

Szybkie metody identyfikacji mikroorganizmów w żywności

ANNA BZDUCHA

Zakład Oceny Jakości Żywności Katedry Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności
Wydziału Technologii Żywności SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-782 Warszawa

Bzducha A.

Rapid methods for microorganism identification in food

Summary

The need for the rapid and precise identification methods of food pathogens and spoilage microorganisms requires the elaboration of new techniques of microbial diagnosis. This article presents the newest methods of determining food biocontaminants with particular consideration given to immunological and genetic techniques (genomics) as some of the instrumental techniques (MALDI-TOF-MS, GC-MS, GC-FID) which classify microorganisms in respect to their specific chemical cell constituents, i.e. the fingerprint rule (proteomics, lipomics).

Keywords: microorganisms, identification

Analiza żywności pod względem obecności mikroorganizmów patogennych i saprofitycznych jest jednym z podstawowych narzędzi kontroli bezpieczeństwa i jakości produktów spożywczych. Sprostanie standardom Unii Europejskiej z zakresu zapewniania bezpieczeństwa żywności, opracowanym w Białej Księdze w sprawie bezpieczeństwa żywności, 2000, oraz wymogom monitoringu oraz zarządzania ryzykiem w łańcuchu żywnościowym (Rozporządzenie 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady), zmusza do opracowywania nowych, szybkich i pewnych metod identyfikacji zagrożeń biologicznych.

Dotychczas najczęściej stosowane w technologii żywności metody identyfikacji mikroorganizmów opierają się na czasochłonnych i pracochłonnych technikach posiewu, tj. zliczaniu kolonii mikroorganizmów wzrastających na nieselektywnych i selektywnych podłożach. Przetwórstwo surowców spożywczych opiera się głównie na fizycznych i chemicznych metodach utrwalania żywności (obniżanie pH środowiska, stosowanie wysokich/niskich temperatur i ciśnienia, obniżanie aktywności wody, dodatek substancji chemicznych i antybiotyków). Niekorzystne warunki środowiskowe stymulują mikroorganizmy do nabywania oporności. Stwarza to zagrożenie w zapewnianiu bezpieczeństwa żywności. Badania naukowe potwierdzają, że niektóre patogeny żywności (np. z rodzaju *Campylobacter*) posiadają zdolność do tworzenia form nie dających wzrostu kolonii, mimo zachowanej aktywności metabolicznej, tzw. VBNC – viable but not culturable (8). Proces przechodzenia komórek w taki stan, regulowany na poziomie zmian genetycznych, jest prawdopodobnie jednym

z mechanizmów nabywania oporności przez mikroorganizmy pod wpływem stresowych warunków wzrostu. Biorąc pod uwagę powyższy fakt, wiarygodność tradycyjnych metod posiewu staje się kwestią dyskusyjną. Zaobserwowano ponadto, że optymalizacja składników podłoża oraz warunków inkubacji nie zwiększa istotnie poziomu szybkiej regeneracji uszkodzonych komórek (3).

Przedstawione argumenty przemawiają za koniecznością stosowania w przemyśle spożywczym takich metod diagnostycznych, które precyzyjnie oceniają ryzyko obecności niepożądanego mikroflory w krótkim czasie. Badania mikrobiologiczne powinny rozpoczynać się od kontroli surowców, następnie przejść w kontrolę procesu produkcyjnego i systemu utrzymywania higieny linii technologicznej oraz opakowań, a docelowo analizy gotowego produktu. Procedury muszą wiarygodnie ocenić jakość mikrobiologiczną produktu, zanim trafi on na rynek. Jest to jednocześnie realizacja założeń systemu HACCP i weryfikacja poprawności jego działania.

Metody diagnostyki mikrobiologicznej

Zapewnianie jakości i wiarygodności wyników analiz mikrobiologicznych na poziomie międzynarodowym pociąga za sobą konieczność akredytacji laboratoriów, walidację metod, stosowanie standardów wewnętrznych i automatyzację technik analitycznych, dzięki czemu wyniki stają się obiektywne i powtarzalne. Powtarzalność wyników jest czynnikiem gwarantującym poprawność metody.

Zautomatyzowane lub manualne metody oznaczania mikroorganizmów w żywności powinny charakteryzo-

wać się takimi atrybutami, jak m.in. szybkość oznaczenia z jednoczesną gwarancją dokładności wyniku (minimalna liczba fałszywie negatywnych oraz fałszywie pozytywnych wyników), zależna od czułości i precyzji metody. Testy diagnostyczne powinny być proste w wykonaniu, możliwe do bezpośredniej integracji z systemem monitoringu procesu przetwórczego, a stosowane w nich odczynniki łatwo dostępne i stabilne podczas przechowywania.

Techniki fluorescencyjne i luminescencyjne. Szybki postęp w rozwoju nauk związanych z biotechnologią (biochemii, biofizyki, chemii, immunologii, genetyki) wpływa na stosowanie ich osiągnięć w analizie żywności. Zwiększa się zainteresowanie metodami wykorzystującymi nie tylko zdolność namnażania się mikroorganizmów, ale ich kryteria identyfikacyjne (4). Kryteria te opierają się najczęściej na wiedzy o podstawowych, niezbędnych do przeżycia, wymaganiach mikroorganizmów.

Techniki fluorescencyjne bazują, między innymi, na obecności nienaruszonej błony cytoplazmatycznej żywych komórek, która jest barierą między cytoplazmą a środowiskiem zewnątrzkomórkowym. Mierzona jest spójność membrany na podstawie wybarwienia się składników wewnątrzkomórkowych pod wpływem określonych barwników (propionian jodu, bromek etyldyny, DAPI), np. DNA, przy czym proces wybarwienia się zachodzi tylko w komórkach uszkodzonych.

Fluorescencyjnie analizowane są również specyficzne enzymy, gdzie substrat enzymu połączony z odpowiednim barwnikiem, np. fluoresceiną, produkty biosyntezy wewnątrzkomórkowej, jak białka, lipidy, polisacharydy, kwasy nukleinowe, w tym rRNA (FISH – fluorescence in situ hybridization) (8). Metoda FISH znajduje zastosowanie podczas detekcji mikroorganizmów na poziomie taksonomicznym przy użyciu specyficznych fluorescencyjnych oligonukleotydów rRNA i fluorescencyjnych antygenów (11). Do pomiaru liczby komórek znaczących fluorescencyjnie wykorzystywane są najczęściej optyczne sensory, jak mikroskopy fluorescencyjne czy cytometry przepływowo.

W ostatnim 15-leciu obserwowany jest znaczny wzrost zainteresowania cytometrią przepływową. Ideą oznaczenia jest pomiar pochłaniania wiązki światła laserowego przez znaczone fluorochromem składniki komórki. Techniki optyczne połączone z fluorymetrią dają odpowiedź odnośnie do stanu fizjologicznego nawet pojedynczej komórki, rozróżniają komórki martwe od żywych, a łącznie z metodami separacji immunologicznej drobnoustrojów – dają wynik ilościowo specyficzny. Czułość tych technik jest bardzo wysoka, np. możliwość identyfikacji 10^2 komórek drożdży i 10^2 - 10^3 komórek bakterii w 1 ml próbki (11). Pewnego rodzaju ograniczeniem są koszty przyrządów pomiarowych.

Do detekcji mikroorganizmów w żywności stosowane są również metody opierające się na pomiarze luminescencji, np. ATP (adenozyno-5-trifosforan) – bioluminescencja w kompleksie z lucyferazą, metody znakowania czynnikami luminescencyjnymi lub stosujące substraty o takich właściwościach. ATP-bioluminescencja wykorzystywana jest przede wszystkim do szybkiej oce-

ny stanu higieny linii technologicznych, np. czystości powierzchni produkcyjnych. Mierzona jest wówczas ogólna ilość ATP pochodzenia mikrobiologicznego, jak i z pozostałości organicznych (15). Jednakże taki pomiar nie określa jednoznacznie aktywności metabolicznej mikroorganizmów w badanej próbce.

I na koniec, do najprostszych sposobów można zaliczyć wprowadzone udoskonalenia zliczania kolonii na różnicujących podłożach, polegające na automatyzacji liczenia, a to dzięki dodawaniu do podłoży składników umożliwiających m.in. pomiary fluorymetryczne.

Szybkie testy zmian metabolicznych. Opracowano wiele zestawów pozwalających na szybką identyfikację mikroorganizmów patogennych i saprofitycznych pod względem charakterystycznych cech morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych. Zestawy te (kity) są zminiaturyzowane, proste w wykonaniu i dają wynik w krótkim czasie (6). Znane są m.in. testy API (Biomeriëux), BBL Minitek system (Becton Dickinson Microbiological Systems), Biolog system (Biolog). Opierają się głównie na reakcjach chemicznych i biochemicznych przeprowadzanych na gotowych podłożach wzrostowych z dodatkiem odpowiednich odczynników. Wykorzystywana jest przy tym specyficzność przemian różnych źródeł węgla przez mikroorganizmy oraz specyfika innych szlaków metabolicznych.

Istnieją rozwiązana w pełni zautomatyzowane. Jednakże użycie do analizy żywności rozwiązań stworzonych głównie na potrzeby mikrobiologii klinicznej może stwarzać trudności, wynikające ze złożoności składników matrycy żywnościowej i ich interferencji ze składnikami testów. Konieczna jest zatem adaptacja tych testów i stosowanie szczepów referencyjnych (6).

Pomiary zmian fizycznych w podłożu wzrostowym. Dostępne są zautomatyzowane metody mierzące zmiany fizyczne zachodzące w medium wzrostowym pod wpływem rozwoju drobnoustrojów (przemian anabolicznych i katabolicznych). Przykładem może być pomiar impedancji, opierający się na zmianie przewodności (oporności) elektrycznej medium. System stosowany jest do określania ogólnej liczby drobnoustrojów. Nie jest możliwa jego aplikacja do badań prób z małą zawartością drobnoustrojów, ponadto istnieje prawdopodobieństwo wpływu matrycy żywnościowej na prawidłowy przebieg oznaczenia (2).

Kolejnym przykładem jest analiza zmian gęstości optycznej podłoża, na której opierają się pomiary turbidymetryczne. W tym przypadku wielkość zmian skorelowana jest z ogólną liczbą drobnoustrojów (15).

Biosensory

W ostatnich latach zauważalny jest rozwój metod, których narzędziami analitycznymi są biosensory reagujące ze specyficzną sobie substancją obecną w środowisku reakcji. Wiele naturalnie występujących cząsteczek zwanych bioreceptorami posiada właściwości „biorozpoznawalności”. Należą do nich: antygeny, enzymy, receptory komórkowe, kwasy nukleinowe, które stanowią podstawę projektowania biosensorów (20).

Biosensory immunologiczne. Sensory immunologiczne opierają się na charakterystycznym wiązaniu typu

antygen–przeciwciało, które jest kompleksem specyficznym. Czułość techniki zależy od stopnia powinowactwa antygeny do przeciwciała, od sił wiążących oba składniki oraz od wartościowości przeciwciała, tj. od liczby wiązań, które może utworzyć przeciwciało z antygenami (2). Wyróżnia się dwie klasy oznaczeń immunologicznych: homogeniczne i heterogeniczne. W pierwszym typie nie stosuje się markerowego połączenia: antygen–przeciwciało, gdyż nie zachodzi konieczność rozdzielania przeciwciał skoniugowanych od niezwiązanych z antygenem. Do oznaczeń heterogenicznych konieczne jest znakowanie antygenów, np. enzymami lub barwnikami fluorescencyjnymi oraz oddzielanie przeciwciał niepołączonych od tworzących kompleksy z antygenami. Przykładowymi rozwiązaniami immunologicznymi są lateksowe testy aglutynacyjne, skonstruowane z cząstek lateksu, pokrytych warstwą przeciwciał. Stosowane są do identyfikacji serologicznej czystych kultur drobnoustrojów. W obecności odpowiedniego substratu przebieg reakcji w układzie pomiarowym jest łatwy do obserwacji, gdyż zachodzi widoczna aglutynacja. Wymienić można także testy immunodifuzyjne, w których na matrycę żelową wzbogaconą przeciwciałami nanosi się próbkę, a obecność antygenów wywołuje w żelu strąty. Testem heterogenicznym jest ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays). Czułość testów ELISA (10^4 – 10^6 jednostek/ml) zmusza często do wstępnego namnażania badanych drobnoustrojów w próbkach o małej ich zawartości. Testy te nie dają odpowiedzi odnośnie do żywotności drobnoustroju.

Obiecujący jest rozwój produkcji zminiaturyzowanych immunosensorów w formie mikrochipów i mikro-macierzy.

Omawiając metody immunologiczne należy wspomnieć o możliwości wykorzystania wiązań typu przeciwciało–antygen jako sposobu fizycznej koncentracji i separacji specyficznych mikroorganizmów (z mieszaniny różnych drobnoustrojów) na matrycy materiałów pochodzenia organicznego. Stosuje się w tym celu, np. izolację immunomagnetyczną na kulkach paramagnetycznych pokrytych warstwą przeciwciał. Daje to możliwość pominięcia długotrwałego etapu namnażania drobnoustrojów przed ich identyfikacją dowolnymi technikami.

Testy genetyczne (oparte głównie na badaniu DNA). Ostatnie dziesięciolecie możemy nazwać erą metod molekularnej identyfikacji materiałów biologicznych, różnicujących je genotypowo (genomics), np. w przypadku drobnoustrojów na poziomie gatunku, rodzaju, szczepu. Postęp techniczny umożliwił podanie kompletnej informacji genetycznych (sekwencji DNA) szeregu mikroorganizmów.

Obecnie najpowszechniej stosowaną techniką genetyczną wspomagającą identyfikowanie jest amplifikacja DNA metodą PCR – reakcja łańcuchowa polimeryzacji. Metoda polega na transkrypcyjnym powielaniu specyficznych fragmentów nici DNA lub RNA (500–3000 par nukleotydów) w cyklu reakcji z zastosowaniem odpowiednich sekwencji starterowych i enzymów polimerazy. Molekularne techniki identyfikacji mikroorganizmów w żywności opisuje dokładnie Osek i wsp. (14).

Czułość metody PCR zależy od liczby kopii powielonych fragmentów DNA, wieku kultury drobnoustrojów, sposobu lizy komórki. Metoda PCR nie odróżnia materiału genetycznego komórek żywych od martwych. W tym celu oznaczać można np. mRNA, jednakże forma ta jest bardzo labilna i stąd trudna do detekcji. Rozwój metod genetycznych powinien dążyć do próby ilościowego oznaczania drobnoustrojów różnych gatunków jednocześnie (2).

Inny rodzaj testów genetycznych to sekwencjonowanie DNA chromosomalnego lub plazmidowego z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych i elektroforetycznym rozdziale fragmentów na żelach (restriction length fragment polymorphisms). Fragmenty te, po przeniesieniu na membranę są poddawane hybrydyzacji ze znaczoną sondą kwasu nukleinowego. Otrzymuje się wówczas obraz prążków specyficzny dla badanego gatunku lub szczepu. Kolejny przykład to sekwencjonowanie 16S rDNA i 16S–23S rRNA, jako wewnątrzgenowych regionów różniących się wielkością i sekwencją nawet wśród blisko spokrewnionych taksonomicznie grup (1). Stosuje się wówczas również hybrydyzację sond DNA lub RNA z komplementarnym fragmentem kwasu nukleinowego badanego drobnoustroju, również z zastosowaniem DNA Microarray Technology (genom chip), tj. technologii macierzowej. Radioaktywne i fluorescencyjne markery pozwalają w tej metodzie na detekcję hybryd (6).

Instrumentalna analiza składu komponentów komórkowych

Drobnoustroje identyfikuje się również technikami opartymi na analizie składu biomarkerów, m.in. białek komórkowych, komórkowych kwasów tłuszczowych i ich estrów metylowych czy polarnych lipidowych komponentów błony komórkowej. Chemiczna analiza metabolitów może służyć do klasyfikacji taksonomicznej, nie jest ona jednak jeszcze często stosowana w analizie mikrobiologicznej żywności. Skład jakościowy związków chemicznych wchodzących w skład organelli komórkowych, ich budowa oraz wzajemne stosunki ilościowe dają możliwość charakterystyki drobnoustrojów na zasadzie „odcisku palca”. W komórkach bakterii, drożdży i innych drobnoustrojów biomarkery komórkowe występują w niewielkich ilościach, stąd ich oznaczanie musi być dokonywane w bardzo dokładnych urządzeniach pomiarowych. Nowoczesna, instrumentalna analiza metabolitów jest bardzo czuła, szybka i ekonomiczna pod względem wykorzystywanych odczynników chemicznych. Możliwość stosowania takich rozwiązań w rutynowych badaniach spotyka się z coraz większym zainteresowaniem (7, 23). Najczęściej analiza instrumentalna komórkowych związków strukturalnych stosowana jest w mikrobiologii środowiskowej.

Na tym tle niezbędne jest opracowywanie baz danych (bibliotek) z charakterystyką taksonomiczną szczepów referencyjnych uwzględniającą wybrane komponenty komórkowe, np. profile kwasów tłuszczowych czy białek.

Poza bazą danych Sherlock Microbial Identification System (Newark, USA) z chemiczną specyfikacją ko-

mórek różnych gatunków i szczepów bakterii oraz drożdży w mikrobiologii brak jest podobnych źródeł informacji.

Zadaniem analityków jest rozwój systemów o wysokiej wydajności zbierania danych, ich przekazywania i automatycznego przetwarzania, które powinny być sprzężone z precyzyjnymi instrumentami analitycznymi. Jest to konieczne do szybkiego monitoringu żywności na zawartość drobnoustrojów. Komputerowa analiza danych w odniesieniu do metod „odcisku palca” opiera się na szczegółowej analizie statystycznej, tj. np. na szacowaniu indeksu podobieństwa, współczynnika korelacji, współczynnika odległości Euklidesa czy algorytmie grupowania mikroorganizmów na podstawie analizy najważniejszych (pod względem procentowej zawartości) komponentów spośród badanych związków chemicznych (7, 16), analizie składowych głównych (PCA – principal component analysis).

Analiza białek (proteomics). Analiza składu białek komórkowych okazała się bardzo wiarygodna w klasyfikacji mikroorganizmów, daje bowiem informacje odnośnie do gatunku i szczepu. Białka są bezpośrednim wynikiem ekspresji genomu komórkowego. Udowodniono wysokie podobieństwo między zawartością białek komórki a hybrydyzacją DNA-DNA (7). Klasyczne metody proteomics (analiza białek) służą precyzyjnej analizie białek, wykorzystują wysokorozdzielczą technikę dwuwymiarowej elektroforezy (2D-elektroforeza) połączoną, np. ze znakowaniem immunologicznym, sekwencjonowaniem białek czy analizą aminokwasów. Pozycja plam frakcji białkowych na żelu po 2D-elektroforezie może być przesunięta na skutek np. wymiany pojedynczego aminokwasu w strukturze pierwszorzędowej białka, dlatego sprzężenie 2D-elektroforezy ze spektrometrią mas umożliwi bardziej precyzyjną i pewną identyfikację. Ponadto spektrometria mas (MS) umożliwia oznaczanie femtomolowych (10⁻¹⁰) ilości białek (12). Jeszcze dokładniejszą identyfikację uzyskuje się po wstępnym, enzymatycznym strawieniu kompleksu mieszaniny białkowej, a następnie separacji peptydów za pomocą wysokosprawnej chromatografii jonowej i przeanalizowaniu końcowych wyników w zastosowaniu detektora mas.

Spektrometria mas jest wykorzystywana przede wszystkim do typowych analiz chemicznych. W wyniku rozwoju sposobów przygotowania prób (desorpcja plazmą, bombardowanie szybkimi atomami, elektro-sprej, desorpcja laserowa) możliwa stała się analiza cząsteczek o większych ciężarach, będących komponentami komórkowymi żywych organizmów (10). Istnieje opinia, że opracowanie desorpcji laserowej z zastosowaniem matrycy, na której istnieje możliwość wyznaczania mas cząsteczkowych białek, glikozydów, lipidów z próbek o femtomolowej zawartości analitu, jest jedną z najlepszych obecnie znanych metod analitycznych. Analizowaną próbkę nanosi się na matrycę i poddaje napromieniowaniu impulsami laserowymi. Molekuły próbki ulegają jonizacji i desorpcji, tworząc chmurę gazu jonowego. Jony poddawane są detekcji w analizatorze czasu przelotu, gdzie następuje ich separacja, a następnie analiza zgodnie z masą cząsteczkową i ładunkiem.

Wiele wyników analiz wskazuje na wyjątkową precyzję i skuteczność tej metody w szybkiej identyfikacji mikroorganizmów.

Efektywne stało się również połączenie spektrometrii masowej z pirolizą (degradacja masy komórkowej wysoką temperaturą), co pozwoliło wyeliminować wstępne przygotowanie próbek przed analizą (9).

Analiza lipidów (lipomics). Badania nad charakterystyką składników lipidowych komórek mikroorganizmów dowodzą, że kwasy tłuszczowe, ich estry metylowe czy fosfolipidy membran komórkowych mogą być istotnym źródłem informacji w klasyfikacji drobnoustrojów, zarówno bakterii, jak i drożdży czy pleśni i in. Analiza lipidów staje się przedmiotem zainteresowań i badań analitycznych, dając, zdaniem wielu autorów, odpowiedź porównywalną z metodami opierającymi się na genetycznych wynikach badań (17).

Tłuszcze obejmują grupę związków odgrywających główną rolę w wielu biochemicznych procesach komórkowych, stąd ważne jest poznanie wpływu zmienności składników tłuszczowych na funkcjonowanie mechanizmów metabolizmu komórkowego (10).

Kwasy tłuszczowe występują w komórkach przede wszystkim w postaci estrów, jako trójglicerydy, fosfolipidy, glikolipidy, sterole, będąc przede wszystkim składnikami budulcowymi błony i ściany komórkowej oraz błon cytoplazmatycznych organelli komórkowych, np. mitochondriów, retikulum endoplazmatycznego, spor, wolnych cząsteczek tłuszczów (17).

Fosfolipidy są obecne w membranach żywych komórek, nie występują natomiast jako tłuszcze zapasowe, ulegają szybkiemu rozkładowi w martwych komórkach, dlatego ich oznaczanie może służyć do określania żywotności biomasy komórkowej.

Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych czy fosfolipidów pozwala określić różnice międzygatunkowe z profilu tych związków. Możliwości te wynikają z dużej różnorodności strukturalnej lipidów, tzn. występowania kwasów tłuszczowych o różnej długości łańcucha węglowego (dla mikroorganizmów zazwyczaj od C9 do C22), pozycji wiązań podwójnych lub ich braku, występowania izomerów cis- i trans-, obecności pierścieni cyklicznych oraz rozgałęzień czy też podstawników w łańcuchu alifatycznym (7). Przykładowo, Gram-dodatnie oraz beztlenowe Gram-ujemne bakterie zawierają w przeważającej ilości rozgałęzione kwasy tłuszczowe, natomiast tlenowe Gram-ujemne szczepy charakteryzują się dużą zawartością mononienasyconych kwasów. W komórkach drożdży stwierdzono natomiast przewagę kwasów C16 i C18 (13, 17). Ponieważ nie wszystkie z analizowanych związków są charakterystyczne tylko dla jednej grupy mikroorganizmów, stąd, oprócz jakościowego składu lipidów, ważne są również różnice w częstości występowania poszczególnych związków, ich ilości oraz wzajemne stosunki ilościowe (17).

Skład ilościowy kwasów tłuszczowych, fosfolipidów może ulegać zmianom pod wpływem środowiska, aktywności metabolicznej czy wieku drobnoustrojów (10). Do zapewnienia powtarzalności profilu składników lipidowych danego gatunku, szczepu konieczna jest stan-

daryzacja warunków wzrostu (tj. składu podłoża hodowlanego, jego pH i temperatury wzrostu), w których oznaczane mikroorganizmy stymulowane są do syntezy kwasów tłuszczowych. Zależność między kompozycją lipidów w komórkach bakterii czy drożdży a ich przynależnością taksonomiczną została doświadczalnie potwierdzona (17, 23). Różnice w profilu estrów metylowych kwasów tłuszczowych rozdzielanych metodą chromatografii gazowej były wystarczające do odróżnienia blisko spokrewnionych bakterii z rodziny *Micrococccae* (18).

Najczęściej stosowanymi technikami identyfikacji i różnicowania mikroorganizmów na podstawie składników tłuszczowych w komórce są: chromatografia gazowa z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC/FID) lub detektorem mas (GC/MS). Zastosowanie tych technik wymaga przeprowadzenia estryfikacji lipidów do ich lotnych estrów metylowych. Procedura zaproponowana przez Sasserę (19) polega na zmydleniu tłuszczów, a następnie przeprowadzeniu kwasowej metylacji lipidów. Ekstrakt organiczny FAME (fatty acid methyl esters – estry metylowe kwasów tłuszczowych) poddawany jest analizie chromatograficznej. W powyższej metodzie wysoka temperatura stosowana podczas zmydlenia oraz metylacji może wpływać na występowanie strat bardziej lotnych estrów, tj. pochodnych kwasów krótkołańcuchowych. Również niektóre komponenty mogą ulegać modyfikacjom, np. utlenianiu. Stosowanie łagodniejszych metod estryfikacji, np. łagodnej metylacji w pH zasadowym, może ograniczyć zafałszowanie wyniku analizy wspomnianymi stratami komponentów czy ich destrukcją.

Do analizy polarnych lipidów stosowana jest także technika HPLC/MS (wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią masową), która nie wymaga przeprowadzania w lotne pochodne analizowanych związków – umożliwia ich identyfikację *in statu nascendi*.

Prowadzone są także badania nad zastosowaniem spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) do identyfikacji różnych mikroorganizmów z żywności na podstawie profilu estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Whittaker i wsp. (21) potwierdzili możliwość różnicowania gatunków spośród Gram-dodatnich i Gram-ujemnych bakterii.

Podsumowanie

Klasyczne techniki identyfikacji mikroorganizmów stosowane w przemyśle spożywczym nie są odpowiednie do prowadzenia szybkich, rutynowych analiz kontrolujących bezpieczeństwo i jakość żywności. Fakt ten coraz częściej wymusza zastępowanie tradycyjnej identyfikacji mikroorganizmów w żywności nowymi metodami, umożliwiającymi uzyskanie wiarygodnego wyniku w krótkim czasie. Dzieje się to dzięki automatyzacji i komputeryzacji metod, stosowaniu standardów wewnętrznych i zewnętrznych oraz zestawianiu odmiennych technik analitycznych ze sobą. Dalszy rozwój diagnostyki mikrobiologicznej powinien dążyć do opracowywania metod szybkiego monitoringu w produkcji żywności (on-line) i w czasie rzeczywistym (real time).

Instrumentalne techniki analizy chemicznej składników komórkowych są jedną z najbardziej obiecujących alternatyw spełniających wymagania wysokiej czułości i dokładności z jednoczesnym szybkim wykonaniem analizy.

Piśmiennictwo

1. Anon.: ISIAM 2000, A perspective on the fourth International Symposium on the Interface between Analytical Chemistry and Microbiology, ISIAM 2000. J. Microb. Methods 2002, 48, 95-1000.
2. Boer E. de, Beumer R. R.: Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. Int. J. Food Microbiol. 1999, 50, 119-130.
3. Boulou L., Prévost M., Barbeau B., Coallier J., Desjardins R.: LIVE/DEAD BacLight application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. J. Microbiol. Methods 1999, 37, 77-86.
4. Breeuwer P., Abee T.: Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. Int. J. Food Microbiol. 2000, 55, 193-200.
5. Brondz I., Høiland K., Ekeberg D.: Multivariate analysis of fatty acids in spores of higher basidiomycetes: a new method for chemotaxonomical classification of fungi. J. Chromatogr. B 2004, 8000, 303-307.
6. Busse H.-J., Denner E. B. M., Lubitz W.: Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. J. Biotechnol. 1996 47, 3-38.
7. Giacomini M., Ruggiero C., Calegari L., Bertone S.: Artificial neural network based identification of environmental bacteria by gas-chromatographic and electrophoretic data. J. Microb. Methods 2000, 43, 45-54.
8. Gunasekera T. S., Sørensen A., Attfield P. V., Sørensen S. J., Veal D. A.: Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. Appl. Environ. Microbiol. 2002, 68, 1988-1993.
9. Hendrickson A. D., Abbas-Hawks C., Basile F., Voorhees K. J., Hadfield T. L.: Rapid chemotaxonomy of pathogenic bacteria using in situ thermal hydrolysis and methylation as a sample preparation step coupled with a field-portable membrane inlet quadrupole ion trap mass spectrometer. Int. J. Mass Spectr. 1999, 190/191, 331-342.
10. Jones J. J., Stump M. J., Fleming R. C., Lay J. O., Wilkins C. L.: Strategies and data analysis techniques for lipid and phospholipid chemistry elucidation by intact cell MALDI-FTMS. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2004, 15, 1665-1674.
11. Joux F., Lebaron P.: Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. Microbes Infection 2000, 2, 1523-1535.
12. Jungblut P. R.: Proteome analysis of bacterial pathogens. Microbes Infections 2001, 3, 831-840.
13. Moss C. W., Shinoda T., Samuels J. W.: Determination of cellular fatty acid composition of various yeast by gas chromatography. Jour. Clin. Microb. 1982, 1073-1079.
14. Osek J., Kowalczyk A., Wieczorek K.: Molekularne metody wykrywania i identyfikacji chorobotwórczych bakterii w żywności. Medycyna Wet. 2005, 61, 5-9.
15. Otero A., Garcia-Lopez M.-L., Moreno B.: Rapid microbiological methods in meat and meat products. Meat Science 1998, 49, 179-189.
16. Parente E., Ricciardi A.: A statistical procedure for the analysis of microbial communities based on phenotypic properties of isolates. J. Microb. Methods 2002, 49, 121-134.
17. Peltroche-Llacsahuanga H., Schidt S., Lütticken R., Haase G.: Discriminative power of fatty acid methyl ester (FAME) analysis using the Microbial Identification System (MIS) for *Candida* (Torulopsis) *glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2000, 38, 213-221.
18. Pendergrass S. M., Jensen P. A.: Application of the gas chromatography-fatty acid methyl ester system for the identification of environmental and clinical isolates of the family Micrococccae. Appl. Occup. Environ. Hyg. 1997, 12(8), 543-546.
19. Sasser M.: Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids. MIDI Technical Note 1990.
20. Tothill E. I.: Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector. Computers Electronics Agric. 2001, 30, 205-218.
21. Whitaker P., Mossoba M. M., Al-Khalidi S., Fry F. S., Dunkel V. C., Tall B. D., Yurawecz M. P.: Identification of foodborne bacteria by infrared spectroscopy using cellular fatty acid methyl esters. J. Microb. Method 2003, 55, 709-716.
22. Xu M., Basile F., Voorhees K. J.: Differentiation and classification of user-specified bacterial groups by in situ thermal hydrolysis and methylation of whole bacterial cells with tert-butyl bromide chemical ionization ion trap mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 2000, 418, 119-128.
23. Xu M., Voorhees K. J., Hadfield T. L.: Repeatability and pattern recognition of bacterial fatty acid profiles generated by direct mass spectrometric analysis of in situ thermal hydrolysis/methylation of whole cells. Talanta 2003, 59, 577-589.

Adres autora: mgr inż. Anna Bzducha, ul. Nowoursynowska 159c, 02-782 Warszawa; e-mail: abzducha@interia.pl