalnego ich przygotowania. W metodzie transmisyjnej istnieje konieczność rozdrabniania badanego materiału, dokładnego mieszania z KBr i prasowania pod ciśnieniem do formy tabletek. Taka preparatyka może doprowadzić do niszczenia struktury badanej substancji, co powoduje, że pomiar transmisyjny staje się niewiarygodny. W technice DRIFT istnieje kilka sposobów pomiaru:

- w naczyniu pomiarowym ze sproszkowanym KBr,
- na podkładkach lub patyczkach pokrytych warstwą materiału ściernego silnie odbijającego promieniowanie (tzw. technika ścierania próbki).

Pomiar w naczyniu pomiarowym ze sproszkowanym KBr nie wymaga prasowania pod ciśnieniem, badany materiał musi być jedynie wymieszany z KBr i luźno umieszczony w naczyniu, co pozwala uniknąć polimorficznych zmian w strukturze krystalicznej. Pomiar na podkładkach lub pałeczkach pokrytych aluminium umożliwia pobieranie próbki stałej poprzez zdrapywanie szorstką powierzchnią podkładki niewielkiej ilości materiału badanego. Ten sposób pobierania materiału umożliwia zastosowanie bardzo niewielkiej ilości substancji badanej (na podkładkach), a nawet ilości mikroskopijnej (na patyczkach). Pomiar tak małych ilości jest możliwy dzięki wysokiej czułości metody DRIFT.

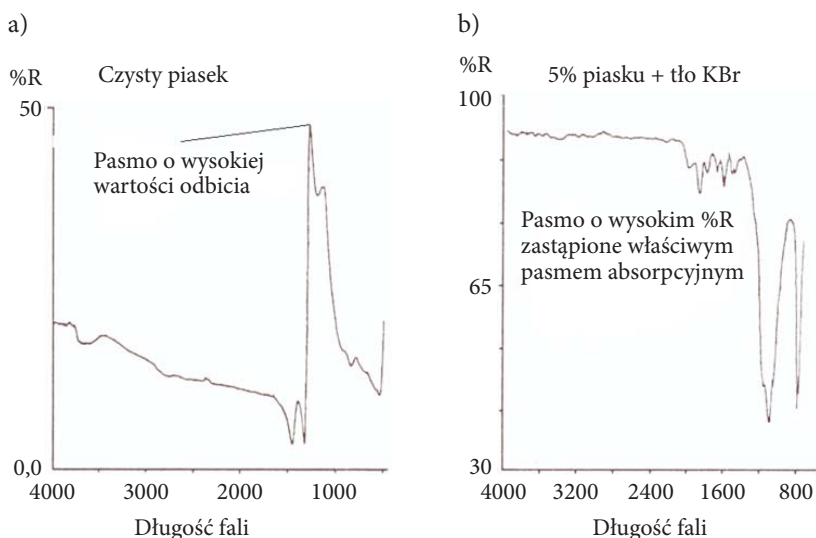
Na podkładki z materiałem silnie odbijającym można także nanosić substancję w postaci roztworu, po odparowaniu uzyskujemy warstwę osadu, którego widmo wyznaczamy techniką DRIFT. Podobnie na podkładki bądź patyczki można nanosić aerozole, a czułość techniki DRIFT czyni ją odpowiednią dla pomiarów substancji w takiej formie.

Najważniejszą wadą techniki DRIFT są interferencje związane z pojawieniem się w widmie odbiciowym składowej odbicia kierunkowego, które zakłócają pasma właściwe dla substancji badanej. Odbicie kierunkowe pojawia się wtedy, gdy próbka nie jest jednolicie rozdrobniona w całej swej objętości. W przypadku substancji słabo absorbujących (większość związków organicznych) w widmie odbiciowym na skutek odbicia kierunkowego pojawiają się dodatkowe pasma pochodne do pasm charakterystycznych dla mierzonej substancji. Przykład takiego pochodnego pasma widać w widmie warstwy polietylenu na poniższym rysunku (rys. 2).



Rys. 2. Pasma charakterystyczne dla warstwy polietylenu oraz pochodne nieprawidłowe pasmo absorpcyjne

Gdy substancja wykazuje silną absorpcję (czyste substancje nieorganiczne) składowa odbicia kierunkowego powoduje pojawianie się w widmie badanej substancji wąskich pasm o wysokiej wartości odbicia (rys. 3), które nakładają się i zaciemniają właściwe pasma absorpcyjne.



Rys. 3. Widmo czystego piasku z pasmem nieprawidłowym (a) oraz widmo piasku z dodatkiem tła wraz z charakterystycznymi pasmami absorpcyjnymi (b)

Wpływ składowej odbicia kierunkowego, biorąc pod uwagę okoliczności, w jakich to odbicie powstaje, można wyeliminować, stosując poniższe zasady:

1. Próbkę należy jednolicie rozdrobnić, tak aby wielkość ziarna zawierała się w granicach 10-20 μm , co pozwala wyeliminować odbicie kierunkowe od większych kryształków w próbce.
2. Substancję badaną należy wymieszać z substancją słabo absorbującą promieniowanie IR (np. KCl lub KBr). Dodatek około 5% substancji badanej do 95% nieabsorbującego KBr lub KCl umożliwia lepszą penetrację promieniowania w głąb próbki, dzięki czemu więcej promieniowania będzie absorbowane przez substancję badaną bądź ulegnie rozproszeniu od jej kryształków, niż zostanie odbite kierunkowo.
3. Próbkę należy umieścić luźno w naczyniu pomiarowym; ciasne upakowanie i wyrównywanie powierzchni próbki w naczyniu może powodować takie ułożenie powierzchniowych kryształków substancji, że padające promieniowanie będzie w mniejszym stopniu rozpraszane, a bardziej odbijane kierunkowo od skupionych na powierzchni cząstek substancji badanej [31].

2.1.3. Metodyka pomiaru

2.1.3.1. Pomiar w naczyniu pomiarowym

Badaną substancję w postaci proszku należy dodać w ilości 5% do rozartego KBr. Całość należy wymieszać, w miarę potrzeby utrzczyć w moździerzu, aby wielkość

ziarna tak przygotowywanej próbki była w granicach 10-20 μm . Próbkę w sposób luźny i bez upakowywania umieszcza się w naczyniu pomiarowym. Stosowanie powyższych zasad odnośnie do przygotowania próbki pozwoli uniknąć interferencji związanych z odbiciem kierunkowym. Promieniowanie IR, padając na naczynie pomiarowe z badaną substancją, nie może ulec odbiciu od ścianek naczynia. W technice DRIFT stosuje się takie rozwiązanie odnośnie do zwierciadeł, aby kąt padania promieniowania wynosił 38° , co zapobiega padaniu promieniowania na ścianki naczynia i jednocześnie niweluje odbicie od tych ścianek. Dodatkowo stosowane są naczynia pomiarowe o odpowiedniej szerokości i głębokości. Głębokość 3 mm uniemożliwia dotarcie promieniowania do dna naczynka, ale jednocześnie zapewnia dobrą penetrację promieniowania w głąb próbki.

Naczynia pomiarowe: jedno z nieabsorbującym materiałem tła (KBr), drugie z badaną substancją wymieszaną z KBr umieszcza się w przystawce zamontowanej w komorze pomiarowej spektrometru, odpowiednio w pozycji: tło i próbka. Otrzymane widmo podzielone przez widmo tła — KBr jest widmem odbiciowym %R substancji badanej.

2.1.3.2. Technika ścierania próbki

Substancje w postaci stałej, których nie można rozdrobnić bądź substancje woskowate lub lepkie, z których nie można uzyskać cienkiego filmu mierzy się, używając specjalnych podkładek ściernych. Podkładka pokryta jest warstwą materiału ściernego (np. aluminium) silnie odbijającego promieniowanie. Substancję badaną nanosi się na podkładkę poprzez pocieranie, uzyskując w ten sposób cienką warstwę składającą się z jednolitych, niewielkich cząstek badanego materiału. Promieniowanie padające na podkładkę z naniesioną warstwą materiału wnika pomiędzy cząstki substancji, analogicznie jak w przypadku substancji sproszkowanych w naczyniu pomiarowym. Technika ścierania próbki umożliwia pomiar bez jakiegokolwiek wcześniejszego przygotowania. Otrzymane widmo jest analogiczne do widma transmisyjnego, ponieważ składową odbicia kierunkowego można zaniedbać (próbka jest naniesiona jednorodnie) i widmo charakteryzuje jedynie promieniowanie rozproszone dyfuzyjnie.

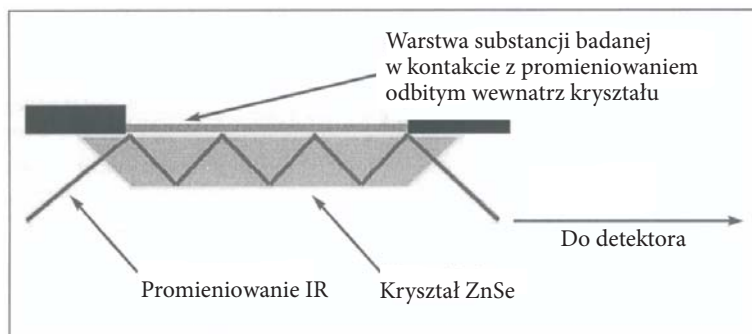
Substancję badaną można nanosić także na patyczki z warstwą ściernego aluminium. Zaletą patyczków w stosunku do podkładek jest bardzo niewielka ilość substancji badanej, jaka może być użyta do pomiaru [31].

2.2. Technika wielokrotnego wewnętrznego odbicia (HATR)

2.2.1. Podstawy teoretyczne techniki HATR

Technika HATR polega na pomiarze widm materiałów w postaci filmu o określonej grubości, naniesionych na transmisyjny dla promieniowania IR kryształ, o wysokiej gęstości optycznej. Takie rozwiązanie umożliwia wyznaczenie widm

substancji w stanie ciekłym oraz w formie past i żeli. Badana substancja w postaci filmu, mająca współczynnik załamania n_1 przylega do powierzchni kryształu o współczynniku załamania n_2 . Na powierzchnię graniczną kieruje się promieniowanie podczerwone, które wchodząc od strony ośrodka o większej gęstości optycznej (kryształ o współczynniku załamania n_2) w stosunku do próbki o mniejszej gęstości optycznej (próbka o współczynniku załamania n_1), ulega całkowitemu wewnętrznemu odbiciu (rys. 4).



Rys. 4. Schemat wielokrotnego wewnętrznego odbicia w kryształ ZnSe

Kąt padania na granicę ośrodków Θ jest większy od kąta granicznego Θ_{gr} dla całkowitego wewnętrznego odbicia zgodnie z równaniem:

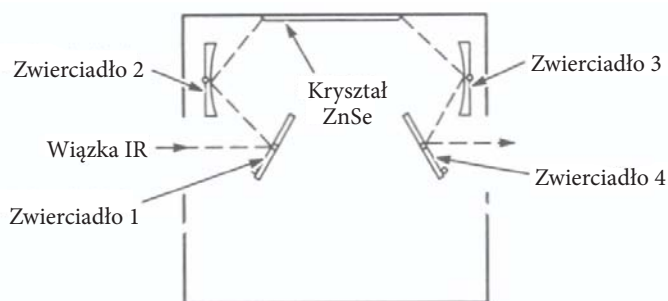
$$\sin \Theta_{gr} = \frac{n_2}{n_1}. \quad (2)$$

Podczas odbicia fala elektromagnetyczna (promieniowanie IR) wnika i penetruje ośrodek o mniejszej gęstości optycznej (próbkę) na głębokość rzędu kilku mikronów (0,5-5). Głębokość penetracji d_p zależy od długości fali promieniowania padającego, jego kąta padania Θ oraz stosunku współczynników załamania n_2/n_1 zgodnie z równaniem:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi \left[\sin^2 \Theta - \left(\frac{n_2}{n_1} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}}. \quad (3)$$

Głębokość penetracji przy ustalonym kącie padania Θ rośnie wraz z malejącą różnicą współczynników załamania, rośnie także w miarę zbliżania się kąta padającego promieniowania do wartości kąta granicznego.

Jeśli badana próbka nie pochłania promieniowania, to cała energia promienista zostaje odbita i wiązka promieniowania wychodząca z kryształu ma takie samo natężenie jak padająca. Jeżeli próbka absorbuje promieniowanie IR, to przy każdorazowym odbiciu promieniowania i penetracji w głąb materiału następuje selektywna absorpcja, wiązka promieniowania wychodząca z kryształu ma natężenie proporcjonalnie mniejsze do ilości zaabsorbowanej przez badany materiał. Ponieważ absorbowane jest promieniowanie wnikaające w głąb substancji badanej, aby zwiększyć czułość metody, pożądana jest jak największa głębokość, na jaką wnika promieniowanie oraz większa liczba odbić w kryształach, która zapewni lepsze oddziaływanie z substancją badaną. Powyższe parametry uzyskuje się przez dobór odpowiedniego rodzaju kryształu o określonym współczynniku załamania n_2 oraz dobór odpowiedniego kąta padania promieniowania IR na kryształ. W praktyce używa się przystawki odbiciowej HATR, gdzie kąt padania na horyzontalnie umocowany kryształ wynosi 45° , co daje około 12 odbić wewnątrz kryształu. Schemat drogi optycznej w przystawce HATR przedstawia rysunek (rys. 5).



Rys. 5. Schemat drogi optycznej w przystawce HATR

Wybór materiału na kryształ HATR jest determinowany przez współczynnik załamania, zakres transmisyjny dla promieniowania IR oraz wytrzymałość materiału. Najczęściej stosowane materiały na kryształy HATR wraz z parametrami zestawiono w tabeli (tab. 2).

TABELA 2

Właściwości fizykochemiczne kryształów stosowanych w przystawkach HATR

| | ZnSe | Ge | KRS-5 | AMTIR-1 |
|--|------------|----------|------------|------------|
| Obszar transmisji (cm^{-1}) | 17 000-650 | 5500-400 | 14 000-400 | 11 000-700 |
| Współczynnik załamania | 2,4 | 4,0 | 2,37 | 2,50 |
| Gęstość (g/cm^3) | 5,27 | 5,32 | 7,37 | 4,4 |
| Twardość (wg Knoop) | 150 | 1150 | 40,2 | 170 |

Dla większości aplikacji, a w szczególności do pomiaru widm materiałów biologicznych, najbardziej użyteczny ze względu na parametry fizykochemiczne okazuje się kryształ ZnSe, a przystawka HATR jest skonstruowana w ten sposób, że gwarantuje 12 odbić wewnątrz kryształu [32].

2.2.2. Wady i zalety techniki w porównaniu z klasyczną techniką transmisyjną

Substancje w stanie ciekłym analizuje się metodą transmisyjną w postaci cienkiej warstwy substancji umieszczonej pomiędzy dwoma oknami transparentnymi dla promieniowania IR. Taki sposób przygotowania próbki wymaga dużej precyzji i nie gwarantuje dobrej powtarzalności wyników. Powyższa technika pomiaru uniemożliwia również badanie substancji o konsystencji żelu lub pasty. Podstawową korzyścią wynikającą z zastosowania techniki HATR jest łatwy i powtarzalny sposób przygotowania filmu substancji ciekłej, którą nanosi się na kryształ ZnSe horyzontalnie umiejscowiony w przystawce HATR. Poprzez proste naniesienie na kryształ materiału w postaci żelu lub pasty, można bez przygotowania w specjalny sposób badać widma substancji w takiej formie.

Kolejną zaletą techniki HATR jest możliwość pomiaru warstw bardzo cienkich, których normalną techniką transmisyjną zmierzyć się nie da. Ponieważ na skutek wewnętrznego wielokrotnego odbicia w kryształach promieniowanie IR wnika w warstwę substancji badanej jedynie na głębokość kilku mikronów, można zarejestrować widmo ultracienkiej warstwy.

Promieniowanie IR oddziałuje na substancję badaną na głębokości mikronów, a więc praktycznie na granicy faz ośrodków o różnej gęstości. W porównaniu z techniką transmisyjną, gdzie promieniowanie przechodzi przez całą objętość próbki, wielkość oddziaływania promieniowania z materiałem badanym w technice HATR jest proporcjonalnie mniejsza, co czyni ją techniką odpowiednią do badania substancji silnie absorbujących (roztworów wodnych i białek).

Pomiar substancji ciekłych w postaci warstw o określonej grubości naniesionych na kryształ ZnSe minimalizuje przygotowania materiałów do badania, zwiększa powtarzalność wyników, ale przede wszystkim pozwala uniknąć błędów podczas przygotowywania, które mogą zmienić kształt widma.

Jedynym interferentem mającym wpływ na rejestrowane widmo jest jakość uzyskanego filmu. Warstwa musi dokładnie pokrywać całą powierzchnię kryształu i dobrze przylegać do podłoża, ponieważ promieniowanie oddziałuje z substancją na głębokości mikronów przy granicy faz kryształ-substancja badana [32].

2.2.3. Metodyka pomiaru

Suchy i czysty kryształ ZnSe umieszcza się wraz z przystawką HATR w komorze pomiarowej spektrometru w celu pomiaru tła. Używając tego samego kryształu, dokonuje się pomiarów zarówno tła, jak i substancji badanej. Aby uzyskać widmo substancji, nanosi się ją w postaci filmu na powierzchnię kryształu. W celu uniknięcia

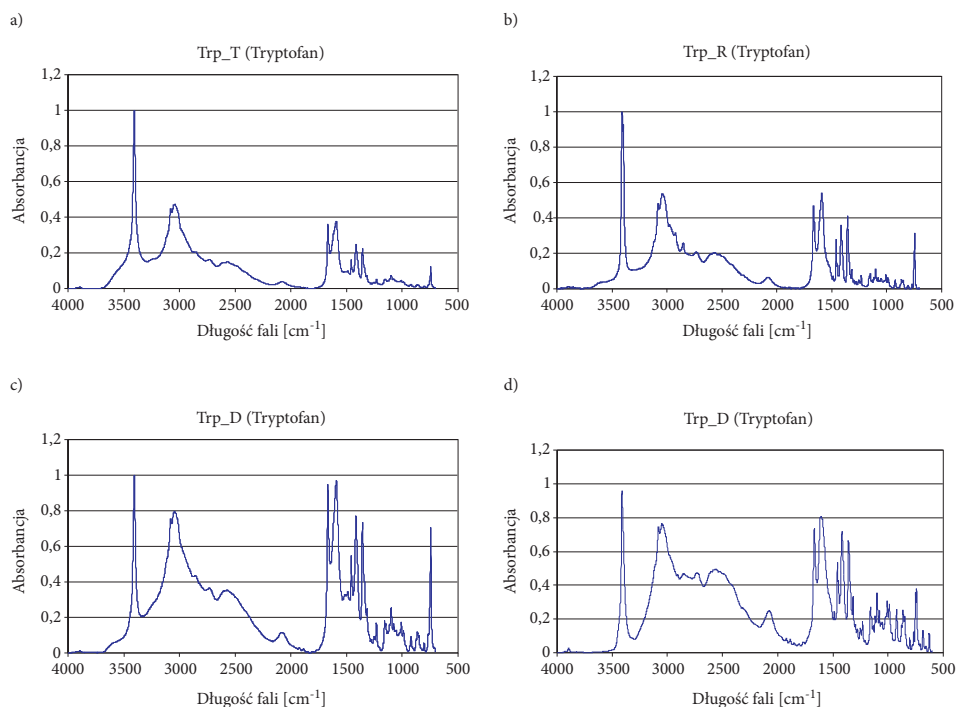
błędów należy pokryć całą powierzchnię kryształu za pomocą substancji badanej. Uzyskana warstwa powinna być jednolita i musi wykazywać dobre przyleganie do podłoża. Kryształ ZnSe z filmem substancji badanej umieszcza się w przystawce zamontowanej w komorze pomiarowej spektrometru. Otrzymane widmo podzielone przez widmo tła — czystego kryształu jest widmem transmisyjnym %T substancji badanej [32].

3. Omówienie wyników i wnioski

Jednym z założeń niniejszego opracowania było zestawienie w celach porównawczych widm tej samej substancji biologicznej, wykonanych za pomocą trzech różnych technik spektroskopii średniej podczerwieni. Na materiał odniesienia wybrano substancję białkową należącą do grupy aminokwasów — tryptofan, którego dokładnie opisane widma podczerwieni można znaleźć w wielu bazach widm i opracowaniach literaturowych. Tryptofan jest jednym z aminokwasów bardzo dobrze absorbujących promieniowanie IR w zakresie $4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$. Ponadto stanowi on podstawowy budulec większości substancji białkowych, w tym bakterii żywych i ich sporów. Tryptofan w formie stałej z dodatkiem substancji KBr będącej tłem, zmierzono techniką transmisyjną oraz techniką DRIFT. Do pomiarów techniką HATR tryptofan naniesiono w postaci cienkiego filmu na kryształ z selenku cynku (ZnSe). Widma tryptofanu wykonane techniką transmisyjną (rys. 6a), techniką HATR na kryształach ZnSe (rys. 6b), techniką DRIFT na podkładzie z folii aluminiowej (rys. 6c) oraz DRIFT w naczyniu pomiarowym z dodatkiem KBr (rys. 6d) zestawiono na odpowiednich rysunkach.

Porównując widma tej samej substancji — tryptofanu, można stwierdzić powtarzalność otrzymanego konturu pasm dla wszystkich technik zastosowanych do pomiaru. W każdym widmie uzyskanym określoną techniką, odnosząc się do literatury, można potwierdzić obecność charakterystycznych dla tryptofanu pasm. Przy długości fali około 3401 cm^{-1} występuje intensywny pik związany z drganiami rozciągającymi grupy NH w pierścieniu indolowym. Przy długości fali 746 cm^{-1} obecne jest pasmo związane z drganiami zginającymi wiązań CH w pierścieniu indolowym oraz z deformacjami całego szkieletu indolowego. Obok wyżej wymienionych pasm charakterystycznych dla struktury cząsteczki tryptofanu [33-35], w otrzymanych widmach można zauważyć szereg pasm charakterystycznych dla aminokwasów. Grupy NH_3^+ oraz COO^- determinują obecność licznych pików w obszarze $3400\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$, w tym samym regionie przy długości fali $3100\text{ a }3000\text{ cm}^{-1}$ występują intensywne aromatyczne pasma rozciągające grupy CH [36-40].

W niniejszym opracowaniu przytoczono jedynie analizę widm odnoszącą się do substancji odniesienia — tryptofanu. Ze względu na ograniczenia wydawnicze, szczegółową analizę widm pozostałych substancji białkowych użytych do badań,



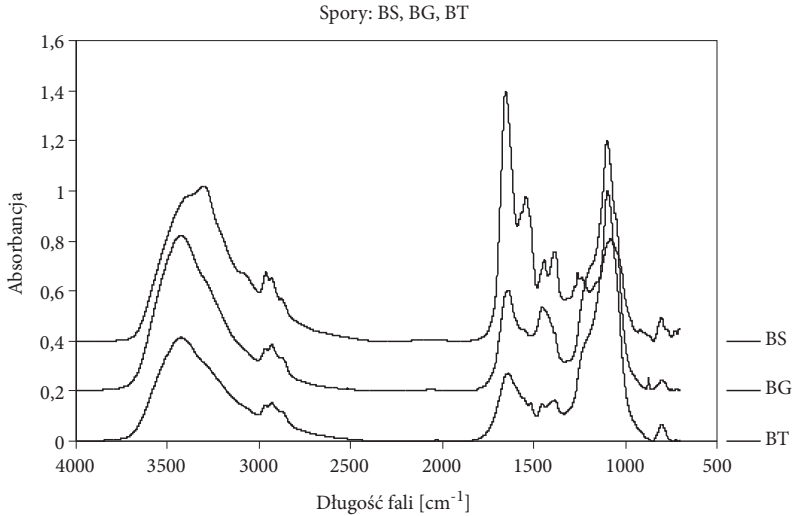
Rys. 6. Widma tryptofanu wykonane technikami: transmisyjną (a); HATR (b); DRIFT na podkładzie z folii aluminiowej (c) oraz DRIFT w naczyniu pomiarowym z dodatkiem KBr (d)

ujętych w tabeli 1 pominięto, skupiono się na tryptofanie — aminokwasie obecnym w strukturze wszystkich, przebadanych przez autorów substancji białkowych.

Analiza zamieszczonych widm tryptofanu oraz widm pozostałych materiałów pozwala wyciągnąć wnioski odnośnie zastosowanych technik. Wszystkie dają powtarzalne wyniki pomiarów i z dobrym rezultatem mogą służyć badaniom substancji biologicznych. Można podjąć próbę wyłonienia najlepszej spośród użytych technik. Niewątpliwie zaletą technik HATR i DRIFT w stosunku do klasycznej techniki transmisyjnej opierającej się na tabletkach z KBr jest to, że nie niszczą one struktury badanego materiału, nie wymagają bowiem prasowania do formy tabletek. Technika HATR dodatkowo nie wymaga znaczącej obróbki substancji użytej do pomiaru, przez co kontakt z substancjami biologicznymi wykazującymi toksyczność (np. bakteriami) staje się minimalny.

Drugim założeniem niniejszego opracowania było przytoczenie wyników badań, które idąc w ślad za światowymi działaniami prowadzonymi na rzecz walki z bioterroryzmem, miały na celu potwierdzenie skuteczności spektroskopii IR w różnicowaniu czynnika biologicznego (w tym bakterii i ich sporów). Trzy

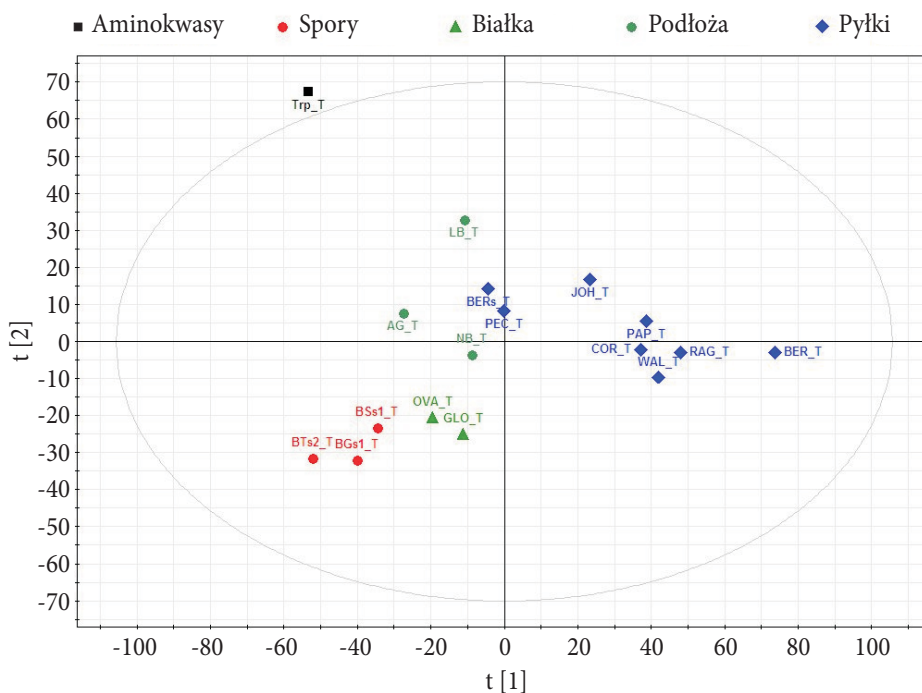
rodzaje sporów zmierzono techniką transmisyjną, a ich widma zestawiono na rysunku (rys. 7). Widma sporów zostały celowo rozsunęte w pionie, aby łatwiej je porównywać.



Rys. 7. Widma sporów bakterii wykonane techniką transmisyjną

Doniesienia literaturowe mówią o podobieństwach w rejestrowanych widmach sporów różnych rodzajów bakterii, wyniki zamieszczone w pracy również potwierdzają podobieństwo sporów wyżej wymienionych bakterii. W zakresie długości fal 800 cm⁻¹ a 650 cm⁻¹ zaobserwowano słabe pasma występujące w sporach bakterii różnych rodzajów, których nie można zaobserwować w żywych komórkach bakterii. Obecność tych pasm jest związana z solami wapnia kwasu dipikolinowego CaDP, charakterystycznego związku występującego jedynie w sporach bakterii i stanowiącego około 10% całej masy komórkowej, a nieobecnego w ich żywych odpowiednikach. Silne pasma w granicach 1657 cm⁻¹ i 1541 cm⁻¹ obecne w widmach sporów na rysunku 2 pochodzą od amidów I i II rzędowych charakterystycznych dla wszystkich struktur białkowych, podobnie jak pasma pochodzące od drgań rozciągających ugrupowań CH w okolicach 2964 cm⁻¹ i 2933 cm⁻¹. Powyższe pasma są także charakterystyczne dla żywych komórek bakterii, na ich podstawie nie można więc różnicować sporów i ich form wegetatywnych [30, 41].

Pomiary widm podczerwieni sporów, bakterii żywych, a także podłoża dla bakterii, pyłków, białek oraz aminokwasów poparto statystyczną metodą PCA. Wyniki analizy w odniesieniu do przebadanych materiałów biologicznych przedstawiono na rysunku 8.



Rys. 8. Wyniki analizy PCA dla określonych grup substancji biologicznych

Wyraźnie widać różnicowanie określonych grup materiałów biologicznych, których widma uzyskano techniką transmisyjną, stosując formę tabletek z KBr. Wyniki analizy PCA potwierdzają skuteczność technik spektroskopii IR w różnicowaniu materiałów biologicznych. W obrębie grupy sporów bakterii punkty leżą blisko siebie, co wskazuje, że za pomocą spektroskopii trudno będzie zidentyfikować, do jakiego szczepu bakterii określony spor należy. Fakt ten potwierdza rysunek 7, na którym widma sporów różnych bakterii są podobne. Na podstawie widm FTIR można jedynie rozróżnić, co jest bakterią żywą, a co jej przetrwalnikiem, zaś ustalenie, do jakiego rodzaju bądź szczepu określone bakterie należą może sprawiać duże trudności.

4. Podsumowanie

Prezentacja wyników badań nad materiałami biologicznymi miała zasadniczo dwa cele. W pierwszej kolejności pokazano widma aminokwasu o znanej strukturze wykonane za pomocą trzech technik spektroskopii IR. Celem było dowiedzenie, że każda z tych technik daje dobre wyniki w zastosowaniu do substancji biologicznych, czego dowodem są widma powtarzalne dla każdej użytej techniki o charakterystyce zgodnej z literaturą.

Drugim założeniem było potwierdzenie skuteczności spektroskopii IR w połączeniu ze statystyczną metodą PCA w różnicowaniu substancji biologicznych, a w szczególności bakterii żywych i ich form przetrwalnikowych. Dowiedziono, że technikami spektroskopii można z dużym prawdopodobieństwem ustalić, który materiał jest podłożem dla bakterii, który bakterią żywą lub sporem. Określenie opisanymi technikami, do jakiego rodzaju lub szczepu dana bakteria należy sprawia jednak kłopoty. W tym celu należy szukać dalszych narzędzi analitycznych, aby z sukcesem wesprzeć walkę z bioterroryzmem.

Artykuł wpłynął do redakcji 18.11.2008 r. Zweryfikowaną wersję po recenzji otrzymano w lutym 2009 r.

LITERATURA

- [1] R. GOODACRE, É. M. TIMMINS, P. J. ROONEY, J. J. ROWLAND, D. B. KELL, *Rapid identification of Streptococcus and Enterococcus species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks*, FEMS Microbiol. Lett., 140, 1996, 233-239.
- [2] N. VALENTINE, T. JOHNSON, YIN-FONG SU J. FORRESTER, *Rapid bacterial identification with medical and security applications*, SPIE Defense & Security DOI: 10.1117/2.1200701.0559.
- [3] K. L. WAHL, S. C. WUNSCHEL, K. H. JARMAN, N. B. VALENTINE, C. E. PETERSEN, M. T. KINGSLEY, K. A. ZARTOLAS, A. J. SAENZ, *Analysis of microbial mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*, Anal. Chem., 74, 24, 2002, 6191-6199.
- [4] C. FENSELAU, P. A. DEMIREV, *Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry*, Mass Spectrom. Rev., 20, 4, 2001, 157-171.
- [5] J. B. CLIFF, K. H. JARMAN, N. VALENTINE, S. L. GOLLEDGE, D. J. GASPAR, D. S. WUNSCHEL, K. L. WAHL, *Differentiation of spores of Bacillus subtilis grown in different media by elemental characterizatin using time-of-flight secondary ion mass spectrometry*, Appl. Environ. Microbiol., 71, 11, 2005, 6524-6530.
- [6] A. P. ESPOSITO, C. E. TALLEY, T. HUSER, C. W. HOLLARS, C. M. SCHALDACH, S. M. LANE, *Analysis of single Bacterial spores by Micro-Raman Spectroscopy*, Appl. Spectrosc., 57, 7, 2003, 868-871.
- [7] R. MANOHARAN, E. GHIAMATI, S. CHADHA, W. H. NELSON, *Effect of cultural conditions on deep UV Resonance Raman Spectra of bacteria*, Appl. Spectrosc., 47, 12, 1993, 2145-2150.
- [8] S. FARQUHARSON, C. BROUILLETTE, W. SMITH, *Identifying bacterial spores and anthrax hoax materials by Raman Spectroscopy*, Proc. of SPIE 5585, 2004, 65-70.
- [9] Z. FILIP, S. HERRMANN, J. KUBAT, *FTIR spectroscopic characteristics of differently cultivated Bacillus subtilis*, Microbiol. Res., 159, 3, 2004, 257-262.
- [10] P. GIESBRECHT, D. NAUMANN, H. LABISCHINSKI, G. BARNICKEL, *A new method for the rapid identification and differentiation of pathogenic microorganisms using Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, *Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology*, Springer, Berlin, 1985, 198-206.
- [11] D. HELM, H. LABISCHINSKI, G. SCHALLEHN, D. NAUMANN, *Classification and identification of bacteria by Furier — Transformed Infrared spectroscopy*, J. Gen. Microbiol., 137, 1991, 69-79.
- [12] J. IRUDAYARAJ, H. JANG, S. SAKHAMURI, *Differentiation and detection of microorganisms using Furier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy*, J. Molec. Struct., 606, 2002, 181-188.

- [13] D. NAUMANN, D. HELM, H. LABISCHINSKI, *Microbiological characterisations by FTIR Spectroscopy*, Nature, 351, 6321, 1991, 81-82.
- [14] S. E. THOMPSON, N. S. FOSTER, T. J. JOHNSON, N. B. VALENTINE, J. E. AMONETTE, *Identification of Bacterial Spores using Statistical Analysis of Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy Data*, Appl. Spectrosc., 57, 8, 2003, 893-899.
- [15] R. GOODCARE, B. SHANN, R. J. GILBERT, E. M. TIMMINS, A. C. MCGOVERN, B. K. ALSBERG, D. B. KELL, N. A. LOGAN, *Detection of the dipicolinic acid biomarker in Bacillus spores using Curie-Point Pyrolysis Mass Spectrometry and Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, Anal. Chem., 72, 2000, 119-127.
- [16] A. C. SAMUELS, A. BEN-DAVID, D. M. WONG, D. ST. AMANT, L. CAREY, V. KALASINSKY, G. MEYER, *Infrared spectra of Bacillus subtilis spores: The effect of growth media*, Joint Scientific Conference on Chemical & Biological Defense Research, Marriott's Hunt Valley Inn, Hunt Valley, MD, 2001.
- [17] N. S. FOSTER, S. E. THOMPSON, N. B. VALENTINE, J. E. AMONETTE, T. J. JOHNSON, *Identification of Sporulated and Vegetative Bacteria using Statistical Analysis of Fourier Transform Mid-Infrared Transmission Data*, Appl. Spectrosc., 58, 2, 2004, 203-211.
- [18] J. L. R. ARRONDO, A. MUGA, J. CASTRESANA, F. M. GOÑI, *Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy*, Prog. Biophys. Mol. Biol., 59, 1993, 23-56.
- [19] F. SIEBERT, *Infrared spectroscopy applied to biochemical and biological problems*, Methods Enzymol., 246, 1995, 501-526.
- [20] M. JACKSON, H. H. MANTSCH, *The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure*, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 30, 1995, 95-120.
- [21] E. GOORMAGHTIGH, V. CABIAUX, J.-M. RUYSSCHAERT, *Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds*, Subcell. Biochemistry, 23, 1994, 329-362.
- [22] E. GOORMAGHTIGH, V. CABIAUX, J.-M. RUYSSCHAERT, *Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. II. Experimental aspects, side chain structure, and H/D exchange*, Subcell. Biochem., 23, 1994, 363-403.
- [23] E. GOORMAGHTIGH, V. CABIAUX, J.-M. RUYSSCHAERT, *Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures*, Subcell. Biochem., 23, 1994, 405-450.
- [24] J. L. R. ARRONDO, F. M. GOÑI, *Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy*, Prog. Biophys. Mol. Biol., 72, 1999, 367-405.
- [25] P. I. HARIS, D. CHAPMAN, *Does Fourier-transform infrared spectroscopy provide useful information on protein structures?*, TIBS 17, 1992, 328-333.
- [26] P. I. HARIS, D. CHAPMAN, *Analysis of polypeptide and protein structures using Fourier transform infrared spectroscopy*, in: C. Jones, B. Mulloy, A. H. Thomas (eds.), Microscopy, Optical Spectroscopy, and Macroscopic Techniques ed., vol. 22, Methods in Molecular Biology, Humana Press Inc, Totowa, NJ, 1994, 183-202.
- [27] H. FABIAN, W. MÄNTELE, *Infrared spectroscopy of proteins*, in: J. M. Chalmers, P. R. Griffiths (eds.), Handbook of Vibrational Spectroscopy, John Wiley & Sons, Chichester, 2002, 3399-3426.
- [28] A. BARTH, *IR spectroscopy*, in: V. N. Uversky, E. A. Permyakov (eds.), Protein Structures: Methods in Protein Structure and Stability Analysis, Nova Science Publishers, 2006.
- [29] A. BARTH, *Infrared spectroscopy of proteins*, Bioch. et Biophys. Acta, 1767, 2007, 1073-1101.
- [30] N. VALENTINE, T. JOHNSON, YIN-FONG SU J. FORRESTER, *FTIR Spectroscopy for bacterial spore identification and classification*, Proc. of SPIE, 6378, 2006, 63780P-1.

- [31] Diffuse Reflectance Accessory; User's Guide, Copyright © 1998 The Perkin-Elmer Corporation United Kingdom.
- [32] Horizontal ATR Accessory; User's Guide, Copyright © 1998 The Perkin-Elmer Corporation United Kingdom.
- [33] BOJIDARKA B. IVANOVA, *IR-LD spectroscopic characterization of L-Tryptophan containing dipeptides*, Spectrochimica, Acta, Part A, 64, 2006, 931-938.
- [34] L. C. SNOEK, R. T. KROEMER, M. R. HOCKRIDGE, J. P. SIMONS, Phys. Chem., 3, 2001, 1819.
- [35] X. CAO, G. FISCHER, J. Phys. Chem., A 103, 1999, 9995.
- [36] P. J. REID, CH. LOFTUS, C. C. BEESON, Biochemistry, 42, 2003, 2441.
- [37] J. A. ENCINAR, A. M. FERNANDEZ, M. L. MOLINA, A. MOLINA, J. A. POVEDA, J. P. ALBAR, J. LOPEZ-BARNEO, F. GAVILANES, A. V. FERRER-MONTIEL, J. M. GONZALEZ-ROS, Biochemical, 41, 2002, 12263.
- [38] Z. ARP, D. AUTREY, J. LAANE, S. A. OVERMAN, G. J. THOMAS JR., Biochemical, 40, 2001, 2522.
- [39] M. TSUBOI, Y. EZAKI, M. AIDA, M. SUSIKI, A. YIMIT, K. USHIZAWA, T. UEDA, Biospectroscopy, 4, 1998, 61.
- [40] R. M. SILVERSTEIN, F. X. WEBSTER, D. J. KIEMLE, Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych, PWN, Warszawa, 2007, 72-126.
- [41] K. JOUNG, J. CÔTÉ, *A single Phylogenetic Analysis of Bacillus thuringiensis strains and bacilli species infrareded from 16S rRNA gene restriction fragment length polymorphism is congruent with two independent phylogenetic analyses*, J. Appl. Microbiol., 93, 2002, 1075-1082.

M. MULARCZYK-OLIWA, M. KWAŚNY,
M. WŁODARSKI, M. KALISZEWSKI

Comparison of FTIR spectroscopy techniques used for biological material identification

Abstract. The ability to identification and classification of biological materials such as spores and vegetative cells has been demonstrated by several laboratories using FTIR spectroscopy. In the present work three techniques of FTIR spectroscopy have been discussed: classical transmission techniques using transmission mode, Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT), and Horizontal Attenuated Total Reflectance (HATR). Different groups of biological material have been measured: vegetative cells of bacteria, bacterial spores, background materials, pollens, aminoacids, and proteins. Spectra of the same material achieved using three different FTIR techniques were similar to each other. Main advantage of HATR and DRIFT in comparison with a transmission mode is minimum sample preparation of biological material. These results also demonstrate that FTIR techniques in combination with statistical Principal Component Analysis (PCA) provide rapid and reliable distinction between vegetative bacteria, bacterial spores, and background particles.

Keywords: FTIR, HATR, DRIFT, vegetative bacteria, spores

Universal Decimal Classification: 579.6

