

OPRACOWANIE CHEMIOTAKSONOMICZNEJ METODY WYKRYWANIA OBECNOŚCI BAKTERII Z RODZAJU *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* W PRÓBKACH WODY TECHNIKĄ GC-MS

ELABORATION OF CHEMOTAXONOMICAL DETECTION METHOD OF PRESENCE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* CULTURES IN WATER SAMPLES BY GC-MS TECHNIQUE

Anna Czajkowska, Beata Paziak-Domańska, Magdalena Gajewska, Beata Bartodziejska

Zakład Jakości Żywności, Oddział Chłódnicwa i Jakości Żywności w Łodzi,
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Warszawie

Słowa kluczowe: *Legionella pneumophila*, woda, kwasy tłuszczowe, analiza, GC-MS

Key words: *Legionella pneumophila*, water, fatty acids, analysis, GC-MS

STRESZCZENIE

Celem pracy było opracowanie chemiotaksonomicznej metody wykrywania obecności bakterii *Legionella pneumophila* w próbkach wody. W badaniach określono profil kwasów tłuszczowych związanych estrowo, występujących w ścianie komórkowej wzorcowego szczepu *Legionella pneumophila* 33152, pochodzącego z kolekcji ATCC typ Philadelphia 1. Został on zastosowany jako wzorzec do wykrywania obecności *L. pneumophila* w wodzie pochodzącej z sieci wodociągowej. W badaniach, próbki wody poddawano estryfikacji i ekstrakcji, a następnie oznaczono specyficzne markery taksonomiczne tych bakterii metodą chromatografii gazowej z detekcją masową (GC-MS). Wyznaczono granicę detekcji metody na 100 jtk/100 ml wody. Nowatorska metoda chemiotaksonomiczna może być stosowana do wstępnej selekcji próbek wody w rutynowych badaniach. Jej zastosowanie skraca czas analizy, poprzez ograniczenie liczby próbek diagnozowanych klasycznymi metodami mikrobiologicznymi.

ABSTRACT

The aim of this study was elaboration of chemotaxonomical detection method of presence *Legionella pneumophila* cultures in water samples. In research, the profile of ester-linked fatty acids were specified, which are situated in the cell wall of the model bacteria cultures *Legionella pneumophila* 33152, which originate from ATCC collection Philadelphia 1 type. The profile were applied as a standard to detection *L. pneumophila* presence in water supply network. During the research, water samples were esterified and extracted and then specific taxonomic markers of this bacteria were indicated by gas chromatography coupled with mass spectrometry technique (GC-MS). The limit of detection were determined to 100 jtk/100 ml water. Innovative chemotaxonomic method may be used in preliminary selection of water samples in routine analyses. Its application cuts down on time of analysis, by limitation on number of samples being diagnosed by classical microbiological methods.

WSTĘP

Woda przeznaczona do spożycia przez ludzi powinna charakteryzować się właściwymi cechami organoleptycznymi i fizykochemicznymi oraz nie powinna zawierać drobnoustrojów chorobotwórczych. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz. U. Nr 61, poz. 417), wprowadziło obowiązek badania w wodzie bakterii z rodzaju *Legio-*

nella, chorobotwórczych Gram-ujemnych pałeczek, które są czynnikiem etiologicznym legionelozy, groźnej zakaźnej choroby człowieka. Wśród rejestrowanych zachorowań, 80-90% przypadków wywołanych jest przez gatunek *Legionella pneumophila*, w tym 50-75% przez *L. pneumophila* grupy serologicznej 1[10].

Mikrobiologiczne metody badań, w kierunku wykrywania *L. pneumophila* są prowadzone zgodnie z obowiązującą normą PN-ISO 11731-2 z 2006 r. i wymagają zastosowania wielu etapów postępowania m.in.

Adres do korespondencji: Beata Bartodziejska, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie, Oddział Chłódnicwa i Jakości Żywności w Łodzi, Zakład Jakości Żywności, 92-202 Łódź, Al. M.J. Piłsudskiego 84, tel. 42 674 64 14, fax 42 674 81 24, e-mail: beabart@cobrelj.com.pl

eliminacji flory towarzyszącej oraz wykrycia i potwierdzenia gatunku, poprzez użycie szeregu wybiórczo-namnażających pożywek. Dlatego też poszukuje się alternatywnych, szybkich i czułych metod identyfikacji tych drobnoustrojów, opartych na instrumentalnej analizie składu komponentów komórkowych [1].

Chemiotaksonomia to nauka zajmująca się klasyfikacją i identyfikacją mikroorganizmów na podstawie ich specyficznych składników chemicznych lub produktów metabolizmu. Jest ona coraz częściej stosowana w diagnostyce drobnoustrojów, w oparciu o analizę strukturalnych składników osłon komórkowych, stanowiących specyficzne markery taksonomiczne bakterii [9]. Chemiotaksonomia może posłużyć do różnicowania drobnoustrojów zarówno w obrębie rodzaju jak i danego gatunku bakterii. Badania te polegają m.in. na określeniu profilu kwasów tłuszczowych związanych estrowo i amidowo, cukrów, aminokwasów, lipidów i innych związków występujących w osłonach komórkowych drobnoustrojów, umożliwiając wykrywanie różnic w składzie ścian komórkowych bakterii i ich klasyfikację [3].

Integralnym składnikiem ściany komórkowej wszystkich bakterii Gram-ujemnych, w tym rodzaju *Legionella*, jest lipopolisacharyd (LPS, endotoksyna). Lipid A, najbardziej konserwatywny pod względem budowy podregion LPS pałeczek *Legionella*, determinuje nowy, nie występujący w komórkach innych Gram-ujemnych bakterii, typ lipopolisacharydu. Szkielet lipidu A lipopolisacharydu tworzą dwie cząsteczki połączone ze sobą aminocukrów - 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukozy [8]. W szkielecie cukrowym lipidu A są cztery miejsca przyłączenia hydrokso kwasów wiązaniem amidowym. Kwasy tłuszczowe w lipidzie A mogą być także pośrednio związane z aminocukrem wiązaniem estrowym. U bakterii *Legionella spp.* występuje osiem specyficznych dla rodzaju, niehydroksylowanych rozgałęzionych kwasów tłuszczowych oraz pięć kwasów długołańcuchowych [7, 8]. Ogólnie, w skład kwasów tłuszczowych związanych estrowo wchodzi głównie nasycone kwasy łańcuchowe (proste i rozgałęzione) oraz nienasycone kwasy tłuszczowe, a także małe ilości hydrokso kwasów [7].

Ta odmienność budowy lipidu A bakterii z rodzaju *Legionella*, umożliwiła podjęcie badań, mających na celu opracowanie metody chemiotaksonomicznej opartej na analizie strukturalnych kwasów tłuszczowych, stanowiących markery taksonomiczne, do wykrywania skażenia próbek wody bakteriami z rodzaju *Legionella*.

MATERIAŁ I METODY

Opracowanie wzorcowego profilu kwasów tłuszczowych *Legionella pneumophila*

W celu uzyskania masy bakteryjnej, szczep wzorcowy *L. pneumophila* 33152 z kolekcji ATCC typ Philadelphia 1 wysiano na pożywkę wybiórczo-namnażającą BCYE (Oxoid). Po czterech dobach inkubacji w temperaturze 36°C, drobnoustroje zebrano do fizjologicznego roztworu soli. W celu zabicia komórek bakteryjnych, zawiesinę poddano działaniu fenolu, który następnie odpłukano poprzez wirowanie przy 4000 obr/min przez 15 min, a uzyskany osad suszono w temp. 44°C.

Suchą masę bakteryjną zawieszono w 1 ml wody destylowanej i poddano hydrolizie alkalicznej w temperaturze 100°C przez 30 min, dodając 1 ml 15% wodorotlenku sodu w 50% wodnym roztworze metanolu. Do schłodzonej próbki, zawierającej uwolnione kwasy tłuszczowe dodano 1,5 ml 25% kwasu solnego w metanolu (pH 2) i ogrzewano w łaźni wodnej w temperaturze 85°C przez 15 min. W wyniku karbometylacji otrzymano zestryfikowane wolne kwasy tłuszczowe, które ekstrahowano z 2 ml mieszaniny eter dietylowy:n-heptan (1:1) przez 10 min.

Próbkę zmetylowanych kwasów tłuszczowych bakterii *L. pneumophila* analizowano metodą chromatografii gazowej z detektorem mas (GC-MS). W celu ustalenia składu chemicznego badanych próbek zostały wykonane analizy GC, GC-MS równocześnie z zastosowaniem dzielnika przepływu (SGE) w chromatografii gazowym Trace GC Ultra połączonym ze spektrometrem mas DSQ II (Thermo Electron). Profil chemiczny ustalono na podstawie porównania widm masowych badanych próbek z widmami masowymi substancji wzorcowych zawartych w komputerowych bibliotekach widm NIST i Wiley. Warunki analizy GC: kolumna HP Innowax (Agilent J&W) 30 m×0,25 mm×0,25 µm, program temp. 120°C (2 min) - 245°C (30 min), 4°C/min, temp. dozownika (SSL) 260°C, temp. detektora (FID) 260°C, gaz nośny - hel, prędkość przepływu 1 ml/min, podział (split) 1:10, objętość próbki 10 µl, temp. linii transferowej 250°C. Parametry spektrometru mas: energia jonizacji 70 eV (EI), temp. źródła jonów 200°C.

Wykrywanie pałeczek *Legionella pneumophila* w próbkach wody

Szczep wzorcowy *L. pneumophila* ATCC 33152 typ Philadelphia 1 wysiano na pożywkę wybiórczo-namnażającą BCYE (Oxoid), inkubowano cztery doby w temperaturze 36°C, a następnie zebrano kolonie do roztworu soli fizjologicznej. Gęstość zawiesiny bakteryjnej ustalono poprzez porównanie ze skalą *McFarlanda* standardem nr 5 ($1,5 \times 10^9$ jtk/ml).

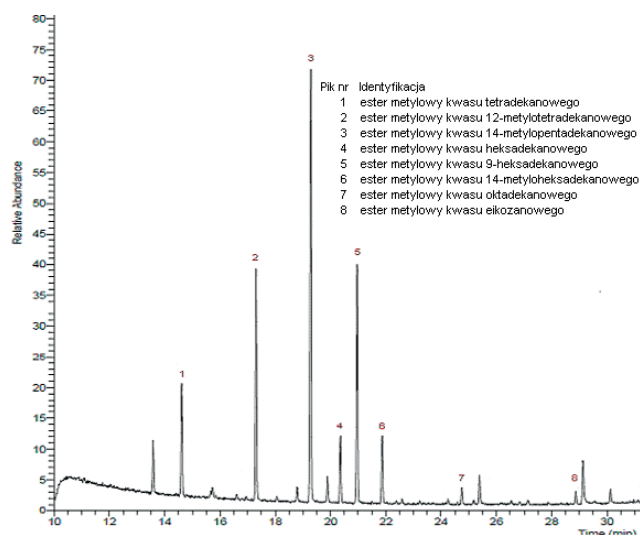
Do badań stosowano wodę pobraną z sieci wodociągowej zakażoną różnym *inoculum L. pneumophila* (1×10^2 oraz 1×10^9 jtk/100ml). Próbkę zatężano na wyparce obrotowej pod próżnią do objętości ok. 10 ml, a następnie poddano estryfikacji, dodając do próbek 5 ml metanolu i 5 ml wodorotlenku sodu w 50% roztworze

metanolu i ogrzewano przez 30 min w temperaturze 100°C. Po inkubacji w łaźni wodnej dodano ok. 5 ml 25% kwasu solnego w metanolu przy pH 2 i ogrzewano przez 15 min w temperaturze 85°C. Tak otrzymane próbki ekstrahowano rozpuszczalnikiem z 2 ml mieszaniny eter dietylowy:n-heptan w stosunku 1:1 przez 10 min. Do wykrywania obecności bakterii *L. pneumophila* w próbkach wody zastosowano kolumnę Stabilwax-DA (Restek) 30 m×0,32 mm×0,25 µm oraz przepływ gazu nośnego przez kapilarę 1,5 ml/min, co pozwoliło na uzyskanie lepszego rozdzielności chromatograficznej. Pozostałe warunki analizy GC-MS były takie same, jak do określenia profilu wzorcowego badanych bakterii.

Zastosowana w pracy własna metodyka derywatywacji i ekstrakcji powstała w oparciu o metody opisane w literaturze [2, 4, 5, 6].

WYNIKI I DYSKUSJA

Suchą masę *L. pneumophila* 33152 z kolekcji ATCC typ Philadelphia 1 poddano estryfikacji i ekstrakcji rozpuszczalnikiem, a następnie analizowano metodą GC-MS. Wynikiem serii badań było uzyskanie wzorcowego profilu zmetylowanych kwasów tłuszczowych tych bakterii (Ryc. 1).



Ryc. 1. Chromatogram gazowy wzorcowego profilu kwasów tłuszczowych związanych estrowo szczepu *Legionella pneumophila* ATCC 33152 typ Philadelphia 1
Gas chromatogram of ester-linked fatty acids standard profile *Legionella pneumophila* cultures ATCC 33152 Philadelphia 1 type

Identyfikacji pików dokonano na podstawie analizy widm masowych, integrując sygnały estrów metyloowych kwasów tłuszczowych w czasie 30 min. W badanej próbce, wśród kwasów tłuszczowych związanych estrowo, występują nasycone kwasy łańcuchowe proste

i monometylo-rozgałęzione oraz nienasycone kwasy tłuszczowe, łącznie osiem niehydroksylowanych kwasów tłuszczowych zawierających od 14 do 20 atomów węgla w cząsteczce.

Na podstawie stosunku powierzchni pików do powierzchni wszystkich zidentyfikowanych pików estrów niehydroksylowanych kwasów tłuszczowych obliczono procentowy udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w profilu (Tab. 1).

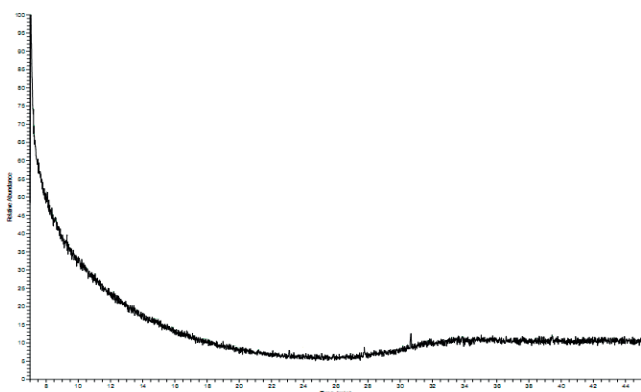
Tabela 1. Procentowy udział w profilu poszczególnych kwasów tłuszczowych szczepu wzorcowego bakterii *L. pneumophila* ATCC 33152 typ Philadelphia 1
Percentage participation in profile of each fatty acid for standard cultures *L. pneumophila* ATCC 33152 Philadelphia 1 type

Kwas tłuszczowy	Czas retencji [min]	Powierzchnia pików [mV·s]	Udział procentowy [%]
C _{n14:0} *	14,7	10,178	8,7
C _{a15:0}	17,4	21,787	18,7
C _{i16:0}	19,3	38,756	33,2
C _{n16:0}	20,4	6,896	5,9
C _{16:1}	21,0	27,262	23,4
C _{a17:0}	21,9	7,268	6,2
C _{n18:0}	24,8	2,509	2,2
C _{n20:0}	28,9	1,958	1,7
suma			116,614
			100

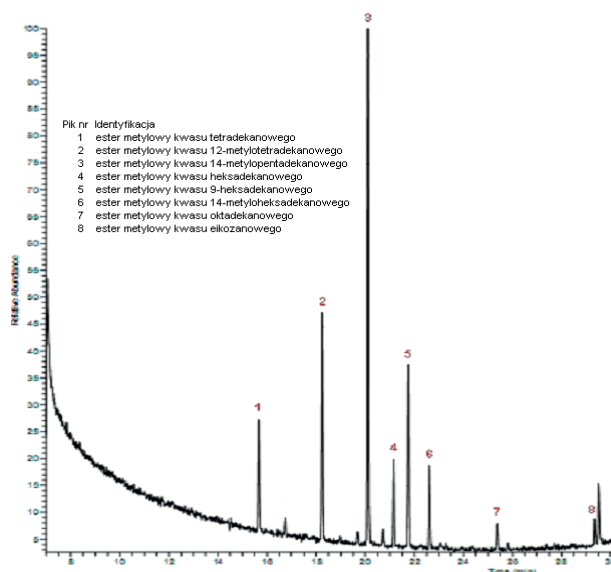
* liczba po lewej stronie wskazuje na ilość atomów węgla w cząsteczce, liczba po prawej stronie to ilość wiązań podwójnych, „i” – wskazuje pozycję *iso* grupy metylowej, „a” – wskazuje pozycję *anteiso* grupy metylowej

Głównym i dominującym kwasem tłuszczowym w profilu *L. pneumophila* jest kwas 14-metylopentadekanowy C_{i16:0} (33%), następnie kwas 9-heksadekanowy C_{16:1} (23%), kwas 12-metylotetradekanowy C_{a15:0} (19%) oraz kwas tetradekanowy C_{n14:0} (9%), kwas 14-metyloheksadekanowy C_{a17:0} (6%), kwas heksadekanowy C_{n16:0} (6%), a także w mniejszych ilościach kwas oktadekanowy C_{n18:0} i kwas eikozanowy C_{n20:0}. Na podstawie otrzymanych wyników kwasy C_{i16:0}, C_{16:1}, C_{a15:0} oraz C_{n14:0} można określić jako charakterystyczne markery taksonomiczne *L. pneumophila*.

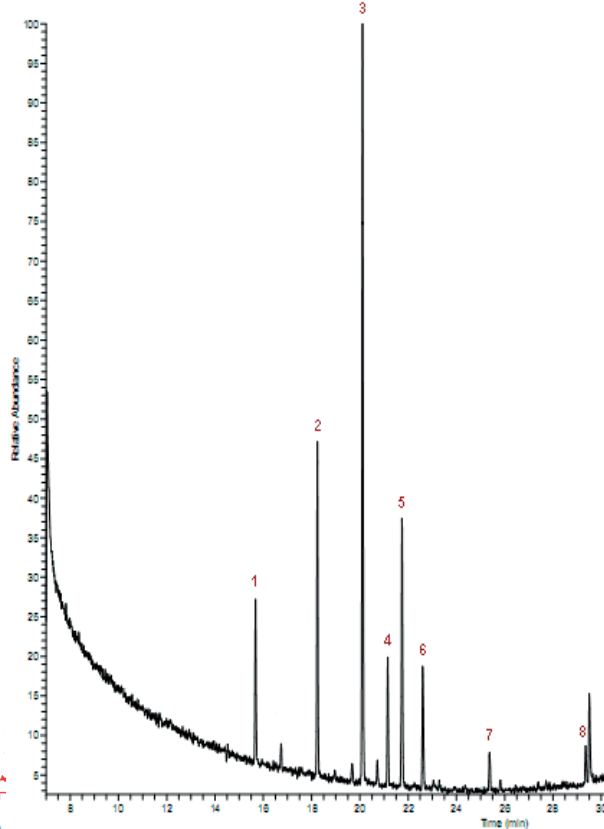
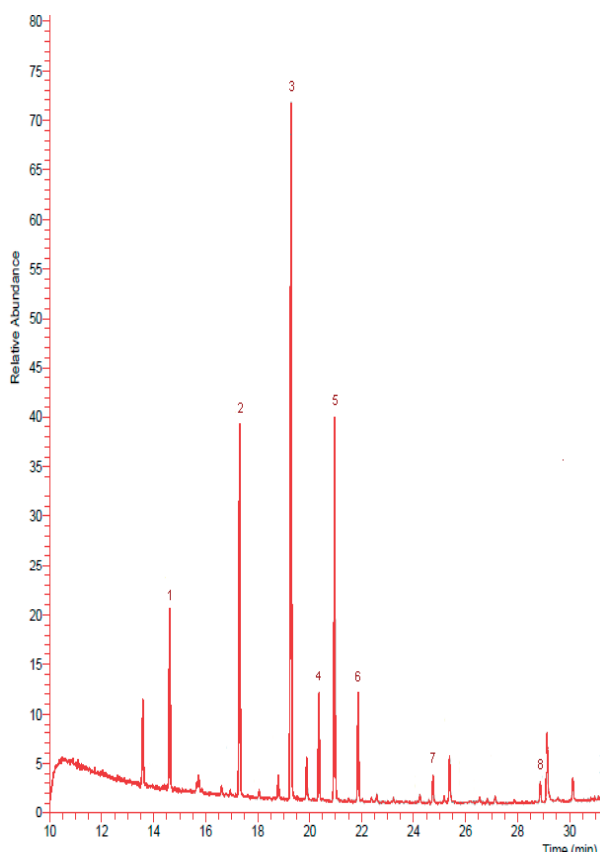
Jak wynika z danych piśmiennictwa, na podstawie względnej ilości C_{i16:0}, C_{16:1}, C_{a15:0} 23 gatunki bakterii z rodzaju *Legionella*, można podzielić na trzy grupy. Dziewięć gatunków, w tym *L. pneumophila*, zawierających w LPS jako główne kwasy C_{i16:0} lub C_{16:1} lub obydwa C_{i16:0} i C_{16:1}, zostało zakwalifikowanych do grupy 16C. Siedem gatunków tych drobnoustrojów, zawierających kwas C_{a15:0} o stężeniu w przybliżeniu dwukrotnie większym niż C_{i16:0}, zostało zaliczonych do grupy A15. Pozostałe gatunki *Legionella*, zawierające oba główne kwasy C_{a15:0} i C_{i16:0} w tych samych ilościach, zostały wliczone do grupy A15/16C. Różnice w zawartości kwasów tłuszczowych pozwalają na



Ryc. 2. Chromatogram gazowy próbki wody pobranej z instalacji wodociągowej, niezakażonej bakteriami *L. pneumophila*
Gas chromatogram of water sample collected from water supply network, free from *L. pneumophila* cultures



Ryc. 3. Chromatogram gazowy estrów metylowych kwasów tłuszczowych próbki wody zakażonej 1×10^9 jtk/100 ml bakterii *L. pneumophila*
Gas chromatogram of ester-methylated fatty acids in water sample infected by 1×10^9 jtk/100 ml *L. pneumophila* cultures



Ryc. 4. Chromatogramy gazowe: a - wzorcowy profil estrów metylowych kwasów tłuszczowych *L. pneumophila*, b - próbki wody zakażonej 1×10^9 jtk/100 ml bakterii *L. pneumophila*
Gas chromatograms: a - standard profile of ester-methylated fatty acids *L. pneumophila* cultures, b - water sample infected by 1×10^9 jtk/100 ml *L. pneumophila* cultures

zróznicowanie całego rodzaju *Legionella*. Stwierdzono także, że obecność kwasu $C_{11:6,0}$ w dużym stężeniu pozwala odróżnić bakterie *L. pneumophila* i *L. spiritensis* od innych gatunków. Dodatkowo te dwa gatunki zawierają rozgałęzione łańcuchy nienasyconego kwasu tłuszczowego 16-węglowego, który jest nieobecny we wszystkich gatunkach z grupy 16C, za wyjątkiem *L. oakridgensis* [4].

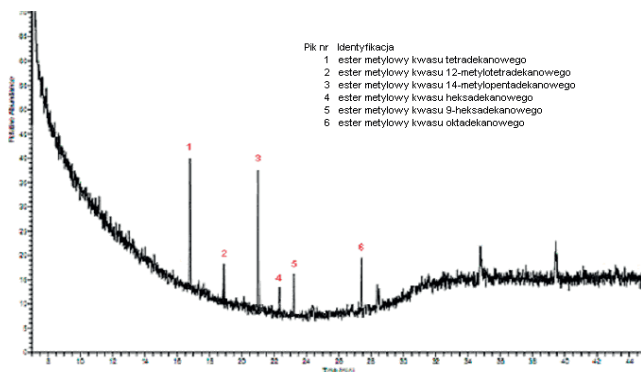
Otrzymany profil kwasów tłuszczowych posłużył jako wzorcowy w odniesieniu do profili otrzymanych z badanych próbek wody.

Analizie chromatograficznej poddano wodę pobraną z instalacji wodociągowej. Analiza zderzywaczowa próbki wody, nie wzbogaconej bakteriami, wykazała brak znaczących interferencji w badanym obszarze elucji estrów metylowych kwasów tłuszczowych (Ryc. 2).

Następnie analizie chromatograficznej poddano próbki wody wodociągowej, zakażanej ustalonym maksymalnym inoculum *L. pneumophila* (1×10^9 jtk/100ml) (Ryc. 3.)

Otrzymany chromatogram porównano z wzorcowym chromatogramem, określającym profil związanych estrowo kwasów tłuszczowych *L. pneumophila*. Interpretacja otrzymanych wyników wykazała obecność w badanych próbkach wody wodociągowej kwasów tłuszczowych, markerów charakterystycznych dla tego gatunku bakterii (Ryc. 4).

Zgodnie z wymaganiami rozporządzenia Ministra Zdrowia (Dz. U. Nr 61 poz. 417), wodę uważa się za zakażoną pałeczkami *Legionella spp.*, jeśli w 100 ml wody wykrywa się powyżej 100 jtk tych bakterii. Dlatego też granicę detekcji opracowanej metody ustalono na 1×10^2 jtk/100ml, na podstawie analizy próbek wody zakażonych bakteriami. W badanych próbkach wykryto, w spodziewanym czasie retencji, estry kwasów tłuszczowych w ilości umożliwiającej ich identyfikację. Próbkę wody zakażoną żywymi bakteriami (100 jtk),



Ryc. 5. Chromatogram gazowy próbki wody pobranej z instalacji wodociągowej zakażonej 100 jtk/100 ml bakterii *L. pneumophila*
Gas chromatogram of water sample collected from water supply network infected by 100 jtk /100 ml *L. pneumophila* cultures

zawierały markery charakterystyczne dla profilu kwasów tłuszczowych *L. pneumophila* ($C_{11:6,0}$, $C_{16:1}$, $C_{a15:0}$, $C_{n14:0}$). Analiza wykazała, że możliwe jest oznaczenie jakościowe próbki wody zawierającej 100 jtk bakterii z rodzaju *Legionella*. (Ryc. 5).

Opracowana metoda chemiotaksonomiczna umożliwia wykrycie markerów taksonomicznych pochodzących od żywych jak i martwych bakterii. Może być wykorzystana do wstępnej analizy dużej liczby badanych próbek wody, co posłuży do ich szybkiej selekcji. Uzyskanie negatywnego wyniku, przy użyciu tej techniki, wyklucza konieczność dalszego postępowania diagnostycznego, a badaniom mikrobiologicznym poddaje się jedynie próbki, w których wykryto charakterystyczne markery. Brak konieczności stosowania, w każdym przypadku, klasycznych metod hodowli, wiąże się z oszczędnością stosowania drogich pożywek mikrobiologicznych, tym samym ogranicza pracochłonność i czasochłonność kolejnych etapów, wynikających z procedur mikrobiologicznych.

Opracowana metoda znalazła zastosowanie w rutynowych badaniach rzeczywistych próbek wody.

WNIOSKI

1. Określono specyficzny wzorcowy profil związanych estrowo kwasów tłuszczowych LPS - u *Legionella pneumophila*, przy zastosowaniu własnej opracowanej metodyki.
Za charakterystyczne markery taksonomiczne *L. pneumophila* uznano kwas 14-metylopentadekanowy, kwas 9-heksadekanowy, kwas 12-metylotetradekanowy oraz kwas tetradekanowy.
2. Granicę wykrywalności metody wyznaczono na 100 jtk/100 ml wody, co odpowiada wymaganiam rozporządzenia z 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi.
3. W przypadku wykrycia charakterystycznych markerów *L. pneumophila*, istnieje konieczność potwierdzenia wykrytego zakażenia wody, metodami mikrobiologicznymi. Uzyskanie negatywnego wyniku metodą chemiotaksonomiczną kończy postępowanie diagnostyczne.
4. Dzięki zastosowaniu metody chemiotaksonomicznej możliwe jest zminimalizowanie błędów diagnostycznych i znaczne przyspieszenie rozpoznania ewentualnych zakażeń wody tymi drobnoustrojami.
5. Zastosowanie tej metody zmniejsza liczbę próbek przeznaczonych do badań mikrobiologicznych, ogranicza koszty i czas badań.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bzducha A.*: Szybkie metody identyfikacji mikroorganizmów w żywności. *Medycyna Wet.*, 2007, 7, 773-777.
2. *Eerola E., Lehtonen O.P.*: Optimal data processing procedure for automatic bacterial identification by Gas-Liquid Chromatography of cellular fatty acids. *J. of Clin. Microbiol.*, 1988, 26, 1745-1753.
3. *Fox A., Rogers J.C., Fox K.F., Schnitzer G., Morgan S.L., Brown A., Aono R.*: Chemotaxonomic differentiation of *Legionellae* by detection and characterization of aminodeoxyhexoses and other unique sugars using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. of Clin. Microbiol.*, 1990, 28, 546-552.
4. *Lambert M.A., Moss C.W.*: Cellular fatty acid compositions and isoprenoid quinone contents of 23 *Legionella* Species. *J. of Clin. Microbiol.*, 1989, 27, 465-473.
5. *Lodowska J., Zięba A., Wolny D., Węglarz L., Dzierżewicz Z.*: Metody derywatyżacji komponentów lipopolisacharydów w ocenie ich struktury chemicznej technikami chromatograficznymi. *Post. Hig. Med. Dosw.*, 2006, 60, 113-128.
6. *Mayberry W.R.*: Dihydroxy and monohydroxy fatty acids in *Legionella pneumophila*. *J. of Bacteriol.*, 1981, 147, 373-381.
7. *Moss C.W., Dees S.B.*: Further studies of the cellular fatty acid composition of legionnaires disease bacteria. *J. of Clin. Microbiol.*, 1979, 9, 648-649.
8. *Palusińska-Szys M., Drożński W.J.*: Struktura chemiczna i aktywność biologiczna lipopolisacharydu pałeczek z rodziny *Legionellaceae*. *Post. Mikrobiol.*, 2006, 45, 287-301.
9. *Paściak M., Mordalska H., Szponar B., Gamian A.*: Metody chemiotaksonomiczne w rozpoznawaniu zakażeń wywołanych przez aktynobakterie. *Postępy Hig. Med. Dosw.*, 2007, 61, 403-412.
10. *Stypułkowska-Misiurewicz H., Krogulska B., Pancer K., Matuszewska R.*: Metodyka wykrywania i oznaczania bakterii z rodzaju *Legionella* w środowisku wodnym i materiale klinicznym. PZH, Warszawa 2001.

Otrzymano: 18.05.2010

Zaakceptowano do druku: 04.11.2010