



## **Badanie i analiza widm fluorescencyjnych do identyfikacji potencjalnych czynników zagrożenia biologicznego**

MIRON KALISZEWSKI, MAKSYMILIAN WŁODARSKI,  
MIROŚLAW KWAŚNY, JAROSŁAW MŁYŃCZAK,  
KRZYSZTOF KOPCZYŃSKI, ELŻBIETA TRAFNY<sup>1</sup>,  
MAŁGORZATA SZPAKOWSKA<sup>1</sup>, MONIKA MULARCZYK-OLIWA,  
ANETA BOMBALSKA, ZBIGNIEW ZAWADZKI,  
ZYGMUNT MIERCZYK

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

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii,  
01-163 Warszawa, ul. Kozielska 4

**Streszczenie.** W pracy zaprezentowano i porównano charakterystyki wzbudzeniowo-emisyjne aminokwasów, białek, bakterii, bakteriofaga MS2 oraz pyłków roślin. Pokazane zostały różnice pomiędzy drobnoustrojami hodowanymi i przygotowanymi w różnych warunkach. Rejestrowanie i analiza charakterystyk fluorescencyjnych możliwie licznej grupy związków i czynników biologicznych jest etapem niezbędnym do opracowania aparatury wykrywającej w czasie rzeczywistym chorobotwórcze drobnoustroje obecne w powietrzu.

**Słowa kluczowe:** fluorescencja bakterii, aerozole biologiczne, autofluorescencja  
**Symbole UKD:** 577

### **1. Wstęp**

Rozwój nauk biologicznych nie byłby możliwy bez narzędzia, jakim jest spektroskopia fluorescencyjna. Technika ta znajduje szerokie zastosowanie między innymi w ustalaniu struktur komórkowych, badaniu reakcji biochemicznych oraz w diagnostyce laboratoryjnej, medycznej i mikrobiologicznej.

Nowoczesne sposoby identyfikacji drobnoustrojów oparte na metodach biologii molekularnej pozwalają na uzyskiwanie wiarygodnych wyników. Z drugiej strony techniki te są skomplikowane i czasochłonne, a do analizy próbek wymagany jest wykwalifikowany personel [1].

W obliczu potencjalnego zagrożenia biologicznego decydujące znaczenie ma czas i prostota wykonania procedury pomiarowej. Dlatego też w ostatnich latach dużym zainteresowaniem cieszą się metody wykorzystujące techniki fluorescencyjne do kontroli czystości mikrobiologicznej powietrza w czasie rzeczywistym [2, 3].

Obecne w drobnoustrojach fluorofory pod wpływem promieniowania UV wykazują dwa charakterystyczne pasma emisji. Pierwsze z nich, o większej intensywności, związane jest z obecnością tryptofanu (Trp) i wykazuje maksima wzbudzenia oraz emisji w obszarze odpowiednio około 280 i 330 nm [4]. Drugie pasmo jest wynikiem fluorescencji zredukowanego dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH). Związek ten występuje w aktywnych metabolicznie bakteriach [5]. Jego maksima wzbudzenia i emisji znajdują się w obszarze odpowiednio około 330 i 440 nm.

Zbliżoną charakterystykę spektralną często obserwuje się dla endospor bakterieryjnych. Jest ona wynikiem obecności kwasu dipikolinowego (DPA). Ten związek chemiczny jest charakterystyczny dla endospor (nie występuje w komórkach wegetatywnych) i warunkuje zwiększenie ich odporności na ogrzewanie i promieniowanie UV [6, 7].

Pierwszym etapem prowadzącym do opracowania urządzeń wykrywających potencjalne czynniki zagrożenia biologicznego jest tworzenie fluorescencyjnej bazy danych dla różnych materiałów. Matryce wzbudzeniowo-emisyjne są rodzajem odcisku palca cząsteczek biologicznych. Dopiero na tej podstawie możliwy jest optymalny dobór długości fali wzbudzenia i emisji oraz zaprojektowanie systemu wykrywania aerozoli biologicznych.

## 2. Materiały i metodyka

### 2.1. Odczynniki

Tryptofan i NADH pochodziły z firmy Sigma Chemicals, Polska. Albumina z jaj kurzych i albumina z surowicy wołowej pochodziła z firmy Polskie Odczynniki Chemiczne SA (POCH).

Pyłki roślinne pochodziły z firmy Duke Scientific Corporations. Roztwory pyłków i białek przygotowano z 5 mg proszku i 100 ml wody destylowanej. Stężenia wodnych roztworów tryptofanu i NADH wynosiły odpowiednio 0,49  $\mu\text{M}$  i 2,2  $\mu\text{M}$ .

TABELA 1

## Badane materiały pochodzenia biologicznego

Grupa	Nazwa	Skrót	Pochodzenie
Aminokwasy i białka	Tryptofan	Trp	Sigma-Aldrich
	Albumina z jaj	OA	POCH
Bakterie i spory	<i>Bacillus atrophaeus</i>	BG	WIHE Warszawa
	<i>B. atrophaeus</i> endospory	BGs	WIHE Warszawa
	<i>B. atrophaeus</i> spory techniczne	BGst	PVTT
	<i>Bacillus subtilis</i>	BS	WIHE Warszawa
	<i>B. subtilis</i> endospory	BSs	WIHE Warszawa
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	BT	WIHE Warszawa
	<i>B. thuringiensis</i> endospory	BTs	WIHE Warszawa
	<i>B. thuringiensis</i> spory techniczne	Turex	PVTT
	<i>Escherichia coli</i>	EC	WIHE Warszawa
Bakteriofag	Bakteriofag MS2	MS2	WIHE Puławy
Grzyby	<i>Penicillium brevi-compactum</i>	PBC	WIHE Warszawa
	<i>Cladosporium herbarum</i>	CH	WIHE Warszawa
	<i>Alternaria alternata</i>	AA	WIHE Warszawa
	<i>Candida albicans</i>	CA	WIHE Warszawa
	<i>Aspergillus flavus</i>	AF	WIHE Warszawa
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	PC	WIHE Warszawa
Pyłki	Trawa Bermuda	BGP	Duke
	Spory śnieci trawy Bermuda	BGSs	Duke
	Kukurydza	CP	Duke
	Spory śnieci trawy Johnsona	JONs	Duke
	Wierzba papierowa	PMP	Duke

## 2.2. Przygotowanie szczepów drobnoustrojów

Badane szczepy drobnoustrojów (z wyjątkiem *E. coli*) pochodziły z kolekcji ATCC (*American Type Culture Collection*). Badany szczep *E. coli* pochodził z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie. Badane szczepy bakterii hodowano na podłożach płynnych. Endo-

spory laseczek z rodzaju *Bacillus* oddzielano od komórek wegetatywnych metodą wielokrotnego płukania w dejonizowanej wodzie i wirowania. Próbki zawierające komórki wegetatywne bakterii, oznaczone jako „niepłukane”, po hodowli wirowano przy 4000 rpm przez 15 min, supernatant usuwano, a osad bakteryjny zawieszano w sterylnym roztworze NaCl w stężeniu 0,9%. Próbki zawierające komórki wegetatywne, oznaczone jako „płukane”, były dodatkowo dwukrotnie płukane i wirowane w sterylnym roztworze NaCl. Spory techniczne zostały dostarczone z PVTT (*The Finnish Defence Forces*).

Gęstość optyczną zawiesin komórek wegetatywnych bakterii i endospor określano przy długości fali 600 nm (O.D. 600), gęstość zawiesin doprowadzano do wartości 0,10, natomiast gęstość optyczną zarodników grzybów określano przy długości fali 530 nm. Gęstość optyczną mierzono przy pomocy spektrofotometru Perkin-Elmer Lambda 900.

### 2.3. Rejestrowanie widm fluorescencyjnych

Widma fluorescencji badanych próbek mierzono przy pomocy spektrofluorymetru FS 900 (*Edinburgh Instruments*) zaopatrzonego w przystawkę do pomiarów z powierzchni. Szczeliny obu monochromatorów ustawiono na szerokość widma odpowiadającą rozdzielczości 2 nm. Długość fali wzbudzenia była mierzona co 5 nm, a emisji co 2 nm. Sygnał Ramana i tło były odejmowane od widm próbek. Matryce fluorescencyjne były normowane do wartości maksymalnej. Stosunki fluorescencji obliczano, całkując powierzchnię pod pikiem emisji przy wzbudzeniach odpowiednio 280 i 340 nm.

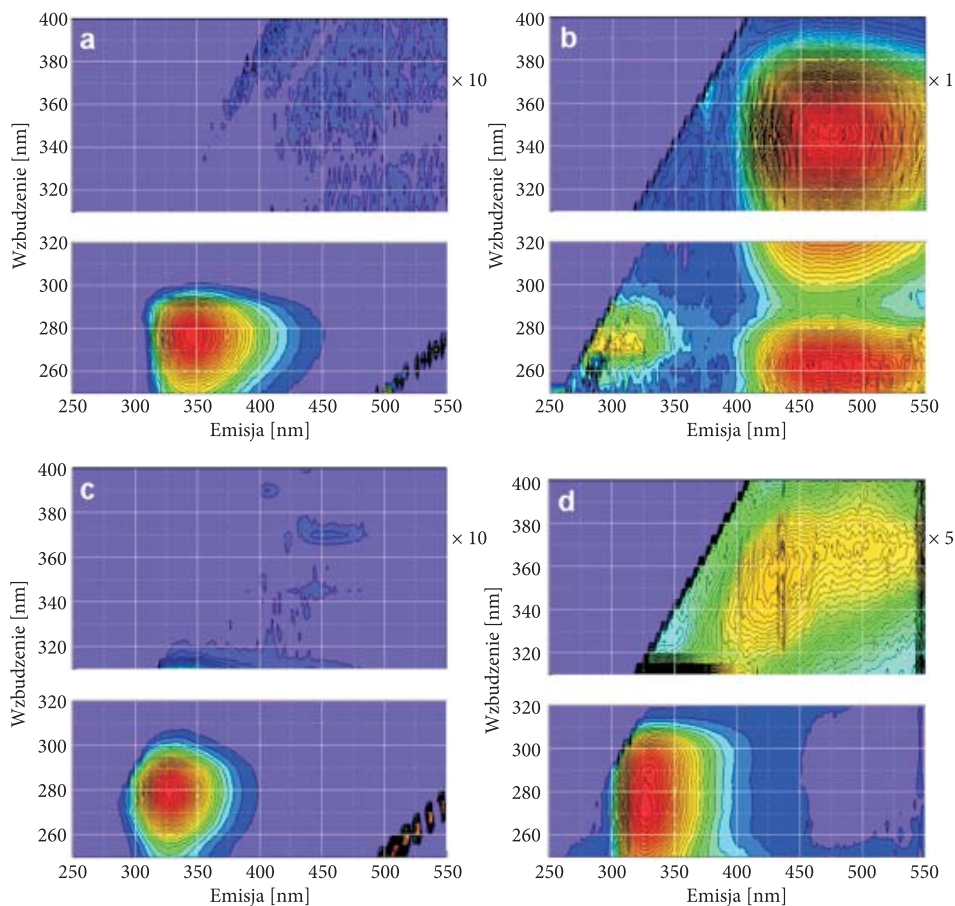
Przeprowadzono analizę PCA (*Principal Component Analysis*) otrzymanych wyników za pomocą programów SIMCA-P+, Umetrics AB, Umeå, Szwecja.

## 3. Wyniki i dyskusja

Poniżej zostały zaprezentowane matryce wzbudzeniowo-emisyjne (EX-EM) różnych materiałów biologicznych. Rysunki 1a i 1b przedstawiają właściwości fluorescencyjne głównych fluoroforów występujących w drobnoustrojach — tryptofanu i NADH [8].

Innymi aminokwasami wchodzącymi w skład białek i wykazującymi, mniejsze w porównaniu z Trp, właściwości fluorescencyjne są tyrozyna i fenyloalanina [8].

Właściwości fluorescencyjne Trp silnie zależą od obecności rozpuszczalnika, wpływu lokalnego otoczenia wynikającego z obecności innych aminokwasów w danym białku oraz od pH. Wpływ ten jest już widoczny przy porównaniu map EX-EM wodnych roztworów Trp i OA (rys. 1a, c). Przesunięte są względem zarówno maksima emisji, jak również szerokości pików [8, 9].

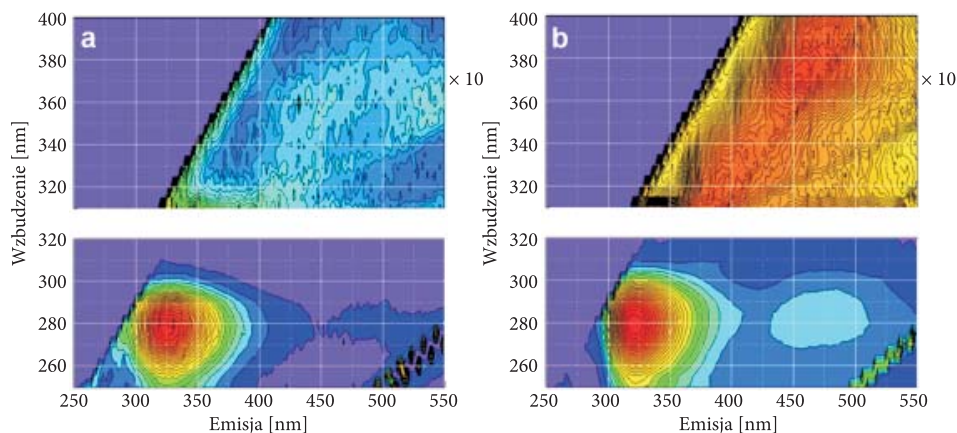


Rys. 1. Matryce EX-EM różnych fluoroforów: a) tryptofan w wodzie; b) NADH w wodzie; c) albumina z jaja kurczego w wodzie; d) sucha albumina z jaja kurczego

Istotnym czynnikiem wpływającym na właściwości fluorescencyjne substancji jest obecność rozpuszczalnika. Przykładowe charakterystyki spektralne albuminy z jaj kurzych przedstawione zostały na rysunku 1c-d. Białko to w formie stałej ma wyższą fluorescencję w drugim paśmie w porównaniu z albuminą rozpuszczoną w wodzie.

Podobny efekt, jak podczas analizy białek, obserwowany jest dla endospor laseczek z rodzaju *Bacillus*. Charakterystyki suchych i mokrych endospor *Bacillus thuringiensis* przedstawione zostały na rysunku 2. Zbliżone wyniki dla endospor bakteryjnych zostały opisane przez Sarasanandarajah i wsp. [10].

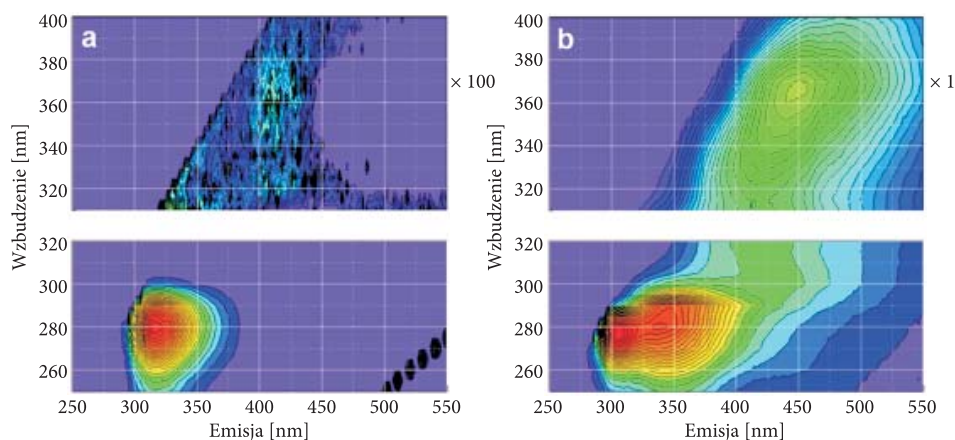
Wspólną cechą budowy bakterii, endospor, grzybów, wirusów i pyłków jest obecność w ich składzie różnych białek [11]. Pomimo subtelnych różnic pomiary fluorescencji jedynie w obrębie I pasma nie pozwalają na rozróżnianie próbek. Na rysunkach 3 i 4 pokazane zostały matryce EX-EM płukanego i niepłukanego



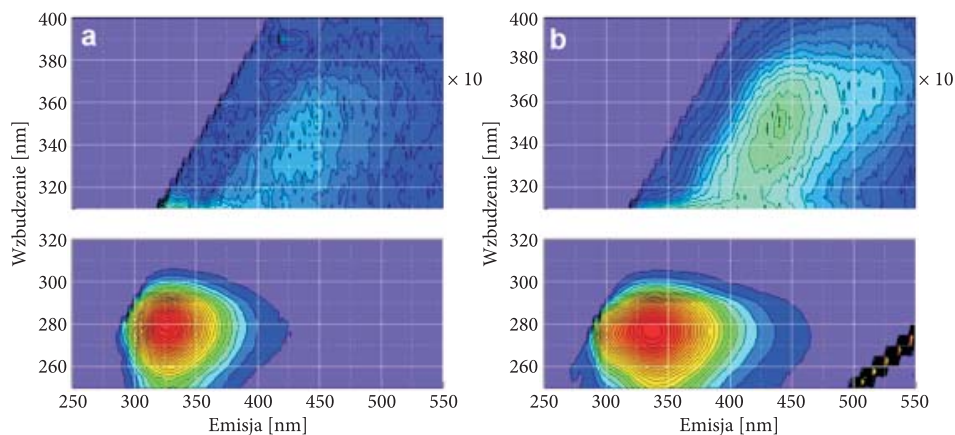
Rys. 2. Spory *B. thuringiensis*: a) suche zawieszone ponownie w wodzie przed eksperymentem; b) suchy proszek

materiału biologicznego. Zaprezentowane na rysunku 3 widma fluorescencji lizatu bakteriofaga MS2 płukanego (a) i niepłukanego (b) są niemal identyczne w zakresie I. Wyraźne różnice dla obu preparatów pojawiają się w zakresie II. Mają one związek z obecnością podłoża hodowlanego, białek oraz fluoroforów bakteryjnych takich jak NADH pochodzących najprawdopodobniej z pozostałości komórek wegetatywnych *E. coli*, w których bakteriofag był namnażany.

Podobny trend obserwowany jest dla bakterii. Komórki wegetatywne niepłukane (b) charakteryzują się wyższą fluorescencją w II paśmie w stosunku do komórek wegetatywnych bakterii trzykrotnie odpłukanych od podłoża hodowlanego (w identycznych warunkach pomiarowych) (a) (rys. 4).



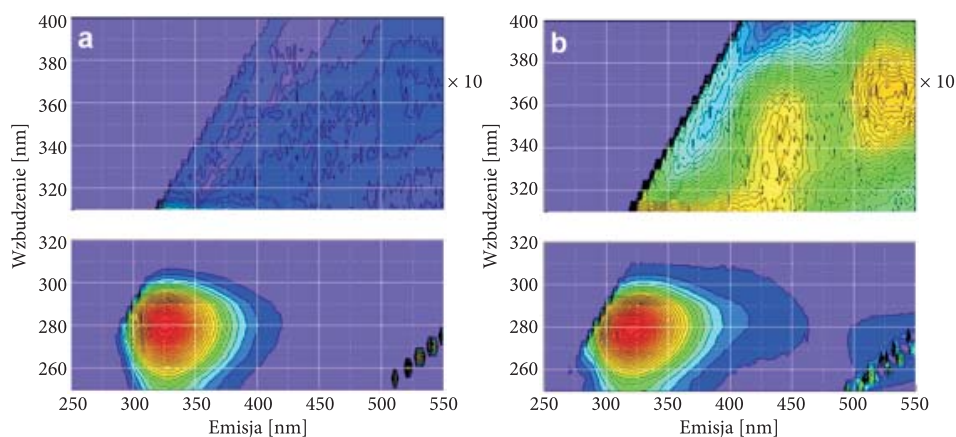
Rys. 3. Matryce EX-EM bakteriofaga MS2: a) płukanego; b) niepłukanego



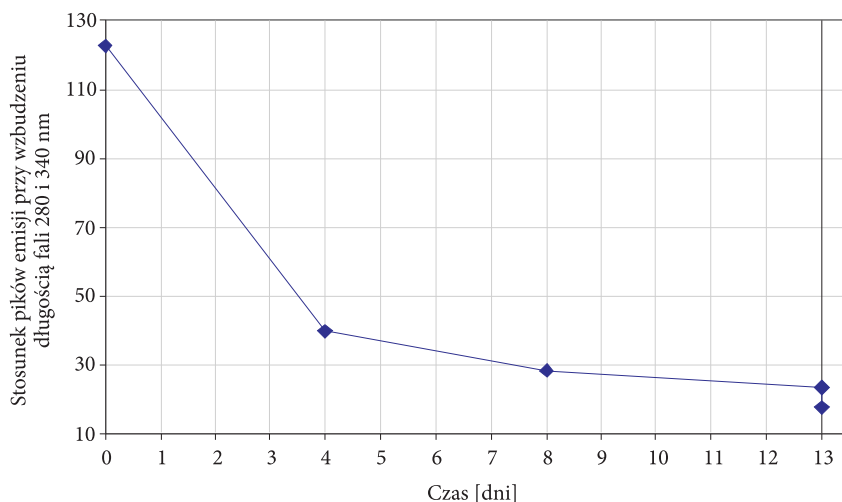
Rys. 4. Matryce EX-EM *B. atrophaeus*: a) komórki płukane; b) komórki nieplukane

Zauważalne różnice występują dla komórek wegetatywnych bakterii z tego samego gatunku w różnym stanie fizjologicznym. Rysunek 5 przedstawia charakterystyki spektralne zawiesiny komórek wegetatywnych *E. coli* bezpośrednio po 24-godzinnej hodowli (a) przechowywanych przez 13 dni bez pożywki w jałowej soli fizjologicznej. W ostatnim dniu eksperymentu bakterie poddano dodatkowo działaniu ultradźwięków (b). W wyniku głodzenia nastąpił wzrost fluorescencji w II paśmie (w identycznych warunkach pomiarowych).

Na rysunku 6 przedstawione zostały stosunki scałkowanych krzywych emisji dla pasma I i II *E. coli*. Obserwowane zmiany mogą być wynikiem wielu złożonych



Rys. 5. Matryce EX-EM płukanych komórek wegetatywnych *E. coli*: a) bezpośrednio po hodowli; b) przechowywanych przez 13 dni w temperaturze pokojowej i poddanych działaniu ultradźwięków przez 10 minut



Rys. 6. Kinetyka zmian stosunku fluorescencji *E. coli* przechowywanych przez 13 dni w temperaturze pokojowej. Pod koniec eksperymentu komórki zostały poddane działaniu ultradźwięków

procesów obejmujących zarówno zmiany w strukturze białek bakterii lub lizę komórek bakterii i uwolnienie z nich składników wewnątrzkomórkowych [12].

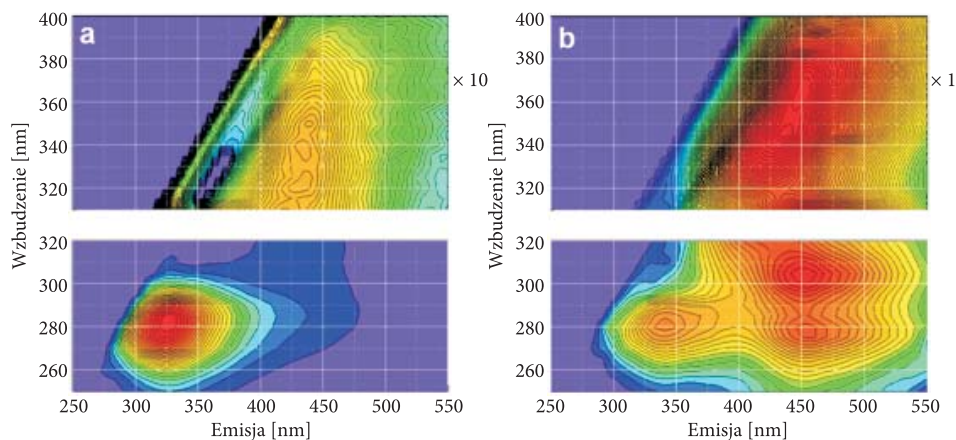
Poznanie charakterystyk spektralnych możliwie szerokiej gamy cząstek biologicznych jest niezbędne do prawidłowego odróżniania czynników zagrożenia biologicznego od cząsteczek naturalnie występujących jako tło. Zanieczyszczenia te mogą prowadzić do błędnej klasyfikacji cząsteczek biologicznych. Do najczęściej spotykanych interferentów należą pyłki roślin, grzyby, spaliny silnikowe, kurz oraz dym tytoniowy.

Z uwagi na podobieństwa w składzie jakościowym wiele materiałów pochodzenia biologicznego wykazuje podobne właściwości fluorescencyjne. Przykładowo w przeciwieństwie do pyłku Pecan (rys. 7b), pyłek kukurydzy (rys. 7a), ma zbliżone właściwości spektralne do bakterii.

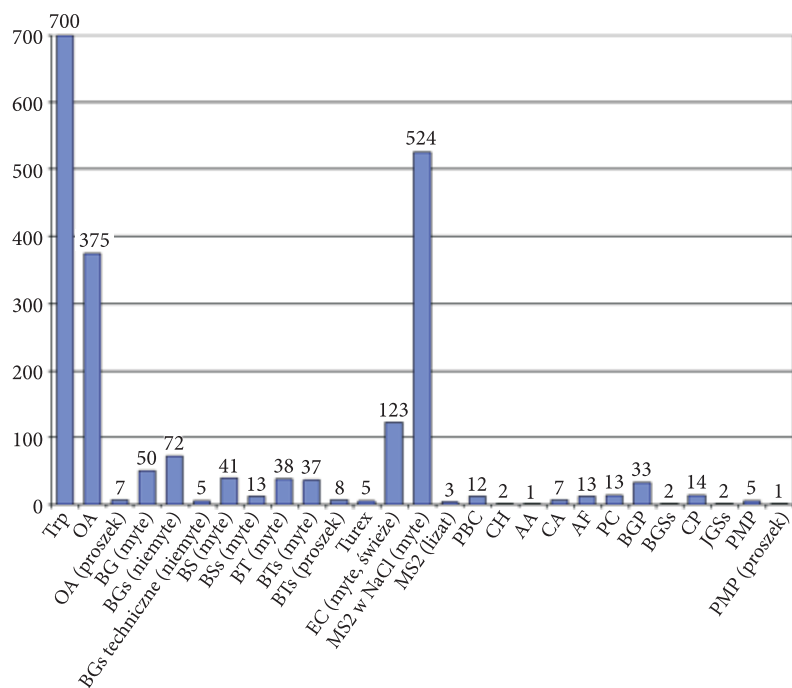
Najprostszą metodą analizy widm materiału biologicznego jest wyznaczenie stosunków powierzchni bądź wysokości pików emisji dla wzbudzenia w I i II zakresie. Dla bakterii zazwyczaj obserwowane są wyższe wartości niż dla endospor, pyłków i zarodników grzybów (rys. 8). Metoda ta jednak nie zawsze się sprawdza. Niejednokrotnie próbki pochodzenia biologicznego mają zbliżone wartości stosunków emisji. Przykładowo identyczne wartości wykazują endospory *B. subtilis* oraz interferenty, takie jak zarodniki grzybów *A. flavus*, *P. chrysogenum* lub też pyłek kukurydzy (rys. 8).

Innym sposobem poszukiwania podobieństw jest analiza głównych składowych (PCA — *Principal Components Analysis*). Metoda ta polega na redukcji ilości zmiennych w wielowymiarowej przestrzeni danych. Celem PCA jest opisanie danych





Rys. 7. Matryce EX-EM zawieszono w wodzie: a) pyłku kukurydzy; b) pyłku Pecan



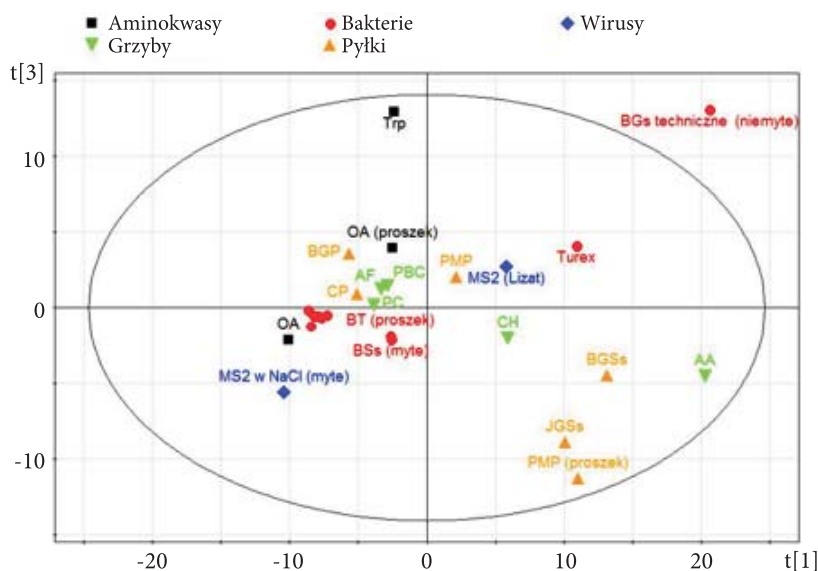
Rys. 8. Stosunki intensywności emisji w I i II zakresie dla materiałów różnego pochodzenia

za pomocą mniejszej, nieskorelowanej liczby zmiennych (głównych składowych), opisujących jak największy zakres zmienności danych w zbiorze.

Jednym z zastosowań analizy głównych składowych jest poszukiwanie podobieństw pomiędzy elementami opisywanymi dużą ilością zmiennych. Przykładem

są materiały charakteryzowane za pomocą widma fluorescencji. Elementy podobne będą położone blisko siebie w nowej przestrzeni zmiennych.

Rysunek 9 przedstawia klasyfikację bakterii, grzybów i pyłków za pomocą PCA dla dwóch długości fali wzbudzenia — 280 i 340 nm. Większość bakterii i endospor laseczek z rodzaju *Bacillus* jest zlokalizowanych w bliskim sąsiedztwie (dla lepszej czytelności rysunku niektóre podpisy tej grupy zostały usunięte). Preparaty Turex i techniczne BGs, z uwagi na dużą ilość zanieczyszczeń, wyraźnie różnią się od pozostałych preparatów bakteryjnych.



Rys. 9. Analiza PCA widm fluorescencyjnych materiału biologicznego zawieszonoego w różnych warunkach. Długości fali wzbudzenia 280 i 340 nm

Wybór metody analizy ma decydujący wpływ na uzyskany wynik. Na podstawie analizy stosunków powierzchni pod pikami fluorescencji bakteriofag MS2 wykazuje podobieństwo do tryptofanu i białka diametralnie różniąc się od bakterii (rys. 8). Z kolei po analizie metodą PCA zwiększa się podobieństwo MS2 do bakterii. Taki wynik wydaje się bardziej obiecujący ze względu na możliwość wykrywania szerokiego spektrum bojowych środków biologicznych (rys. 9).

## 5. Wnioski

Różnorodność charakterystyk fluorescencyjnych preparatów biologicznych wskazuje na potencjalne możliwości zastosowania spektroskopii fluorescencyjnej

wspartej zaawansowanymi metodami statystycznymi do wykrywania i rozpoznawania zagrożenia biologicznego. Z uwagi na podobieństwo składu jakościowego związków biologicznych, widma fluorescencyjne pozwalają jedynie na oszacowanie, do której grupy należy dany czynnik. Zaprezentowane w pracy wyniki dostarczyły istotnych informacji wskazujących na silną zależność charakterystyk spektralnych od warunków przechowywania i przygotowania próbek.

Niewątpliwą zaletą technik spektroskopowych jest możliwość uzyskiwania wyników w czasie rzeczywistym. Wielkim wyzwaniem jest zwiększenie selektywności metody. Dlatego też równolegle prowadzone są prace nad równoczesnym pomiarem dodatkowych parametrów takich jak czasy życia fluorescencji oraz wielkości cząsteczek [14, 15].

Autorzy składają gorące podziękowania dla Pani Moniki Uchańskiej z Zakładu Mikrobiologii WIHiE za niezastąpioną pomoc i udział w pomiarach.

Praca została wykonana w ramach projektu badawczego zamawianego MNiSW-DBO-03-/I/2007.

Artykuł wpłynął do redakcji 15.07.2009 r. Zweryfikowaną wersję po recenzji otrzymano w grudniu 2009 r.

#### LITERATURA

- [1] Y-L. PAN, V. BOUTOU, J. BOTTIGER, S. ZHANG, J-P. WOLF, R. CHANG, *A Puff of Air Sorts Bioaerosols for Pathogen Identification*, *Aeros. Sci. and Techn.*, 38, 2004, 598-602.
- [2] P. P. HAIRSTON, J. HO, F. R. QUANT, *Design of an instrument for real-time detection of bioaerosols using simultaneous measurement of particle aerodynamic size and intrinsic fluorescence*, *J. Aerosol Sci.*, 28, 3, 1997, 471-482.
- [3] Y-L. PAN, J. HARTINGS, R. G. PINNICK, S. C. HILL, J. HALVERSON, R. K. CHANG, *Single-particle fluorescence spectrometer for ambient aerosols*, *Aerosol Sci. Technol.*, 37, 8, 2003, 627-638.
- [4] ALIMOVA, A. KATZ, M. SIDDIQUE, G. MINKO, H. E. SAVAGE, M. K. SHAH, R. B. ROSEN, *Native fluorescence changes induced by bactericidal agents*, *IEEE Sens. J.*, 5, 4, 2005, 704-711.
- [5] N. RAMANUJAM, *Fluorescence Spectroscopy In Vivo*, [in:] *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000, 20-56.
- [6] S. SARASANANDARAJAH, J. KUNNIL, B. V. BRONK, L. REINISCH, *Two-dimensional multiwavelength fluorescence spectra of dipicolinic acid and calcium dipicolinate*, *Appl. Opt.*, 44, 7, 2005, 1182-1187.
- [7] M. PAIDHUNGAT, B. SETLOW, A. DRIKS, P. SETLOW, *Characterization of Spores of Bacillus subtilis which Lack Dipicolinic Acid*, *J. Bacteriol.*, 182, 19, 2000, 5505-5512.
- [8] J. R. LAKOWICZ, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Baltimore, Maryland, 2006, 954.
- [9] S. LADOKHIN, *Fluorescence spectroscopy in peptide and protein analysis*. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2000, 5762-5779.
- [10] S. SARASANANDARAJAH, J. KUNIL, E. CHACKO, B. V. BRONK, L. REINISCH, *Reversible changes in fluorescence of bacterial endospores found in aerosols due to hydration/drying*, *Aeros. Sci.*, 36, 2005, 689-699.

- [11] BACSI, B. K. CHOUDHURY, N. DHARAJIYA, S. SUR, I. BOLDOGH, *Subpollen particles: Carriers of allergenic proteins and oxidases*, J. Allergy Clin. Immunol., 118, 4, 2006, 844-850.
- [12] K. NATH, A. L. KOCH, *Protein degradation in Escherichia coli. II. Strain differences in the degradation of protein and nucleic acid resulting from starvation*, J. Biol. Chem., 246, 22, 1971, 6956-6967.
- [13] M. H. DEGHANI, *Effectiveness of Ultrasound on the Destruction of E. coli*, Am. J. Env. Sci., 1, 3, 2005, 187-189.
- [14] E. BATTISTELLI, R. PAOLINETTI, C. POMPEI, S. PUCCINI, *The optical detection system of FABIOLA*, Proc. of SPIE, 7116, 2008, 1-9.
- [15] X. WU, J. A. MERTEN, N. OMENETTO, B. W. SMITH, J. D. WINEFORDNER, *Development, Characterization, and Application of a Versatile Single Particle Detection Apparatus for Time-Integrated and Time-Resolved Fluorescence Measurements, Part II: Experimental Evaluation*, Laser Chem., 2009, 14 pages.

M. KALISZEWSKI, M. WŁODARSKI, M. KWAŚNY, J. MŁYŃCZAK,  
K. KOPCZYŃSKI, E. TRAFNY, M. SZPAKOWSKA,  
M. MULARCZYK-OLIWA, Z. ZAWADZKI, Z. MIERCZYK

#### **Fluorescence spectra application and analysis for discrimination of potential biological warfare agents**

**Abstract.** The paper presents excitation-emission maps of aminoacids, proteins, bacteria, bacteriophage MS2 and pollens. It shows differences between microorganisms grown and prepared in different conditions. The fluorescence data recorded in the study are necessary for the development of devices based on laser induced fluorescence that will be used for real time identification of airborne pathogenic microorganisms.

**Keywords:** bacteria fluorescence spectra, biological aerosols, autofluorescence

**Universal Decimal Classification:** 577