



**Universitatea "Babeș Bolyai"
Cluj-Napoca**

**Facultatea de Știința și Ingineria
Mediului**

Detectia unor markeri bacterieni prin spectrometrie de mobilitate ionică

Ileana-Andreea Rațiu

Rezumatul tezei de doctorat

Coordonator științific:

Prof. Univ. Dr. COSMA Constantin

Îndrumători:

Prof. Univ. Dr. C.L. Paul THOMAS

Lect. Dr. Victor BOCOȘ-BINȚINȚAN

CLUJ-NAPOCA

- 2012 -

Rezultatele experimentale care au stat la baza realizării acestei teze de doctorat au fost obținute în totalitate la Universitatea din Loughborough, Marea Britanie.

Cercetările s-au extins pe durata a 11 luni, timp în care doctoranda Ileana-Andreea Rațiu și-a desfășurat activitatea în cadrul Centrului de Științe Analitice al Departamentului de Chimie de la Loughborough University, sub îndrumarea directă a domnilor Prof. Dr. C.L. Paul Thomas și Lect. Dr. Victor Bocoș-Bințișan, cărora le adresez alege mulțumiri.

De asemenea, adresez mulțumiri conducătorului științific, d-lui Prof. Univ. Dr. Cosma Constantin.

Suportul financiar a fost oferit de către PROGRAMUL OPERAȚIONAL SECTORIAL PENTRU DEZVOLTAREA RESURSELOR UMANE 2007-2013, Contract POSDRU 6/1.5/S/3 – "Studii doctorale: prin știință spre societate".

Cuprins

Abstract	3
Introducere	4
Capitolul 1.	
Metode de detectare a microorganismelor. Aplicațiile bio-medicale și farmaceutice ale spectrometriei de mobilitate ionică	7
Capitolul 2.	
Detecția markerilor biologici prin tehnicile spectrometriei de mobilitate ionică	11
Detecția microorganismelor cu ajutorul markerilor produși prin procese enzimatică	11
Detecția microorganismelor cu ajutorul markerilor produși prin piroliză	13
Capitolul 3.	
Prelevarea și analiza probelor, procesarea datelor și interpretarea rezultatelor	15
Descrierea aparaturii, a sistemului experimental și analiza probelor	15
Rezultate și discuții	26
Diferențiere între probele care au avut inoculate bacterii și probele blank	27
Diferențiere între probele care au avut incubate cele trei specii de bacterii monitorizate (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> și <i>Escherichia coli</i>).	30
Diferențierea bacteriilor analizate în funcție de timpul de incubare	33
Evaluarea comparativă a compușilor chimici <i>specifici</i> și a compușilor chimici <i>comuni</i> celor trei specii de bacterii monitorizate	36
Capitolul 4.	
Concluzii	43
Bibliografie	46

Abstract

Scopul prezentului proiect de cercetare a fost acela de a investiga fezabilitatea detectării rapide a unor markeri bacterieni prin tehnici spectrometrice ce utilizează mobilitatea ionică.

Motivația alegerii temei „*Detecția unor markeri bacterieni prin Spectrometrie de Mobilitate Ionică*” a fost aceea de a încerca să explorăm un concept relativ nou, în cadrul căruia potențialul IMS (spectrometriei de mobilitate ionică) este utilizat pentru detecția microorganismelor.

Astfel, **în primul capitol** al tezei, "Metode de detectare a microorganismelor. Aplicațiile bio-medicale și farmaceutice ale spectrometriei de mobilitate ionică" este prezentată succint partea de introducere, precum și tehnicile de detectare a microorganismelor disponibile cu performanțele lor, abordate în mod comparativ. De asemenea, se face o "ancorare" cu IMS - prin aplicațiile sale, în special cele legate de microorganisme și compuși biogeni; tot aici se discută principiul de operare al IMS, precum și modul de funcționare a instrumentației.

În cel de-al **doilea capitol**, "Detecția markerilor biologici prin tehnicile spectrometriei de mobilitate ionică", sunt prezentate îndeosebi aspecte legate de cele două tipuri principale de markeri bacterieni – cei enzimatici, respectiv cei rezultați prin piroliză. În **capitolul al treilea**, intitulat „Prelevarea și analiza probelor, procesarea datelor și interpretarea rezultatelor”, este prezentată partea experimentală, originală, concentrată pe o serie de măsurători și analize pentru detectarea markerilor bacterieni din atmosfera headspace, la nivel de urme. Vor fi prezentate aici rezultatele obținute, sunt descrise succint condițiile experimentale și instrumentația utilizată. Deci, cel de-al treilea capitol va include rezultatele experimentale obținute, împreună cu discuțiile aferente.

La finalul fiecărui capitol sunt schițate o serie de concluzii preliminare, iar **capitolul al patrulea** reunește concluziile care se desprind din investigațiile efectuate și rezultatele obținute și indică o serie de posibile direcții viitoare de cercetare.

Teza de doctorat se încheie cu referințele bibliografice, care țintesc foarte precis această temă a detecției microorganismelor prin tehnicile spectrometriei de mobilitate ionică.

Cuvinte cheie:

Markeri bacterieni
Spectrometrie de mobilitate ionică
Gaz cromatografie
Spectrometrie de masă
Detecția microorganismelor
Probe de aer headspace
„Principal Components Analysis”

Introducere

Deteția și identificarea rapidă a bacteriilor, îndeosebi a celor patogene, rămâne o sarcină importantă și provocatoare atunci când este vorba de asigurarea siguranței alimentare, controlul calității apei potabile, combaterea bolilor infecțioase sau prevenirea bio-terrorismului. Este demn de menționat că, în fiecare an, circa 1,5 miliarde de persoane se confruntă cu o infecție bacteriană. De aceea, agenții bacterieni trebuie tratați cu maximă atenție.

Discutând despre testarea eficientă a bacteriilor, aceasta necesită metode de analiză care trebuie să îndeplinească o serie de criterii restrictive. Astfel, timpul necesar pentru analiză și sensibilitatea sunt cele mai importante limitări. De asemenea, este de dorit să avem la dispoziție metode analitice cât mai selective, deoarece un număr redus de specii patogene sunt adeseori prezente în medii (matrici) biologice și ambientale complexe, împreună cu microorganisme nepatogene.

Spectrometria de mobilitate ionică (Ion Mobility Spectrometry, acronim IMS) este o tehnică analitică modernă care, datorită sensibilității ei remarcabile, se potrivește perfect detecției de urme a chimicalelor prezente în aer, dar și a celor din probele lichide sau solide. Această tehnică implică două etape: (a) ionizarea speciilor chimice la presiune atmosferică, urmată de (b) separarea ionilor generați, care se bazează pe diferențele de mobilitate într-un gaz de drift neutru și sub influența unui câmp electric de intensitate relativ scăzută.

Domeniile în care spectrometria de mobilitate ionică (IMS – Ion Mobility Spectrometry) se poate aplica sunt numeroase, și anume: aplicații militare (deteția agenților chimici de luptă), aplicații de securitate (deteția drogurilor și a explozibililor), aplicații industriale și ambientale (procesul de control și monitorizare a unor poluanți diverși), precum și aplicații medicale și farmaceutice (diagnosticarea unor maladii, controlul & asigurarea calității și autenticității produselor farmaceutice). Teoretic, orice substanță chimică ce poate fi ionizată este detectabilă cu ajutorul spectrometriei de mobilitate ionică.

În ultimii ani, spectrometria de mobilitate ionică s-a dezvoltat continuu, iar noile aplicații au cunoscut de asemenea o extindere, în special cele legate de microorganisme (celule, bacterii, fungi), medicină (diagnosticări, spre exemplu analizele respiratorii, terapia și controlul medicației), controlul calității alimentelor, monitorizarea siguranței și caracterizarea proceselor de control în industria chimică și farmaceutică. Colectivul de la ISAS – Institute for Analytical Sciences din Dortmund a efectuat studii de fezabilitate în scopuri biologice și medicale, incluzând detecția bacteriilor, fungilor și a metaboliților din respirația umană. Pentru toate aceste probe caracteristice s-a demonstrat că modelul analizat poate fi utilizat pentru identificarea speciilor celulare, fungilor și

bacteriilor, precum și a numeroase boli. De asemenea, cuantificarea acestor date a putut fi utilizată pentru a obține informații legate de starea procesului (spre exemplu creșterea culturilor, dezvoltarea bolilor, nivelul de medicație, stadiul atins de cancer).

În literatura de specialitate internațională au apărut în ultimii ani din ce în ce mai multe studii referitoare la instrumentația, principiile de operare și aplicațiile spectrometriei de mobilitate ionică. Astfel, se poate spune că aplicațiile acestei tehnici analitice sunt dintre cele mai complexe, fiind extrem de utile și necesare, în special datorită concentrațiilor unor extrem de variate chimicale de natură organică, dar și anorganică, care pot fi detectate la limite extrem de scăzute (ultraurme), practic din orice tip de probe (lichide, solide sau gazoase).

La noi în țară, Dr. Bocoș-Bințișan Victor este autorul primei cărți cu caracter monografic despre spectrometria de mobilitate ionică publicată în România în anul 1998, după ce doar două alte asemenea monografii pe această tematică mai fuseseră publicate în Statele Unite, în 1984 și 1994 (ultima reeditată în 2005).

Obiectivul principal

Scopul acestui proiect de cercetare a fost de a investiga fezabilitatea detectării unor markeri bacterieni prin tehnici spectrometrice ce utilizează mobilitatea ionică.

Motivația alegerii temei „*Deteția unor markeri bacterieni prin Spectrometrie de Mobilitate Ionică*” a fost aceea de a încerca să explorăm un concept relativ nou, în cadrul căruia potențialul IMS (Spectrometriei de Mobilitate Ionică) este utilizat pentru dețecția microorganismelor.

Sumarul tezei

Teza de doctorat cuprinde trei capitole, astfel: primul capitol, se intitulează "Metode de detectare a microorganismelor. Aplicațiile bio-medicale și farmaceutice ale spectrometriei de mobilitate ionică", în al doilea capitol se dezbate problematica "Detectării markerilor biologici prin spectrometrie de mobilitate ionică", iar ultimul capitol va cuprinde "Metodologiile utilizate la detecția markerilor biologici prin spectrometrie de mobilitate ionică" și tot aici vor fi expuse și „Rezultate experimentale”.

Primul capitol al tezei, "Metode de detectare a microorganismelor. Aplicațiile bio-medicale și farmaceutice ale spectrometriei de mobilitate ionică" va cuprinde partea de introducere, tehnicile disponibile, cu performanțele lor abordate în mod comparativ; de asemenea se va face, o "ancorare" cu IMS, prin aplicațiile sale, în special cele legate de microorganisme și compuși biogeni; tot aici se va dezbate principiul de operare al IMS, precum și modul de funcționare a instrumentației.

În cel de-**al doilea capitol**, "Detecția markerilor biologici prin tehnicile spectrometriei de mobilitate ionică", se vor prezenta îndeosebi aspecte legate de cele două tipuri de markeri bacterieni – cei enzimatici, respectiv cei rezultați prin piroliză.

În **capitolul al treilea**, intitulat „Partea experimentală – prelevarea și analiza probelor, procesarea datelor și interpretarea rezultatelor”, se va prezenta partea experimentală, originală, concentrată pe o serie de măsurători și analize pentru detectarea markerilor biogeni, la nivel de urme din atmosfera headspace. Vor fi prezentate aici rezultatele obținute, vor fi descrise succint condițiile experimentale și va fi făcută o scurtă prezentare a instrumentației folosite. Deci, cel de-al treilea capitol va include rezultatele experimentale obținute, împreună cu discuțiile aferente.

La finalul fiecărui capitol sunt schițate o serie de concluzii preliminare, iar **capitolul al patrulea** reunește concluziile ce se desprind din investigațiile efectuate și rezultatele obținute și indică o serie de posibile direcții viitoare de cercetare.

Teza de doctorat se va încheia cu referințele bibliografice, care ținesc foarte precis această temă a detecției microorganismelor prin tehnicile spectrometriei de mobilitate ionică.

1 . Metode de detectare a microorganismelor.

Aplicațiile bio-medicale și farmaceutice ale Spectrometriei de Mobilitate Ionică

Tehnicile analitice utilizează diferite principii prin intermediul cărora compuși la nivel de urme - având concentrații de ordinul a părți pe milion (p.p.m.) sau chiar mai mici, părți pe bilion (p.p.b.), părți pe trilion (p.p.t.) - aflați în diferite medii/probe pot fi detectați utilizând o proprietate bine stabilită a analitului.

Unealta fundamentală în analizele de microorganisme este, din perspectivă microbiologică, testarea enzimelor proprii intracelulare și extracelulare. Testările de enzime au ajutat microbiologii timp de mai multe decenii la efectuarea taxonomiei, la detecția și identificarea microorganismelor. În prezent, se poate utiliza aparatură analitică performantă pentru analiza enzimelor, putându-se obține informații complexe despre microorganismele de la care acestea provin.

Spectrometria de mobilitate ionică – descriere succintă

În spectrometria de mobilitate ionică, separarea chimică și detecția sunt realizate prin:

1. ionizarea unui gaz sau a unor vapori;
2. separarea speciilor ionice într-un tub de drift, sub influența unui câmp electric cu intensitate relativ mică, la presiune atmosferică sau apropiată de presiunea atmosferică;
3. convertirea norilor ionici în curenți ionici, la capătul tubului de drift (unde se află detectorul);
4. procesarea semnalului (curentului ionic), în scopul furnizării de informație utilă referitoare la identificarea chimică și la cuantificare [Bocoș-Bințișan, 2004].

În instrumentul IMS procedura experimentală este următoarea: ionii primari sunt produși într-un gaz purtător de către o sursă de ionizare (uzual o sursă de radiație beta cu ^{63}Ni); acești ioni primari încep o secvență de reacții ion-moleculă care generează în final ionii-produs (Figura 1). Ionii formați în regiunea de reacție sunt apoi introduși în regiunea de drift, unde sunt deplasați de un câmp electric printr-un gaz neutru de drift (cel mai uzual azot sau aer la presiune atmosferică), ajungând în final la detector. Pot fi studiați atât ionii pozitivi, cât și ionii negativi. Timpii de tranzit prin regiunea de drift sunt înregistrați, fiind de ordinul milisecundelor sau zecilor de milisecunde. Timpul de sosire al unui pic de curent măsoară evident viteza de drift (zbor) sau mobilitatea ionilor din acest pic [Eiceman, 2002; Bocoș-Bințișan, 2004].

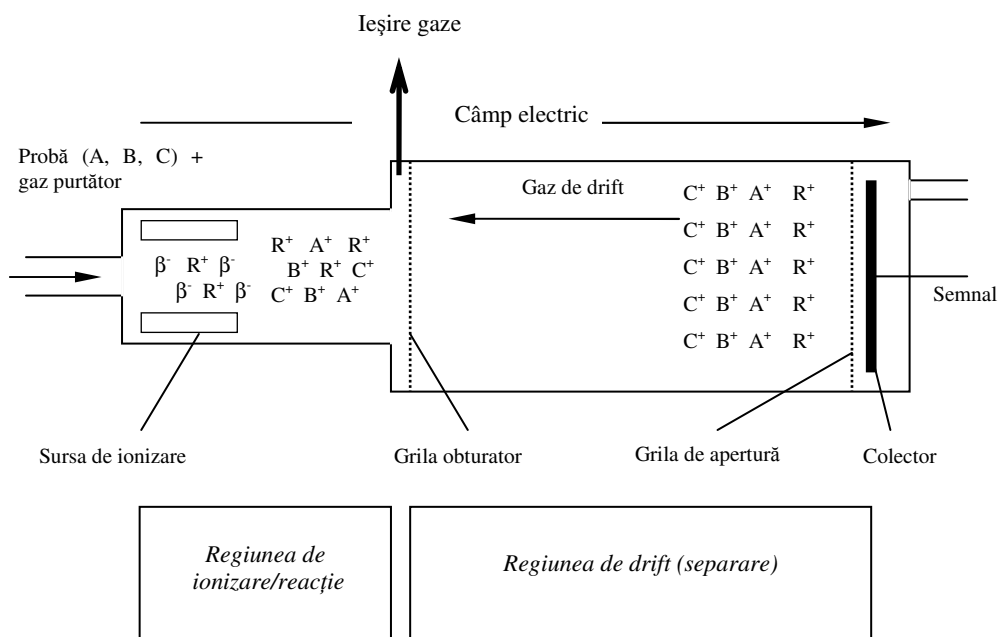


Figura 1. Schema celulei unui spectrometru de mobilitate ionică [Bocoș-Bințișan, 2004]

După separarea în tubul de drift, ionii ciocnesc detectorul și rezultă astfel așa-numitul “spectru de mobilitate ionică”, unde R^+ reprezintă picul ionilor reactanți, iar A^+ , B^+ și C^+ reprezintă picuri ale ionilor-produs (Figura 2).

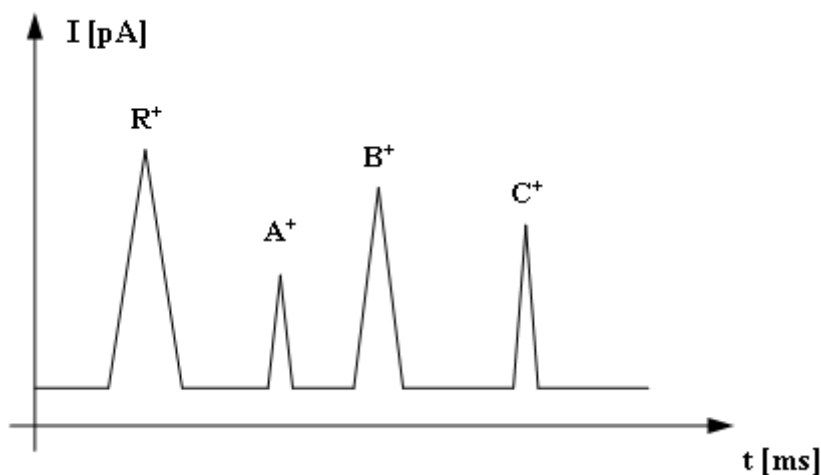


Figura 2. Spectru de mobilitate ionică (plasmagramă; semnătură) [Bocoș-Bințișan, 2004]

Aplicațiile bio-medicale și farmaceutice ale spectrometriei de mobilitate ionică

Identificarea rapidă a bacteriilor este esențială în tot mai multe domenii. Spre exemplu, având capacitatea de a identifica o bacterie patogenă, se poate aplica o terapie antimicrobiană adecvată, precum și derula studiile epidemiologice necesare.

Spectrometria de mobilitate ionică (IMS – Ion Mobility Spectrometry) a fost într-o continuă dezvoltare în ultimele decenii, la fel ca și noile sale aplicații legate de microorganisme, medicină, controlul calității alimentelor, monitorizarea siguranței și caracterizarea proceselor de control în industria chimică și farmaceutică.

În acest sens, s-au efectuat multiple studii de fezabilitate în scopuri biologice și medicale, incluzând detecția bacteriilor, fungilor și a moleculelor de metaboliți din respirația umană. Toate acestea au demonstrat că această tehnică analitică poate fi utilizată la identificarea speciilor celulare, precum și a numeroaselor boli. De asemenea, cuantificarea acestor informații a putut fi utilizată pentru a obține informații legate de starea procesului (evoluția bolilor, nivelul de medicație necesar, asigurarea controlului calității în industria farmaceutică).

Se știe de multă vreme că vaporii odorizanți proveniți din urină sau din procesul de respirație reflectă bolile persoanei de la care provin. Utilizarea tehnicilor analitice adecvate au înlocuit examinarea clasică a pacienților cu simple măsurători ale chimicalelor-țintă [Vautz et al, 2008; Prabha et al, 2008].

Mai concret, Karpas a propus noi metode de diagnosticare a infecțiilor vaginale rapide, a căror precizie este mult mai bună comparativ cu cele clasice. [Karpas, 2002].

Utilizarea IMS pentru detecția, identificarea și monitorizarea compușilor volatili, cum ar fi halothan, enfluran, izofluran, utilizați ca anestezici și exhalati în timpul operațiilor, a fost studiată de către Eiceman et al. În același timp, studii preliminare au demonstrat că există diferențe între compoziția chimică a aerului expirat de persoane cu probleme pulmonare comparativ cu aerul expirat de persoane sănătoase. Aceste prezumții se bazează pe faptul că, în sânge, este reflectată cu fidelitate concentrația de compuși organici volatili respirați, datorită schimbului de gaze care are loc la nivel pulmonar [Karpas et al, 2002; Eiceman, 2005].

În procesul de fabricație a produselor farmaceutice, monitorizarea substanțelor chimice este decisivă pentru a asigura controlul calității. Companiile farmaceutice au resimțit de multă vreme nevoie de a avea o instrumentație rapidă, eficientă și ieftină pentru a putea garanta controlul calității și asigurarea calității produselor lor. Tehnicile clasice, utilizate pentru asigurarea controlului calității în industria farmaceutică, prezintă unele deficiențe legate de productivitatea scăzută și de precizia limitată pe care o pot oferi. Tehnicile bazate pe mobilitate ionică au fost testate ca alternative pentru controlul calității în industria farmaceutică, dovedindu-se a fi avantajoase, datorită instrumentației ieftine care s-a pretat extrem de bine la miniaturizare, oferind sensibilitate excelentă și răspuns în timp real [Ryan et al, 2008].

Sumar

Metodele analitice instrumentale sau microbiologice sunt folosite pentru a exploata o proprietate bine stabilită a analitului. Astfel, s-a utilizat proprietatea o-nitrofenolului de a avea o presiune de vapori relativ mare, ceea ce permite analiza directă a acestor vapori folosind spectrometria de mobilitate ionică. În acest mod, prin detectarea o-NP dispunem de un algoritm sensibil, relativ compact și simplu de detecție a bacteriilor; acest algoritm se poate aplica cu succes atât la monitorizarea surselor de apă potabilă, respectiv a apelor reziduale, cât și la detectarea rapidă a microorganismelor în spațiile medicale.

Ca la orice tehnică analitică, utilitatea spectrometriei de mobilitate ionică pentru o aplicație particulară trebuie să fie abordată strict pe o bază individuală. Factorii ce trebuie luați în considerare includ limitele de detecție, timpul de răspuns, interferențele matricii, costul, timpul de calibrare, portabilitatea, etc.

Sistemele de introducere a probelor sunt esențiale pentru IMS, în special dacă analiții nu sunt în întregime extrași din probă, sau dacă sunt transferați mai multor aparate cuplate între ele. Sistemele de introducere a probelor se utilizează, astfel, în funcție de diferite caracteristici ale aparaturii, dar mai ales, de starea de agregare a probei utilizate.

Aplicațiile bio-medicale și farmaceutice se bazează pe proprietatea vaporilor odorizanți proveniți din procese metabolice de a reflecta bolile persoanei de la care provin. Astfel, metaboliții întâlniți în aerul expirat pot fi direct corelați cu existența diferitelor boli. Unii metaboliți sunt biomarkeri, spre exemplu acetona apare în cazul diabeticilor, acidul azotic este corelat cu afecțiuni astmatice, amoniacul denotă existența unor probleme hepatice, în timp ce alții indică prezența unor bacterii.

Utilizând spectrometria de mobilitate ionică au putut fi detectate eficient și rapid diverse tipuri de infecții vaginale, s-a realizat cu succes detecția, identificarea și monitorizarea compușilor volatili cum ar fi halothan, enfluran, izofluran, utilizați ca și anestezici inhalanți în timpul operațiilor și s-au diagnosticat direct printr-o, simplă probă de respirație umană preluată, afecțiuni pulmonare.

Aparatura portabilă, limitele joase de detecție, răspunsul în timp real și ușurința cu care se poate folosi instrumentația IMS permit monitorizarea, asigurarea calității & controlul calității produselor farmaceutice, dar și asigurarea sănătății și siguranței angajaților companiilor farmaceutice.

2. Detectia markerilor biologici prin tehnicile spectrometriei de mobilitate ionică

Există două metode principale de detectare a markerilor biologici prin tehnicile spectrometriei de mobilitate ionică, respectiv: detectia microorganismelor cu ajutorul markerilor produși prin procese enzimaticе și detectia microorganismelor cu ajutorul markerilor produși prin piroliză [Snyder et al, 2001; Snyder et al, 2004].

Detectia microorganismelor cu ajutorul markerilor produși prin procese enzimaticе

În multe domenii, identificarea rapidă a microorganismelor este esențială. Spre exemplu, posibilitatea de a identifica o bacterie patogenă va permite aplicarea unei terapii antimicrobiene potrivite, precum și derularea studiilor epidemiologice adecvate [Snyder et al, 1991; Strachan et al, 1995; Creaser et al, 2004].

Detectarea vaporilor de ortonitrofenol ONP din aerul ambiant (un marker bacterian comun majorității bacteriilor, generat prin reacții biochimice enzimaticе) a fost descrisă de către Bocoș & Rațiu (2009). Prin detectarea vaporilor headspace de ONP în aerul ambiant au fost obținute limite de detecție de ordinul sub-p.p.m. în câteva secunde (Figura 3), deci un răspuns rapid („în timp real”). Ei au utilizat un spectrometru de mobilitate ionică produs de firma germană *I.U.T. (Institut für Umwelt Technologien) GmbH Berlin*, modelul *IMS-Mini* (Figura 4), un instrument portabil și care poate fi operat autonom, nefiind necesare nici un fel de utilități sau reactivi chimici.

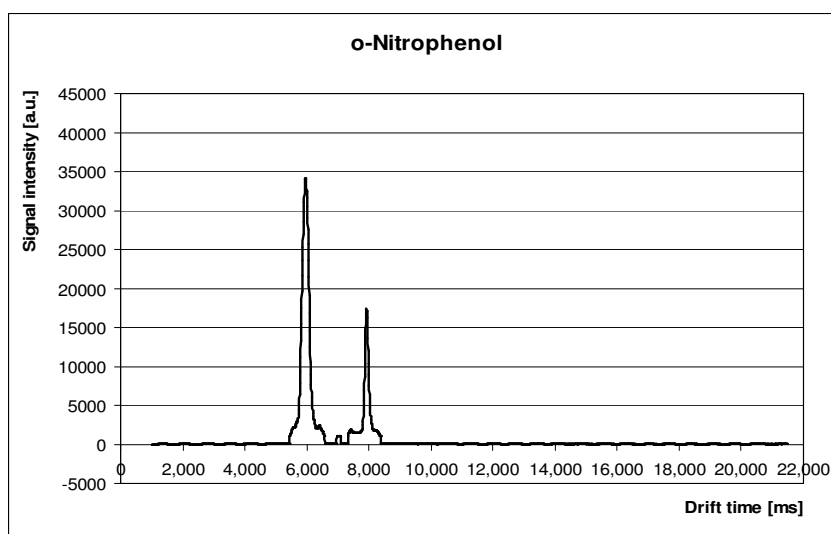


Figura 3. Spectrul de mobilitate ionică al o-nitrofenolului [Bocoș-Bințișan & Rațiu 2009]



Figura 4. Spectrometrul de mobilitate ionică IMS-MINI (I.U.T. GmbH Berlin)

Bacteriile din specia *Salmonella typhimurium* au fost determinate prin metoda combinată a ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), apoi cu o etapă finală mediată cu enzima fosfatază, și prin detectarea fenolului astfel rezultat (ca produs al reacției ELISA) prin spectrometrie de mobilitate ionică. Limitele de detecție au fost, de exemplu, de circa 10.000 bacterii într-o alicotă de 10 mL de probă. [Smith, et al, 1997]

Räsänen și colaboratorii [2010] au utilizat un detector IMS de tip ChemPro-100i, prevăzut cu 16 detectori (canale IMS), 5 senzori semiconductori (MOS) și 1 senzor FET (tranzistor cu efect de câmp) pentru monitorizarea și detectarea compușilor organici volatili proveniți de la coloniile de mucegaiuri. Astfel, au fost monitorizate diferențele dintre probele headspace care conțineau mucegaiuri și probele blank. Rezultatele statistice au demonstrat separare / diferențiere între probele care conțineau mucegaiuri și probele blank, la fel cum metoda de confirmare (GC-MS) a demonstrat existența diferiților compuși în probele cu mucegaiuri, față de probele blank. [Räsänen et al, 2010]

Vinopal și colaboratorii au utilizat două aparate produse de compania Barringer (IONSCAN® model 350A, respectiv 400A) Obiectivul studiului a fost de a investiga utilitatea tehnicilor IMS în diferențierea tulpinilor bacteriene prin analiza directă a celulelor bacteriene întregi, dar și diferențierea tulpinilor și speciilor bacteriene în timp real, fără programe speciale de testare și fără a utiliza reactivi. Reproducibilitatea distinctă a răspunsurilor pentru diferite condiții de creștere a demonstrat fezabilitatea utilizării răspunsului IMS ca o "amprentă" (*fingerprint*) caracteristică bacteriilor, pentru identificarea diferențelor dintre speciile de bacterii [R.T. Vinopal et al, 2002].

Detecția microorganismelor cu ajutorul markerilor produși prin piroliză

Spectrometria de Masă prin Piroliză, (Py-MS) este o tehnică analitică sensibilă care funcționează pe principiul degradării termice rapide (*piroliză*). Piroliza are loc înainte ca ionii să fie separați în spectrometrul de masă. Tehnica este destinată analizei compușilor nevolatili din matrici complexe. Piroliza este responsabilă de formarea fragmentelor volatile din molecule complexe, a căror mase vor fi apoi revelate sub forma unui spectru de masă. [“Encyclopedia of Analytical Science”, Elsevier Ltd., ISBN: 978-0-12-369397-6; Snyder et al, 2004].

Posibilitatea detectării cantităților de câteva sute de nanograme ale endosporilor de *Bacillus* utilizând *acidul picolinic* și *piridina* ca markeri biochimici (compuși caracteristici ai acidului dipicolinic, prezent în pereții celulari ai sporilor) folosind spectrometria de mobilitate ionică a fost demonstrată prin experimente de laborator de către Jacek și colaboratorii. Instrumentația utilizată a constat într-un pirolizator cuplat cu un spectrometru de mobilitate ionică model EVM (Environmental Vapour Monitor – fabricat de companiile Graseby Ltd. & FemtoScan Inc.), care este de fapt un sistem tandem GC/IMS [Jacek Et al, 1997].

Produșii derivați din endosporii bacterieni au fost în principiu piridina și acidul dipicolinic (acidul 2,6-piridin-dicarboxilic) rezultați din termoliza pereților celulari ai sporilor. De asemenea, acidul picolinic a putut fi detectat prin piroliza a mai puțin de o sută de nanograme de *Bacillus subtilis*. [Dworzanski et al, 1997].

Grupul de cercetători format din Cheung, Xu, Thomas și Goodacre au investigat în anul 2008 trei tipuri de bacterii – două aparținând speciei *Bacillus subtilis* și una speciei *Bacillus megaterium* – cu scopul de a evalua posibilitatea diferențierii lor, utilizând lanțul instrumental Py-GC-DMS (Pirolizator – Gaz-Cromatograf – Spectrometru de Mobilitate Diferențială). În urma procesării datelor cu ajutorul multiplelor abordări statistice, autorii au reușit să demonstreze cu succes diferențierea speciilor de bacterii aparținând aceluiași gen [Cheung et al, 2009].

Prasad și colaboratorii au publicat o serie de articole legate de analiza diferitelor specii de bacterii și influența temperaturii de creștere asupra componentelor chimici generați de aceste bacterii, prin piroliză urmată de gaz-cromatografie și Spectrometrie de Mobilitate Diferențială (Py-GC/DMS). Astfel, acești autori au utilizat un sistem complex Py-GC/DMS și au investigat posibilitatea analizei speciilor de bacterii utilizând opt tipuri de bacterii. Ei au obținut informații biochimice detaliate, cum sunt reprezentările topografice (în 3D) ale intensității curentului ionic, timp de retenție și voltaj de compensare - prin detecția simultană, în ambele moduri de operare (pozitiv, respectiv negativ). În urma pirolizei, biomarkerii specifici fiecărei bacterii au fost întâlniți la timpuri de retenție și voltaaje de compensare caracteristice și au fost confirmați cu ajutorul metodei

adiției de standardelor prin tehnici GC-MS, obținându-se astfel discriminarea între tipurile Gram negative și Gram Pozitive [Prasad et al, 2006; Prasad et al, 2007, Prasad et al, 2008].

În fine, s-au efectuat și tentative de detectare a **microorganismelor întregi** prin Spectrometrie de Mobilitate Ionică. Astfel, Rodacy, Sterling și Butler (1999) au încercat să investigheze prin IMS microorganismele întregi. Rezultatele experimentale au demonstrat că este posibil să se introducă virusuri întregi într-un Spectrometru de Mobilitate Ionică (folosind metoda electrospray) și că se observă o descreștere a peak-ului ionilor reactanți. Lipsa unor peak-uri ale virusurilor se poate datora unei diversități de efecte – de la procesele care conduc la clusterarea virusurilor sau la încărcarea lor multiplă, până la limitări datorate însuși procesului de injectare a probei (din cauza mobilității foarte reduse a virusurilor). Cu toate acestea, experimentele efectuate de Rodacy și colaboratorii (1999) au demonstrat că prin electrospray se pot injecta cu succes într-un spectrometru IMS ionii biologici foarte mari (de exemplu virusurile). Problema este aceea că acest design nu este unul ideal pentru a detecta particulele virale, întrucât tensiunile înalte aferente descărcării electrospray, precum și procesul de electrospray însuși provoacă creșterea foarte mare a nivelului de zgomot. Prin urmare, autorii susțin necesitatea adoptării unei metode de introducere a probei în stare de vapori [Rodacy et al, 1999].

Sumar

Avem două posibilități de detectare a microorganismelor prin tehnicile Spectrometriei de Mobilitate Ionică, respectiv: (1) detecția microorganismelor cu ajutorul markerilor produși prin procese enzimaticе și (2) detecția microorganismelor cu ajutorul markerilor produși prin piroliză.

Pentru detecția microorganismelor cu ajutorul markerilor produși prin procese enzimaticе, există, de asemenea, două alternative: (1) se poate utiliza un substrat de creștere căruia i se adaugă în mod intenționat un anumе nutrient ce va fi metabolizat și va produce o substanță chimică cunoscută și detectabilă cu ajutorul aparatului utilizat (spre exemplu, orto-nitrofenil- β -D-gluco-piranozida va genera orto-nitrofenolul, în timp ce ureea va genera amoniacul), sau (2) pot fi monitorizați în mod direct compuși organici volatili generați în atmosfere headspace.

Detecția microorganismelor cu ajutorul markerilor produși prin piroliză funcționează pe principiul degradării termice rapide (piroliză), care are loc înainte ca ionii să fie separați și detectați în spectrometrul de mobilitate ionică. Astfel, piroliza poate fi utilizată cu succes pentru a clasifica sau identifica bacterii cu ajutorul markerilor generați – spre exemplu, piridina, acidul picolinic, acidul dipicolinic, acizi grași și esterii metilici ai acizilor grași.

Au existat și tentative de a obține rezultate similare prin introducerea bacteriilor întregi în pirolizator, rezultatele fiind însă relativ controversate.

3. Prelevarea și analiza probelor, procesarea datelor și interpretarea rezultatelor

Descrierea aparaturii, a sistemului experimental și analiza probelor

Culturile de bacterii au fost pregătite de către biologul Departamentului de Chimie de la Loughborough University, UK. În fiole din sticlă cu volumul de 30 mL s-a introdus o cantitate de 5 mL de mediu de cultură, în care au fost inoculate culturi de bacterii. Cele trei specii de bacterii cu care s-a lucrat au fost: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (NCTC 10073) și *Staphylococcus aureus* (NCIMB 8625). Probele de aer headspace au fost prelevate după diferiți timpi de incubare, respectiv după 24, 48 și 72 de ore. S-au obținut trei seturi de date, pentru fiecare dintre cele trei specii de bacterii, datele fiind provenite de la cele trei aparate cu care s-a lucrat simultan, respectiv Gaz-Cromatograf cuplat cu 1) Spectrometru de Masă și 2) Spectrometru de Mobilitate Diferențială (GC/MS-DMS) (Figura 5) – de unde au rezultat două seturi de date și, independent de acestea, 3) cu un Spectrometru de Mobilitate Ionică cu câmp electric transversal (Envionics IMS) (Figura 6) – de unde a rezultat cel de-al treilea set de date.

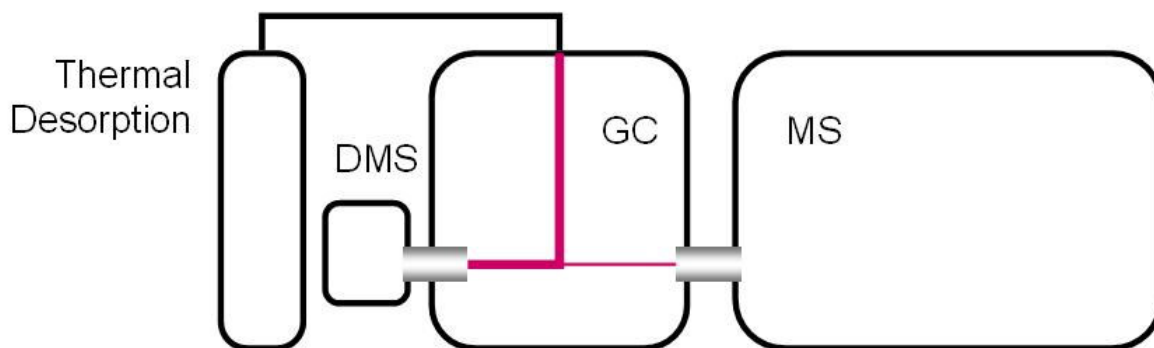


Figura 5. Diagramă schematică a sistemului TD-GC/MS-DMS (termodesorber - Gaz-Cromatograf cuplat cu Spectrometru de Masă și Spectrometru de Mobilitate Diferențială).

În cazul ambelor abordări, atât pentru probele analizate cu TD-GC/MS-DMS (Gaz - Cromatograf cuplat cu Spectrometru de Masă și Spectrometru de Mobilitate Diferențială) cât și pentru cele analizate cu Spectrometrul de Mobilitate Ionică Envionics IMS s-a lucrat cu aceleași probe (culturi de bacterii), respectiv probele analizate cu GC/MS-DMS au fost preluate dimineața, iar analiza directă cu ajutorul Envionics IMS a fost efectuată după cca. 8 ore, pentru a permite re-accumularea compușilor chimici în spațiul headspace.

În prezenta lucrare, se va insista asupra datelor experimentale obținute cu ajutorul spectrometrului de mobilitate ionică cu câmp electric transversal (Envionics IMS) - ce reprezintă,

de fapt, obiectul prezentului proiect de cercetare, în timp ce datele provenite de la TD-GC/MS vor fi folosite ca metodă de validare a primelor. Avem destul de puține informații de la datele obținute cu ajutorul Spectrometrului de Mobilitate Diferențială (DMS), tehnică înrudită cu IMS, procesarea și interpretarea acestora fiind încă în derulare.

Funcționarea ChemPro100i IMS



Figura 6. Spectrometrul de mobilitate ionică cu câmp electric transversal ChemPro100i IMS (Environics Oy).

Pentru analiza datelor în timp real, a fost utilizat un **spectrometru de mobilitate ionică** cu câmp electric transversal - **ChemPro100i IMS** (fabricat de firma Environics Oy, Finlanda – (Figura 6), cu care s-a lucrat simultan atât în modul pozitiv cât și în modul negativ de operare, pentru a analiza probe de aer prelevate din atmosfera headspace de deasupra culturilor bacteriene. Răspunsul oferit de către **ChemPro100i** Environics IMS, este furnizat prin intermediul a 16 canale/detectori: 8 pentru modul pozitiv de operare și 8 pentru modul negativ de operare (a se vedea Figura 9 și Figura 12). [Moll, Rațiu et al, 2010; Räsänen et al, 2010; Rațiu et al, 2012.]

Celula instrumentului este formată din două plăci paralele (pe care se depun seturile de câte 8 electrozi, ce corespund canalelor), printre care este trecut un flux unidirecțional de gaz purtător (aer purificat). Plăcile sunt separate de o distanță de 0,5 mm, iar lungimea totală a senzorului IMS este de 6 mm. Câmpul electric din celula spectrometrului are o intensitate de 5 kV m^{-1} . În vederea realizării ionizării, aparatul utilizează o sursă radioactivă α cu ^{241}Am , având activitatea de 5,9 MBq.

Gazul de drift (aer) recirculat a fost purificat de un set de două cartușe filtrante – unul conținând sită moleculară (pentru captarea vaporilor de apă) și unul cu cărbune activ (pentru filtrarea compușilor organici) și menținut la un flux constant de $1300 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. S-a lucrat la temperatură apropiată de cea ambientă (ca. 310 K), iar presiunea din celula IMS a fost de 101 kPa [Moll, Rațiu et al, 2010; Huo, Rațiu et al, 2011; Rațiu et al, 2012.]

Principiul de separare al ChemPro100i IMS - reprezentat în Figura 7 - este următorul: aerul ambiant este pompat în interiorul detectorului ChemPro100i, moleculele sunt ionizate de către sursa de ionizare radioactivă, iar ionii de tip cluster sunt purtați de către fluxul de gaz de drift de-a lungul celulei IMS și deviați spre detectori sub acțiunea câmpului electric transversal E .

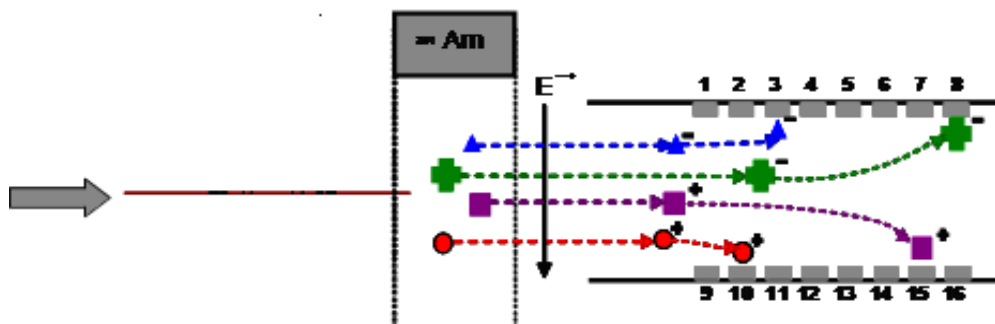


Figura 7. Principiul de separare al ChemPro100i Environics IMS.

Celula IMS conține 8 perechi de electrozi (canale) de care se vor lovi ionii-cluster cu diferite mobilități, purtați de către gazul de drift și deviați de câmpul electric. Astfel, ionii cu masă mai mare vor ajunge pe ultimii electrozi, în timp ce ionii cu masă mai mică, fiind mai ușor de deviat, se vor opri la primii electrozi.

Text	
Device time:	05/01/2000 04:28:54
Gas detecting state:	Normal
Data valid:	Yes
Gas name:	AIR (none)
Conc level:	Undefined
Membership:	Undefined
Projection:	Undefined
IMS sum (rel):	85.63
IMS sum (abs):	638.80
Pump PWM:	975
Flow:	1.299
Flow Setpoint:	1.300
SCCell (rel):	1.348
SCCell2 (rel):	0.261
SCCell (abs):	2.265
SCCell2 (abs):	1.227
SCCell1R (abs):	6739
SCCell2R (abs):	17045
Cell temp:	38.150
External temp:	28.987
Rel humidity:	17.522
Abs humidity:	8.142

Figura 8. Imagine a ferestrei furnizată de softul ChemPro100, prezentând parametri fizici și electrice ai celulei de mobilitate ionică cu câmp transversal, precum și informațiile generate de senzorii semiconductorilor

Detecția are loc simultan atât în modul pozitiv, cât și în modul negativ de operare. Rezultatul / răspunsul IMS este, de fapt, o distribuție a clusterilor ionici de-a lungul celulei, care

este transformată în curenți ionici mășurați simultan de cei 8 detectori pozitivi și cei 8 detectori negativi (canale IMS). Putem afirma că răspunsul produs de instrumentul *ChemPro100i* este unul de tip „fingerprint” (Figura 9).

Software-ul de operare al instrumentului cuprinde două secțiuni: una pentru vizualizarea parametrilor celulei (presiune, temperatură, umiditate), iar în cealaltă sunt reprezentate răspunsurile detectorilor (canalelor). Aceste secțiuni sunt reprezentate în Figurile 8 și 9.

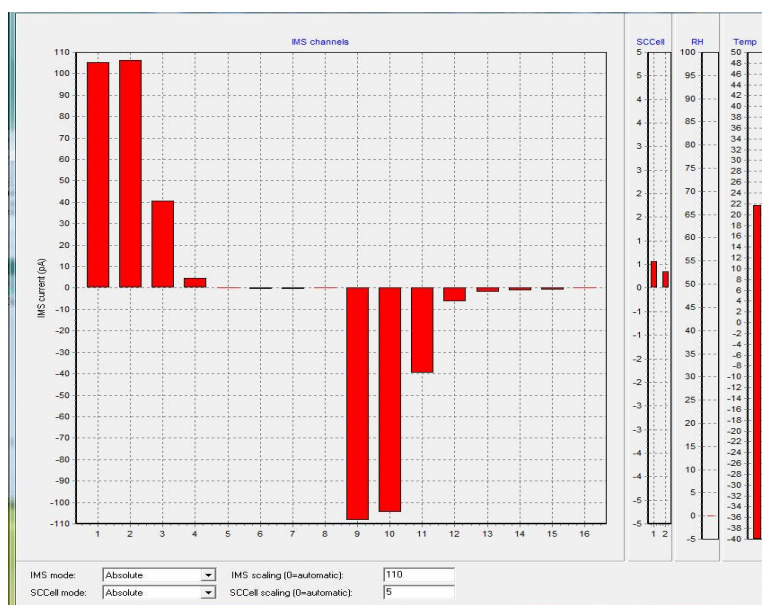


Figura 9. Răspunsul detectorilor, livrat de softul ChemPro100. Debitul gazului purtător (aer recirculat și filtrat) este păstrat constant la 1300 cm³/min.

Datele au fost înregistrate în format TXT, apoi convertite în fișiere Microsoft[®] Excel XLS. Procesarea s-a făcut în Excel 2003 cu ajutorul unui macro dedicat, utilizându-se multiple abordări pentru prelucrarea și corecția datelor, în final, aplicându-se metoda statistică Principal Components Analysis (PCA) pentru a evidenția eventuale similitudini și diferențe între probele headspace.

[Mol., Rațiu et al, 2010; Rațiu et al, 2012.]

Prelevarea probelor analizate cu ajutorul ChemPro100i IMS

Cu ajutorul unei seringi din sticlă pentru gaze, cu volumul de 5 mL și piston din PTFE, au fost prelevate probe de aer din atmosfera headspace a fiecărei fiole, prin septul din cauciuc al capacului (Figura 10). Probele preluate au fost injectate imediat în aparat, la o distanță mică de celula IMS – de aproximativ 1 cm (Figura 11). Răspunsul poate fi observat cvasi-instantaneu, după cca. 1 secundă de la injectarea probei (Figura 12).

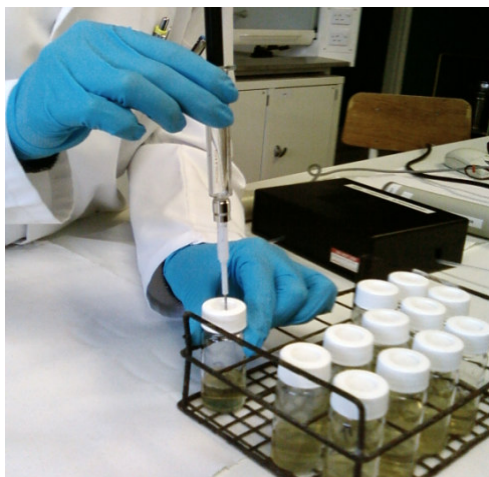


Figura 10. Prelevarea probelor din atmosfera headspace



Figura 11. Injectarea probelor în aparat (ChemPro100i IMS)

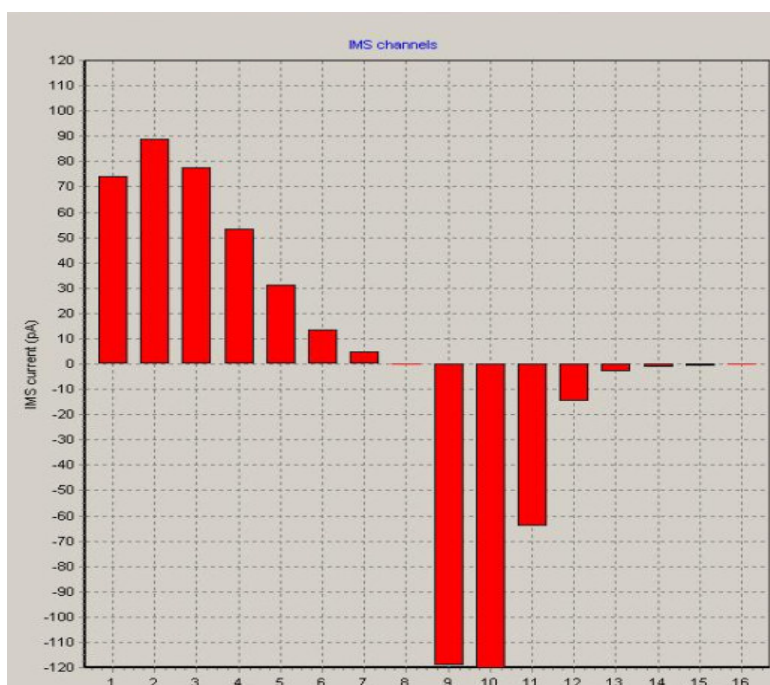


Figura 12. Răspunsul furnizat de Environics IMS pentru o probă de aer headspace, de la specia *Escherichia coli*.

Probele analizate cu ajutorul instrumentului *ChemPro100i Environics IMS* au fost prelevate de la 3 tulpini de bacterii: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* și *Staphylococcus aureus*. Pentru fiecare specie au fost pregătite 10 culturi de bacterii, din care probele au fost preluate în triplicat, la trei timpuri de incubare (după 24, 48 și 72 de ore), urmând programul prezentat în Figura 13.

Astfel, pentru fiecare specie monitorizată au fost prelevate și analizate probe timp de trei zile, ajungându-se la un număr de 90 de probe pentru fiecare dintre cele trei specii pentru ca, în final, să se ajungă la un total de 540 de probe headspace analizate (270 de eșantioane conținând incubate cele trei specii de bacterii și 270 de probe blank, care au avut inoculat doar mediul de cultură).

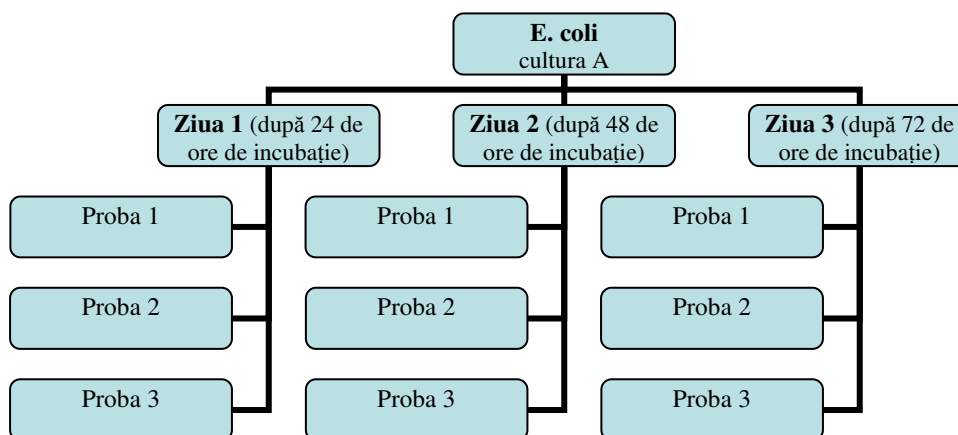


Figura 13. Programul prelevării probelor de aer headspace analizate cu ajutorul EnviroNics IMS, pentru o probă care a avut inoculată specia Escherichia coli.

Sistemul TD-GC/MS (Termodesorber / Gaz - Cromatograf / Spectrometru de Masă)

Probele analizate prin TD-GC/MS au fost prelevate timp de trei zile, luându-se zilnic câte zece probe pentru fiecare specie (deci s-a efectuat o singură prelevare de la fiecare cultură), totalizându-se un număr de 30 de probe pentru fiecare specie, ajungându-se la numărul de 120 de probe (90 de probe prelevate de la cele trei specii monitorizate, la care s-au adăugat 30 de probe blank).

Sistemul de prelevare a probelor utilizat pentru analiza probelor cu ajutorul TD-GC/MS-DMS a fost proiectat și construit în laborator și poate fi observat în imaginea de mai jos (Figura 14).

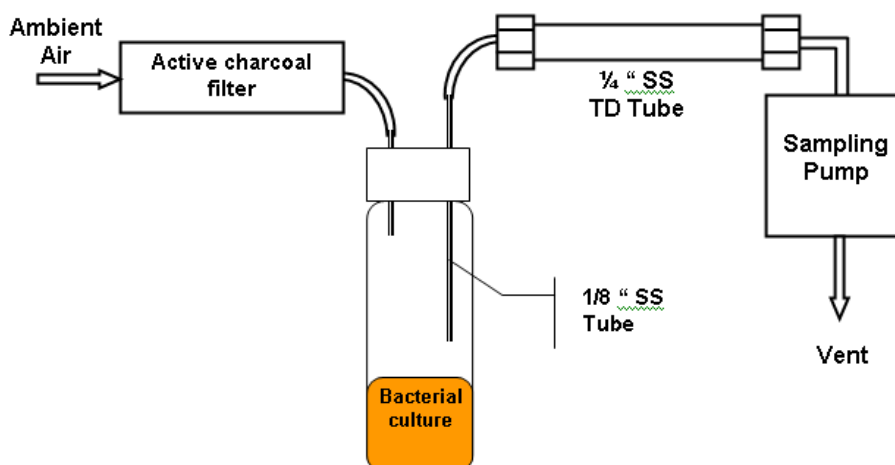




Figura 14. Sistem de prelevare a probelor din atmosfera headspace pentru probele analizate cu ajutorul TD-GC/MS-DMS [Rațiu et al, 2011]

O fiolă din sticlă cu volumul de 30 mL, conținând bacteriile incubate în mediul de creștere, a fost conectată atât cu un filtru cu cărbune activ, cât și cu o trapă cu material absorbant (Tenax TA™ 35-60 mesh + Carbotrap™ 20-40 mesh) prin care, cu ajutorul unei pompe ESCORT ELF Pump MSA (Mine Safety Appliances Inc.) USA, a fost prelevată o cantitate de totală de 1 L de aer, în timp de 2 minute (deci cu un debit de 0,5 L/min). Schema designului experimental poate fi observată mai jos (Figura 14).

Tabelul 1. Parametrii de funcționare ai Termodesorberului Markes Double Stage TD

Markes Double Stage TD	Parameter	Setting
	Primary desorption flow	50 cm ³ min ⁻¹
	Primary Split	Splitless
	Primary desorption temperature	280°C
	Primary desorption time	5 min
	Cold trap volume	0.019 cm ³
	Cold trap temperature	-10°C
	Cold trap packing	U-T2GPH (General purpose hydrophobic)
	Secondary desorption flow	2 cm ³ min ⁻¹
	Secondary desorption temperature	300°C
	Secondary desorption time	5 min
	Trap heating rate	100°C min ⁻¹
	Transfer line temperature	140°C


Tabelul 2. Condițiile de operare ale Gaz-Cromatografului Varian 3800 GC

Varian-3800 GC	Parameter	Setting	
	Column	30 m × 0.25 mm × 0.25 μm DB 5	
	He carrier gas flow	2.0 cm ³ min ⁻¹	
	Initial oven temperature	40°C	
	Initial hold time	0 min	
	Oven temperature program		3.3°C min ⁻¹ to 90°C
			2.5°C min ⁻¹ to 140°C
			10°C min ⁻¹ to 300°C, hold for 8.85 min
Total run time	60 min		

Probele, odată prelevate, au fost stocate în frigider la temperatura de 4°C și analizate în timp de maximum 72 de ore de la colectare cu ajutorul unui Termodesorber cuplat cu Gaz-Cromatograf și Spectrometru de Masă (TD-GC/MS). Metoda aleasă pentru analiza probelor a durat 60 de minute pentru fiecare probă.

Sistemul TD-GC/MS folosit pentru analiza probelor încorporează o unitate de Termodesorbție produsă de firma Markes International (UK), cuplată cu un Gaz-Cromatograf Varian 3800 în tandem cu un Spectrometru de Masă cu capcană de ioni („ion trap mass spectrometer”) model Varian-4000, care funcționează ca detector. Tabelele 1-3 sumarizează condițiile de funcționare ale lanțului instrumental utilizat.

Table 3. Condițiile de funcționare ale Spectrometrului de Masă Varian 4000 Ion Trap MS

Varian-4000 Ion Trap MS	Parameter	Setting
	Scan type	Full
	Mass range	40 to 445 Da
	Tune type	Auto
	Ionization type	EI
	Target TIC	20000 counts
	Max ion time	25000 μs
	Emission current	10 μA
	Total run time	60 min
	Scan time	0.82 Seconds
	Transfer line temperature	270°C
	Trap temperature	150°C
	Manifold temperature	50°C

La începutul fiecărei zile, dar și după fiecare 5 probe analizate în aceeași zi, a fost cuantificat „Indicele de Retenție” (despre care se va discuta în detaliu în cele ce urmează) cu scopul de a verifica buna funcționare a aparatului.

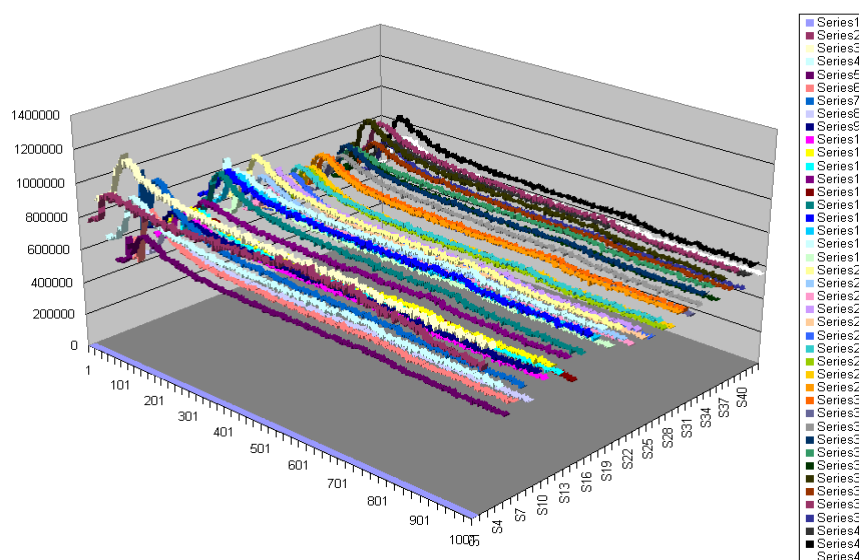


Figura 15. Reprezentare 3D a răspunsului rezultat în urma efectuării metodei de curățare „trap blank”. Se poate remarca reprezentarea liniei de bază a semnalului curentului ionic total (TIC), timp de 10 minute (cât a durat metoda „trap blank”) pentru o perioadă de 42 de zile, timp în care intensitatea semnalului curentului ionic total s-a menținut constantă. [Rațiu et al, 2011]

De asemenea, înainte de analiza fiecărei probe a fost executată o metodă de curățare a instrumentului (trap blank), care a constat în încălzirea până la 310°C și trecerea gazului prin coloană cu scopul de a curăța eventualele impurități rămase de la proba analizată anterior. Curățarea se considera ca fiind adecvată dacă intensitatea semnalului obținut s-a menținut constantă, între aceleași limite pe toată durata de analiză a probelor, timp în care condițiile de funcționare ale instrumentului au fost neschimbate. Astfel Figura 15, unde avem o reprezentare 3D a intensității semnalului (cuprinsă între 400 V și 800 V), timpului de analiză (10 minute) și a duratei de analiză a probelor (42 de zile), confirmă buna funcționare a sistemului TD-GC/MS.

Indicelele de retenție primar

Analiza standardului Indicelui de Retenție RI a constat în analiza unei soluții etalon formată dintr-un amestec de 18 substanțe cunoscute. Această analiză a fost efectuată la începutul fiecărei zile, dar și după fiecare cinci probe analizate. Scopul a fost crearea unei scări a indicelui de retenție, dar și de a avea un control permanent asupra răspunsului aparatului în fiecare zi.

Utilizând un set de hidrocarburi cunoscute, din aceeași serie omoloagă, ca standard pentru indicele de retenție, valorile indicelui de retenție au fost aliniate pe baza numărului de atomi de carbon al componentului. Valorile asociate fiecărui component au fost apoi reprezentate în funcție de timpul de retenție specific, obținându-se o scară a indicelui de retenție liniară (Figura 16). Alinierea indicelui de retenție a fost realizată prin desemnarea valorii indicelui de retenție (RI) a fiecărui component din lanțul de hidrocarburi utilizate ca standard pentru indicele de retenție. Acest indice, pentru fiecare dintre cele 8 hidrocarburi, se bazează pe numărul de atomi de carbon a fiecărui component. Atribuirea valorilor utilizate pentru a alinia datele este dată de Tabelul 4.

Tabelul 4. Valorile indicilor de retenție și a timpului de retenție aproximativ asociate hidrocarburilor utilizate la construirea Indicelui de Retenție Primar

<i>Compus</i>	<i>RT (timp de retenție)</i>	<i>RI (indice de retenție)</i>
Octan	2.647211	800
Nonan	4.708737	900
Decan	7.861105	1000
Undecan	11.41037	1100
Dodecan	15.92647	1200
Tetradecan	25.97974	1400

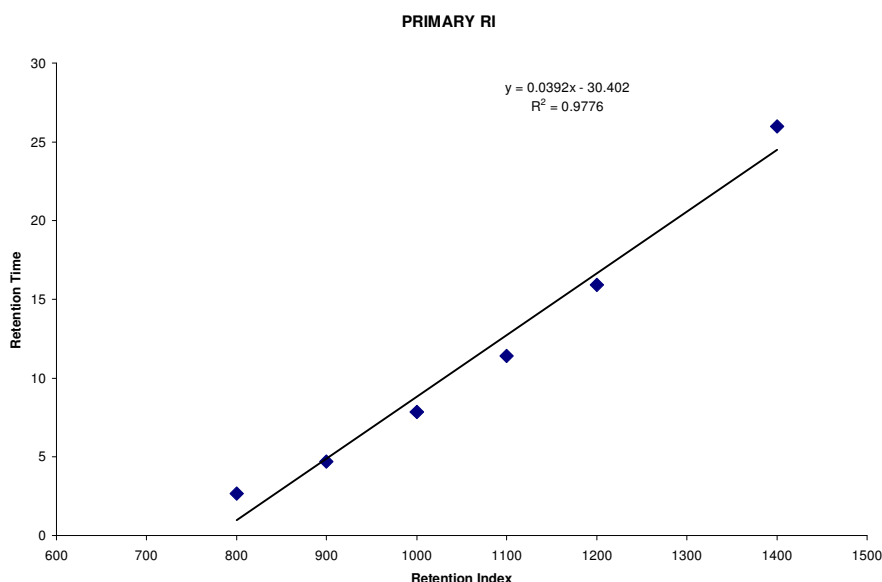


Figura 16. Graficul indicelui de retenție primar construit cu ajutorul a șase hidrocarburi cunoscute (Tabelul 4). [Rațiu et al 2011]

Indicelele de retenție secundar

Nu este întotdeauna cea mai bună idee să se adauge prea mulți compuși unei soluții etalon care urmează a fi folosită la obținerea scalei de indice de retenție în scopul de a verifica buna funcționare a aparatului și de a „alinia” probele. O alternativă mai bună ar fi construirea unui al doilea indice de retenție. În acest scop, au fost utilizați compușii siloxani din cromatogramele probelor, compuși prezenți în toate probele și rezultați din interacțiunea probei absorbite cu suprafața tuburilor. [Turner, 2009; Rațiu. et al, 2011]

Utilizând cromatogramele probelor headspace analizate, au fost identificați și selectați 5 compuși siloxani, ai căror timpi de retenție au fost „urmăriți” în toate probele; cu ajutorul acestora a fost construit „Indicele de retenție secundar” (Figura 17).

Tabelul 5. Valorile indicelui de retenție statistic și timpul de retenție aproximativ ale compușilor siloxani utilizați la indicele de retenție secundar întâlniți în toate probele analizate

Compus siloxan	Timp de retenție (RT) aproximativ (minute)	Valorile indicelui de retenție statistic (RI)
S ₁	2.9552	850.949
S ₂	7.5181	967.3495
S ₃	13.5745	1121.849
S ₄	20.9233	1309.319
S ₅	28.733	1508.546

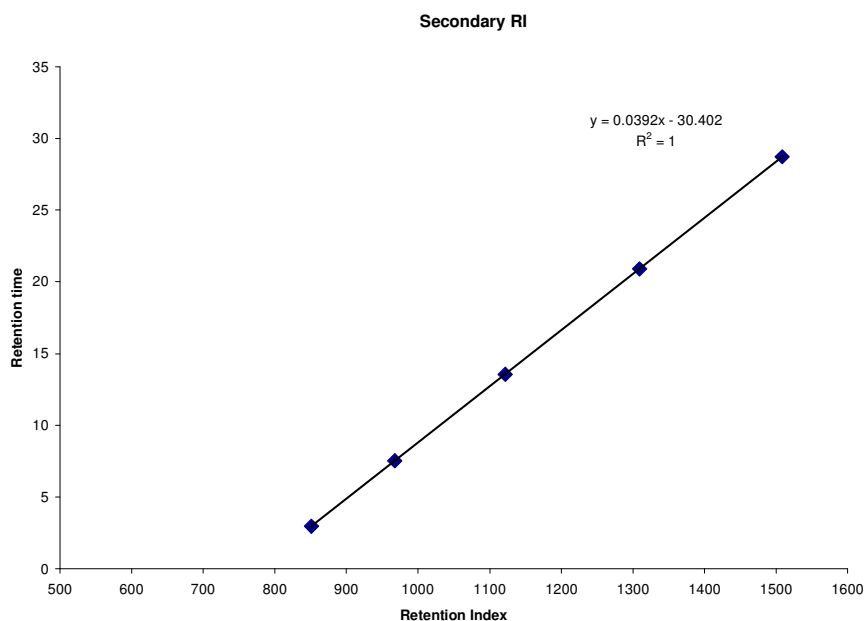


Figura 17. Graficul Indicelui de retenție secundar construit pe baza compușilor siloxani întâlniți în probele headspace [Rațiu et al, 2011]

Crearea librăriilor de compuși

Librăriile de compuși pentru probele headspace au fost create cu scopul de a totaliza compușii întâlniți în probe și totodată de a verifica eventualele diferențe întâlnite în probele cu diferite specii de bacterii incubate sau în probele prelevate după diferiți timpi de incubare (în zile diferite). Exemple concludente pot fi considerate cele din Figurile 18 și 19, unde putem observa **similitudinea** între diferite tuburi cu probe prelevate după același timp de incubare de **la aceeași specie de bacterii** (Figura 18) și **diferențe** între probele care au avut incubate **diferite specii de bacterii** (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* și *Staphylococcus aureus*) – Figura 19.

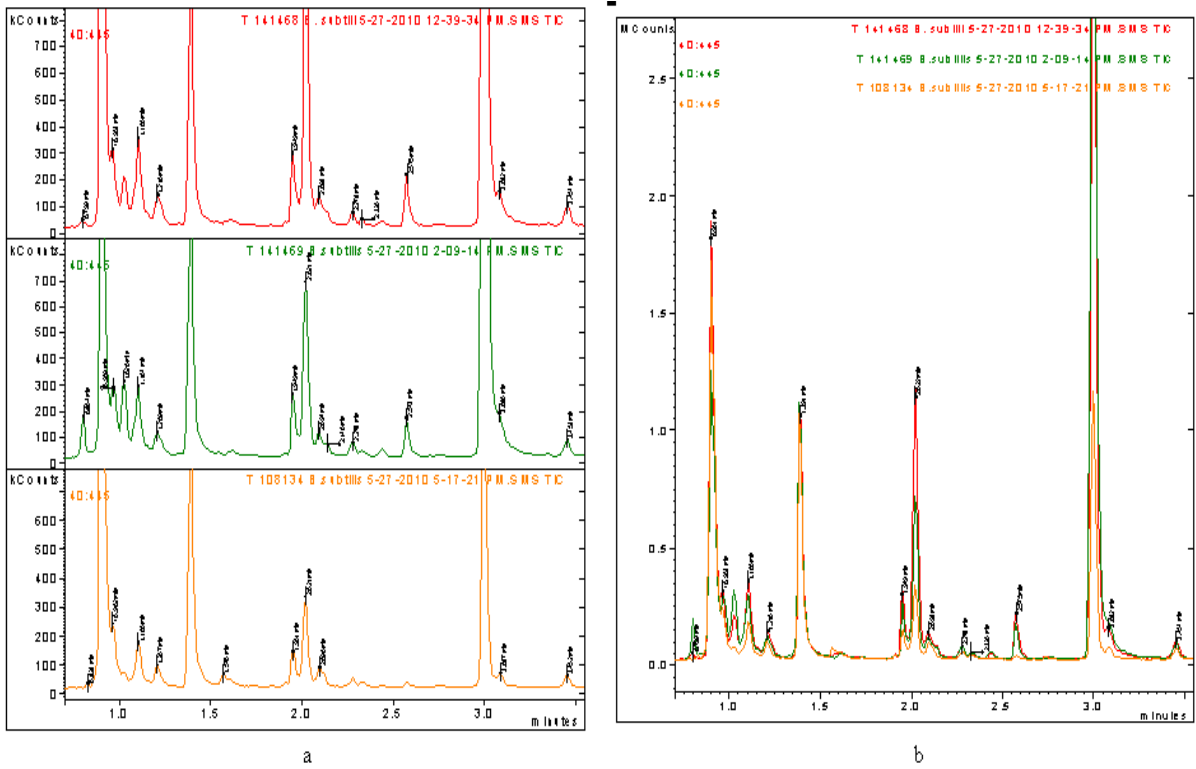


Figura 18. Cromatogramă GC-MS a speciei *Bacillus subtilis* după 72 de ore de incubare. Se poate observa că după primele trei minute de analiză, trei probe prelevate în tuburi diferite, dar având aceeași specie de bacterii incubată prezintă răspunsuri similare. a - cele trei cromatograme așezate unele sub altele, în timp ce b - ilustrează aceleași cromatograme suprapuse, cu scopul de a evidenția eventualele diferențe dintre ele. Se observă, însă, profile similare.

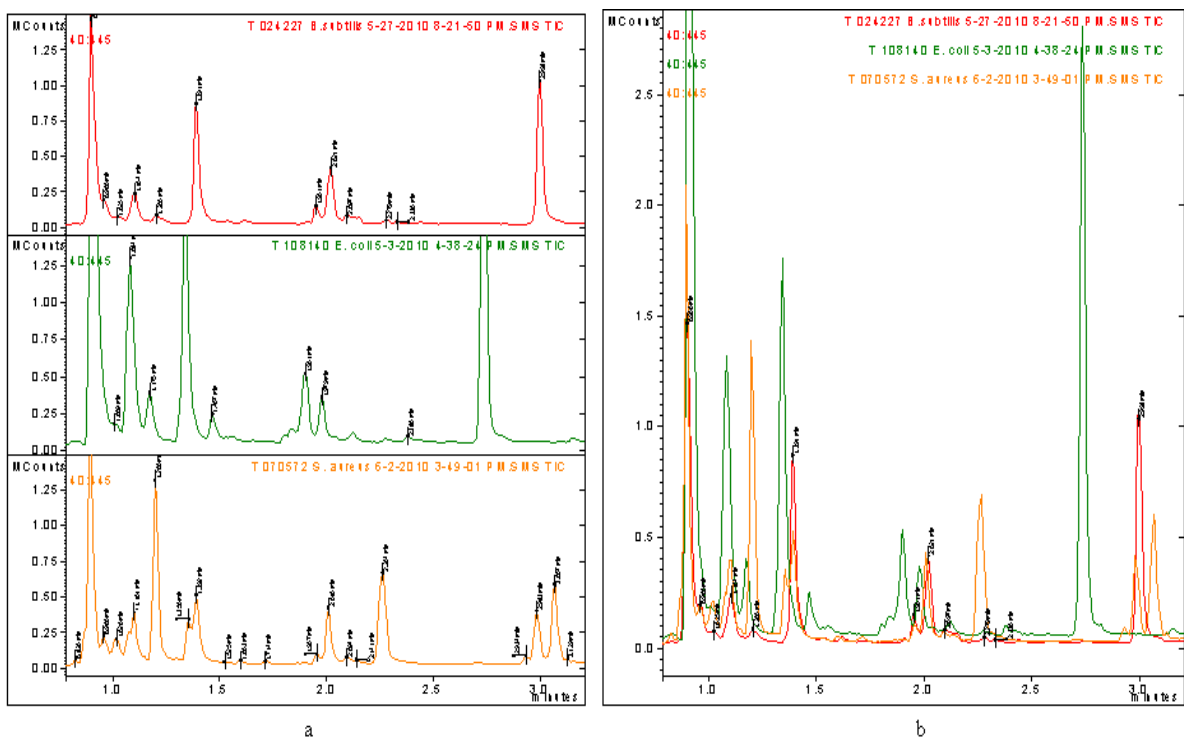


Figura 19. Cromatogramă GC-MS a speciilor *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, după 72 de ore de incubare. Se poate remarca, după primele trei minute de analiză, că fiecare specie bacteriană prezintă profile distincte (a). Suprapunerea acestora denotă diferențierea celor trei specii analizate, după cum se poate observa în (b)

Rezultate și discuții

Pornind de la *ipoteza că între probele noastre NU există diferențe*, s-a aplicat metoda PCA (Principal Component Analysis) pentru a verifica:

- dacă avem o diferențiere între probele care au avut incubate bacterii și cele în care a fost prezent doar mediul de cultură;
- dacă ChemPro100i IMS percepe diferențe între diferite specii de bacterii prelevate după același timp de incubare;
- dacă există diferențe între probele care au avut inoculată aceeași specie, dar au fost prelevate la diferiți timpi de incubare;
- dacă fiecare canal / detector analizat individual prezintă un profil distinct.

Diferențiere între probele cu bacterii și probele blank

Crucea (reticulul) care împarte graficul PCA, obținut cu ajutorul software-ului SPSS, în cele *patru cadrane*, (*cadranul din stânga sus*, care va fi denumit „*Cadranul I*”, *cadranul din dreapta sus* - pe care îl vom numi „*Cadranul II*”, *cadranul din dreapta jos* - care va fi întâlnit sub denumirea de „*Cadranul III*” și *cadranul din stânga jos* - „*Cadranul IV*”) separă punctele (din grafic) în puncte care posedă caracter (încărcare) pozitiv și negativ (pozitivă și negativă) din punct de vedere al celor doi „componenti principali”, PC1 și PC2. Delimitarea se face de la 0 până la +/- 1, atât pentru „Componentul principal 1” (PC1), cât și pentru „Componentul principal 2” (PC2). Deci, cele patru cadrane, prezintă încărcare pozitivă și/sau negativă atât pentru PC1, cât și pentru PC2. În mod concret, cadranul I (CI) prezintă încărcare **pozitivă pentru PC2 și negativă pentru PC1**, cadranul II (CII) posedă **caracter pozitiv atât pentru PC1 cât și pentru PC2**, cadranul III (CIII) este **pozitiv pentru PC1 și negativ pentru PC2**, în timp ce cadranul IV (CIV) este **negativ pentru PC1 și PC2**.

Canalele **C1 și C2**, corespunzătoare în principal semnalului picului ionilor reactanți, care, după cum ne așteptam, **nu prezintă răspunsuri semnificative**, s-au grupat separat față de celelalte (C3 – C7), iar C8, care este utilizat doar pentru verificarea unor parametri de conformitate ai celulei IMS, deci nu prezintă nici un răspuns vizibil (apărând afișată valoarea „0” pe coloana corespunzătoare lui) a fost exclus din graficul punctelor „Component Plot”.

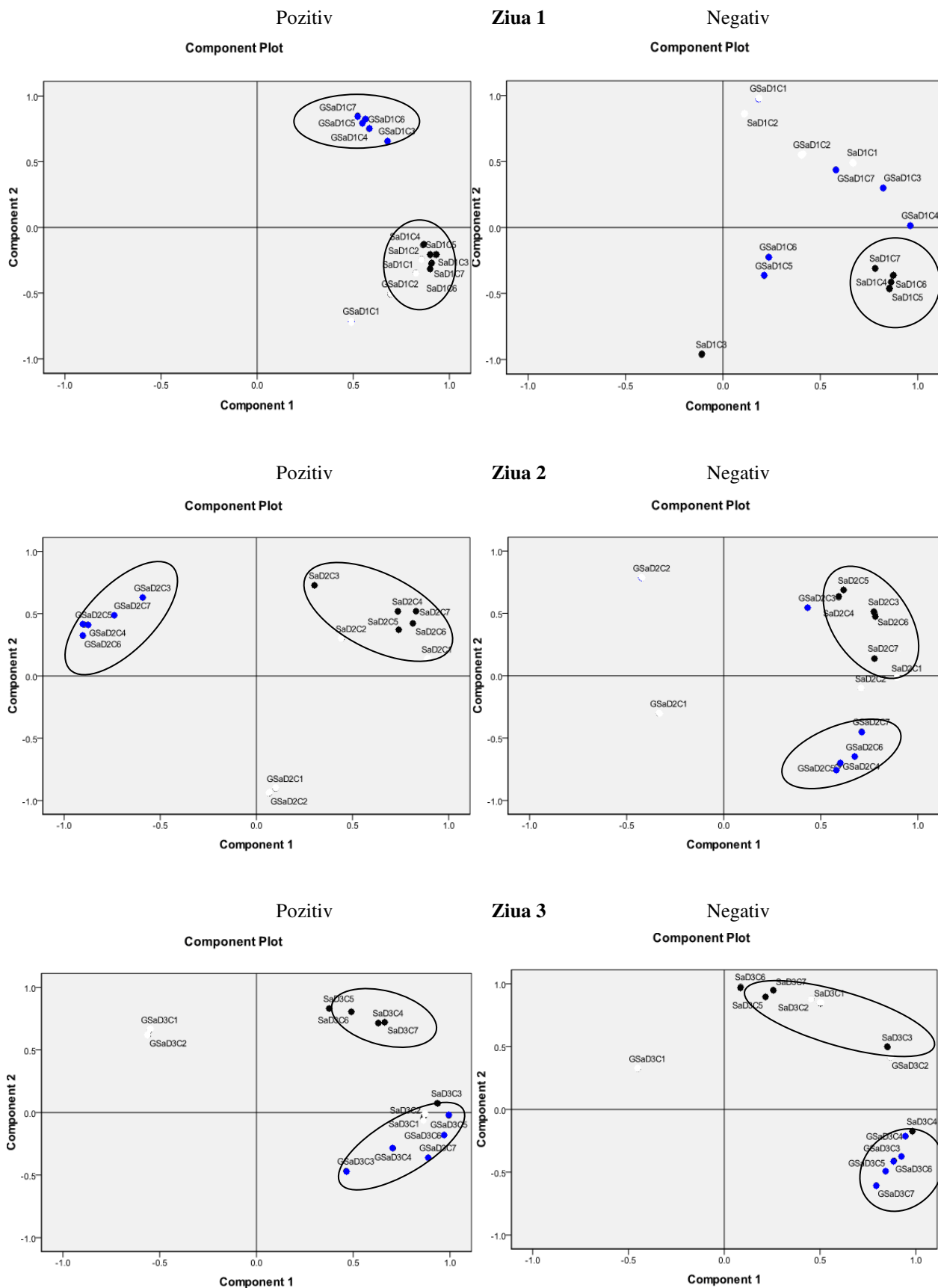


Figura 20. Diferențiere între specia *Staphylococcus aureus* și mediul de cultură, evidențiată cu ajutorul metodei statistice Principal Components Analysis (PCA), de-a lungul celor trei zile de incubare, atât pentru modul pozitiv, cât și pentru modul negativ de operare. Fiecare punct reprezintă răspunsul asociat unui detector individual (canal) provenit de la 10 culturi de bacterii din care probele au fost luate în triplicat. Sa - *Staphylococcus aureus*; G – mediul de creștere; D1 – Ziua 1, D2 – Ziua 2, D3 – Ziua 3; C3...C7 – Canale/detectori [Rațiu et al, 2012].

Totuși, pentru a evidenția existența canalelor C1 și C2 în mod normal în graficul punctelor, dar mai ales pentru că ele prezintă un răspuns vizibil (de scădere a intensității semnalului în favoarea creșterii celorlalte C3 – C7), acestea n-au fost îndepărtate din graficul „Component Plot”, însă au fost marcate cu culoarea albă.

Urmărind cele șase grafice ale punctelor prezentate în Figura 20 se poate remarca **diferențierea dintre** probele care conțin incubată specia *Staphylococcus aureus* și probele blank; astfel, putem observa că probele cu bacterii apar separat grupate față de cele care au avut incubat doar mediul de creștere.

Modul pozitiv de operare indică o separare atât pentru probele cu bacterii, cât și pentru cele cu mediu de creștere. În consecință, analizând graficele punctelor (Figura 20) în care au fost detectați ioni pozitivi observăm apariția ionilor clusteri proveniți de la probele cu bacterii, inițial în CIII, apoi după 48 de ore de incubare, deplasarea lor în CII unde vor rămâne pentru toată perioada de timp în care au fost monitorizați.

În același timp, clusterii proveniți de la probele care conțineau doar mediul de cultură, s-au deplasat din CII, unde au apărut inițial (după 24 de ore de la incubare), în CI (la 48 de ore de incubare), urmând ca apoi (după 72 de ore de incubare) să fie întâlniți în CIII.

În modul negativ de operare se poate remarca diferențierea între probele cu bacterii și cele care au avut incubat mediul de creștere. Punctele aferente ionilor clusteri proveniți de la probele care au avut incubată bacteria *Staphylococcus aureus* au apărut inițial (după 24 de ore de incubare) în cadranul III, după 48 de ore de la momentul incubării s-au deplasat în cadranul II, unde au fost observați inclusiv în cea de-a treia zi, excepție făcând C4, care a revenit la cadranul III.

Clusterii proveniți de la mediul de creștere prezintă o aranjare haotică după 24 de ore de incubare, ei apărând împărțiți între cadranul II (C3, C4, C7) și III (C5, C6), pentru ca apoi după 48 de ore să poată fi observați în cadranul III (cu excepția C3, care rămâne în cadranul II), și tot acolo, după 72 de ore de incubare.

Rezultate similare cu cele din exemplul prezentat mai sus au fost observate prin aplicarea SPSS probelor care au avut inoculate speciile *Escherichia coli* și *Bacillus subtilis*. Având în vedere cele prezentate mai sus, **am considerat fezabilă discriminarea dintre probele care au avut incubate una din cele trei specii de bacterii monitorizate, (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) și probele blank** utilizând un Spectrometru de Mobilitate Ionică cu câmp transversal de tip **EnviroNics IMS**.

Diferențiere între probele celor trei specii de bacterii (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*)

În urma aplicării testului statistic „Principal Components Analysis” (PCA) probelor analizate cu ajutorul unui Spectrometru de Mobilitate Ionică cu câmp electric transversal **Envionics IMS**, s-a constatat că aparatul utilizat ar putea face **discriminare între toate cele trei specii de bacterii** (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* și *Staphylococcus aureus*):

- după trei zile de la momentul începerii incubării, dacă vom urmări modul negativ de operare.
- după două zile, dacă vom lua în considerare clusterii detectați în modul pozitiv de operare.

Pe de altă parte, urmărind toate cele șase grafice din Figura 21, putem observa că *Staphylococcus aureus* s-a menținut separată de față celelalte două specii - *Escherichia coli* și *Bacillus subtilis* - chiar după primele 24 de ore de la incubare.

Alte aspecte relevante pe care le vom sublinia aici sunt următoarele:

- Probele de la *Staphylococcus aureus* prezintă o separare extinsă și destul de constantă la cei trei timpi de incubare pentru ambele moduri de operare.
- Probele de la *Escherichia coli* afișează (după 48 de ore în modul pozitiv și abia după 72 de ore în mod negativ de operare) o separare clară și o mai bună grupare odată cu trecerea timpului, de la momentul inoculării.
- Prin contrast, probele de la *Bacillus subtilis* se grupează separat de celelalte două tulpini bacteriene, după 48 de ore în modul pozitiv și după 72 de ore în mod negativ de operare, prezentând o grupare relativ constantă.

Canalele 1 și 2 - care corespund în principal semnalului ionilor reactanți - nu au prezentat răspunsuri semnificative, după cum ne așteptam, lucru remarcat și în cazurile anterioare. Pentru a evita aspectul încărcat, de supraaglomerare a graficelor, C1 și C2 au fost îndepărtate din reprezentările graficele ale punctelor.

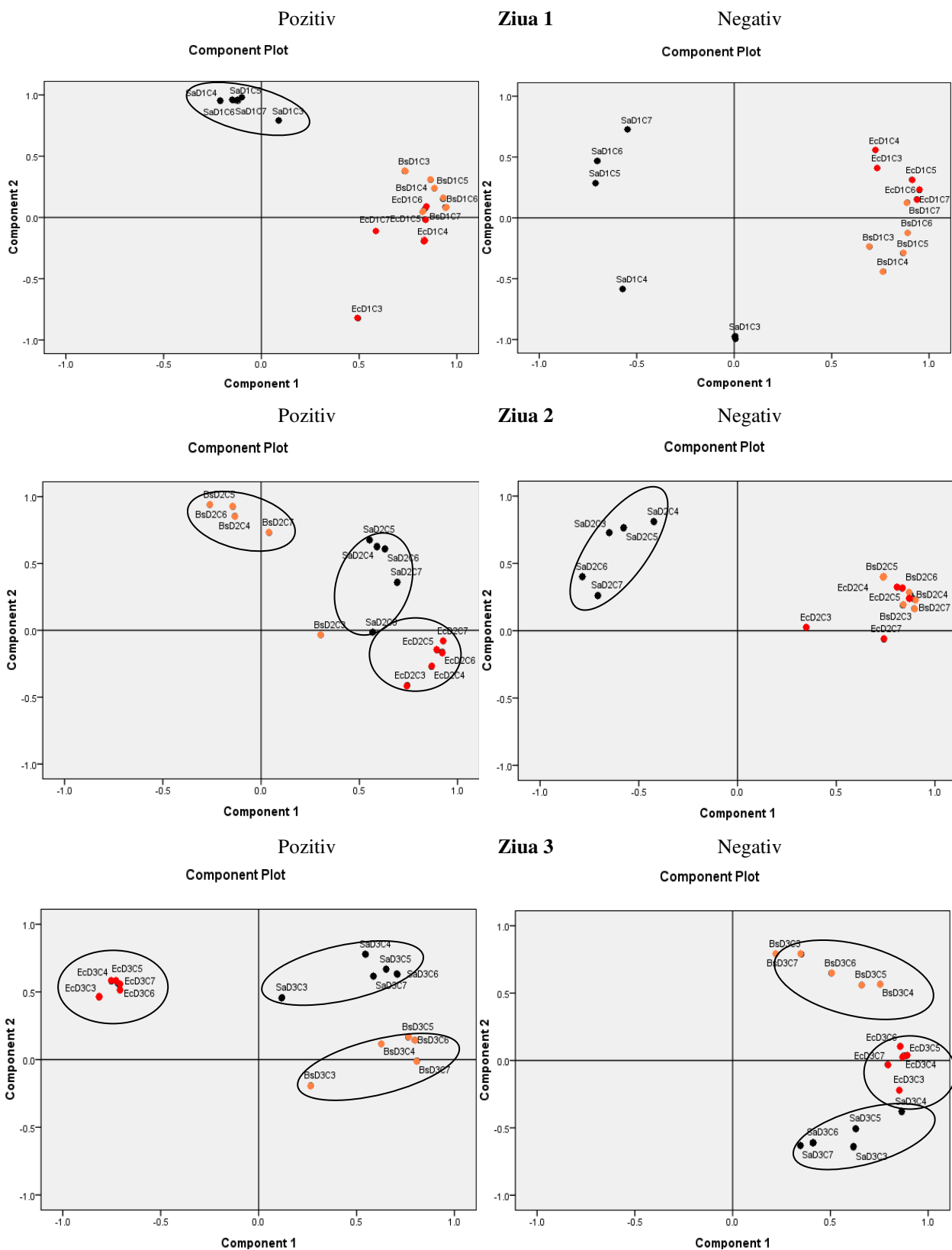


Figura 21. Diferențiere între speciile *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* și *Staphylococcus aureus*, evidențiată cu ajutorul metodei statistice Principal Components Analysis (PCA), de-a lungul celor trei zile de incubare, atât pentru modul pozitiv, cât și pentru modul negativ de operare. Fiecare punct reprezintă răspunsul asociat unui detector individual (canal) provenit de la 10 culturi de bacterii din care probele au fost luate în triplicat. Ec - *Escherichia coli*, Bs - *Bacillus subtilis* Sa - *Staphylococcus aureus* ; D1 – Ziua 1, D2 – Ziua 2, D3 Ziua 3; C3...C7 – Canale/detectori [Rațiu et al, 2012].

Mai concret, analizând separat cele trei cazuri (cei trei timpi de incubare) vom constata următoarele:

- **După prima zi** (24 de ore de incubare):
 - **în modul pozitiv** de operare a fost observată gruparea speciei *Staphylococcus aureus* în cadranul I (CI) și separat de aceasta, între CII și CIII au fost repartizate celelalte două: *Escherichia coli* și *Bacillus subtilis*.
 - **în modul negativ** de operare, probele care au avut incubat *Staphylococcus aureus* au fost distribuite între CI și CIV, dar nu s-a putut observa gruparea acestora sub formă de clusteri, cu toate că ele s-au menținut separat față de celelalte două *Escherichia coli* și *Bacillus subtilis*, care au fost repartizate paralel față de primele, adică între CII și CIII.

În altă ordine de idei, putem spune că, deși în această fază (după 24 de ore de incubare) nu s-a remarcat o grupare clară a celor trei specii, probele cu *Staphylococcus aureus* s-au menținut izolate față de cele cu *Escherichia coli* și *Bacillus subtilis*, fiind separate prin intermediul PC1.

- **După cea de-a doua zi** (48 de ore de incubare):
 - **în modul pozitiv** de operare s-a putut remarca diferențiere între toate cele trei specii monitorizate, acestea fiind distribuite după cum urmează: *Bacillus subtilis* a apărut în CI, prezentând deci încărcare pozitivă pentru PC2 și negativă pentru PC1, *Staphylococcus aureus* s-a situat în C2, fiind deci pozitiv pentru ambele, PC1 și PC2, în timp ce *Escherichia coli* a prezentat încărcare pozitivă pentru PC1 și negativă pentru PC2, căzând în CIII.
 - **în modul negativ** de operare, s-a observat gruparea sub formă de clusteri a speciei *Staphylococcus aureus*, în cadranul I și separat de aceasta, în cadranul II au fost grupate speciile *Escherichia coli* și *Bacillus subtilis*.
- **După cea de-a treia zi** (72 de ore de incubare):
 - **în modul pozitiv** de operare s-a observat **gruparea separată a probelor** provenite de la cele trei specii de bacterii; mai exact probele care au avut inoculată specia *Escherichia coli* au fost întâlnite în CI, cele cu *Staphylococcus aureus* în CII, în timp ce probele cu *Bacillus subtilis* s-au grupat și ele separat de celelalte două, situându-se la limita dintre CII și CIII (preponderent în CII).

- **în modul negativ** de operare a fost observată de asemenea gruparea separată a clusterilor proveniți de la cele trei specii de bacterii studiate. Astfel, punctele corespunzătoare speciei *Bacillus subtilis* s-au grupat în CII, prezentând încărcare net pozitivă, cele cu *Escherichia coli* s-au situat între CII și CIII fiind, deci încărcate preponderent pozitiv, în timp ce clusterii proveniți de la *Staphylococcus aureus* au fost grupați în CIII, deci pozitivi conform PC1 și negativi pentru PC2.

În concluzie, putem afirma că utilizând softul statistic **SPSS**, mai exact, aplicând „**Principal Components Analysis**” (PCA) probelor analizate cu ajutorul Spectrometrului de Mobilitate Ionică **ChemPro100i**, s-a constatat că instrumentul poate **percepe diferențe între toate cele trei specii de bacterii** (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* și *Staphylococcus aureus*) după trei zile de la momentul începerii incubării, pentru modul negativ de operare și după două zile, dacă vom lua în considerare modul pozitiv de operare. Pe de altă parte, urmărind toate cele șase grafice ale punctelor din Figura 20 putem observa că *Staphylococcus aureus* s-a menținut separată de celelalte două *Escherichia coli* și *Bacillus subtilis*, chiar după primele 24 de ore de la incubare.

Diferențierea speciei *Escherichia coli* în funcție de timpul de incubare

Aplicând metoda statistică „**Principal Components Analysis**” (PCA) probelor prelevate după 24, 48 și 72 de ore de la momentul incubării, care au avut inoculată specia *Escherichia coli* și au fost analizate cu ajutorul spectrometrului de mobilitate ionică **EnviroNics IMS**, s-au obținut **diferențieri atât între mediile de cultură prelevate la diferiți timpi de incubare, cât și între toate cele trei zile în care au fost monitorizate probele cu *Escherichia coli*** (Figura 22).

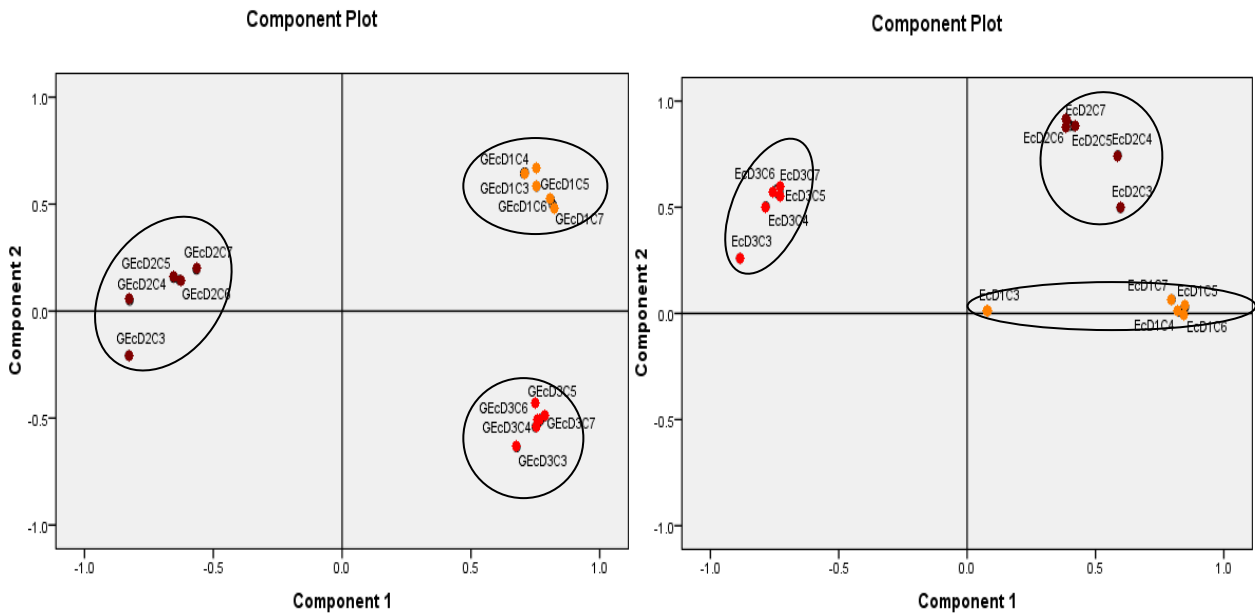
Detectorii (canalele) C1 și C2, corespunzătoare în principal semnalului ionilor reactanți nu au furnizat răspunsuri semnificative, ceea ce putem considera normal, și au fost îndepărtați din graficele punctelor.

O evaluare mai detaliată a graficelor punctelor corespunzătoare probelor care au avut inoculată specia *Escherichia coli* ne permite să concluzionăm următoarele:

- **în modul pozitiv de operare**, eșantioanele care au avut incubată specia *Escherichia coli* s-au grupat separat unele față de altele, în funcție de cei trei timpi de incubare la care s-a realizat prelevarea probelor. Mai exact, punctele corespunzătoare celei de-a treia zi s-au situat în primul cadran din graficul punctelor, cele din ziua 2 au fost observate în CII, în

timp ce clusterii corespunzatori probelor recoltate în prima zi s-au situat efectiv pe linia care separă CII de CIII.

Mod de operare pozitiv



Mod de operare negativ

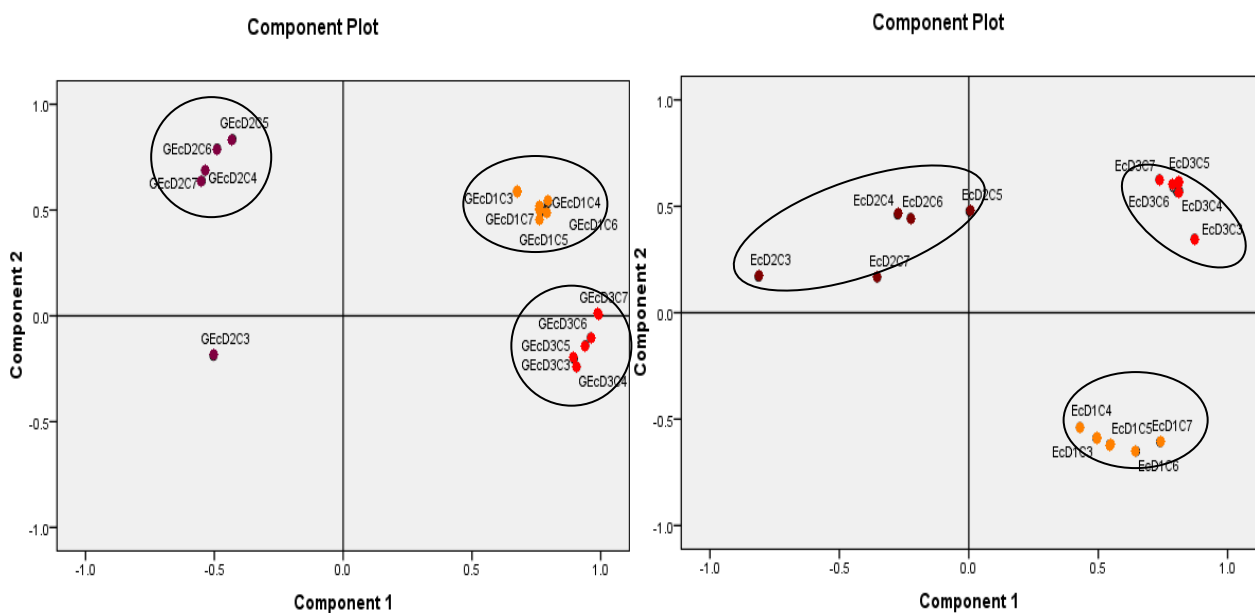


Figura 22. Diferențiere comparativă în funcție de timpul de incubare a speciei *Escherichia coli* & mediul de creștere prin aplicarea PCA, unde Ec - *Escherichia coli*, G – mediul de creștere, D1 – Ziua 1, D2 – Ziua 2, D3 - Ziua 3; C3.....C7 – detectori. Fiecare punct reprezintă răspunsul asociat unui detector individual provenit de la 10 culturi de bacterii din care probele au fost luate în triplicat. [Rațiu et al, 2012]

- **în modul negativ de operare**, la fel ca în modul pozitiv, s-au remarcat diferențieri între probele prelevate la diferiți timpi de incubare. Prin urmare, punctele corespunzătoare

probelor recoltate după 48 de ore de incubare au fost întâlnite în CI, clusterii proveniți de la eșantioanele preluate după 72 de ore de incubare s-au grupat în CII, în timp ce punctele corespunzătoare eșantioanelor luate în prima zi au fost întâlnite în CIII.

În ceea ce privește **probele blank**, punctele corespunzătoare eșantioanelor prelevate după diferiți timpi de incubare **s-au menținut separate unele față de altele** și au fost grupate similar atât pentru modul pozitiv, cât și pentru modul negativ de operare.

În cele ce urmează, vom expune câteva concluzii finale referitoare la **diferențierea în funcție de timpul de incubare** a celor trei specii de bacterii monitorizate (*Bacillus subtilis*, *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli*), dar și a probelor blank corespunzătoare acestora.

Concluziile care se desprind sunt următoarele:

- Aparatul folosit (**ChemPro100i IMS**) **percepe diferențe între mediile de creștere** (probele blank) ale celor trei specii de bacterii **prelevate la diferiți timpi de incubare** atât pentru modul de operare pozitiv cât și pentru modul de operare negativ.
- Analizând specia *Bacillus subtilis*:
 - în **modul pozitiv de operare**, s-a observat **diferențierea între clusterii** proveniți **de la probele prelevate în cea de-a treia zi**, care au apărut grupați separat față de clusterii rezultați de la probele preluate în primele două zile, între care nu s-a observat însă o discriminare foarte bună;
 - în **modul negativ de operare** s-a evidențiat **gruparea** punctelor corespunzătoare **probelor recoltate în prima zi** și, separat, au fost observate punctele echivalente celorlalte două zile grupate împreună, fără a se percepe diferențe între ele.
- Referitor la specia *Staphilococcus aureus*:
 - în **modul pozitiv de operare** s-au putut **diferenția probele prelevate în prima zi**, față de probele prelevate în celelalte două zile, care au apărut, însă grupate împreună;
 - în **modul negativ de operare**, testele statistice au evidențiat **discriminare** doar **între eșantioanele recoltate în cea de-a doua zi**, care au apărut grupate separat față de cele prelevate în prima și a treia zi.
- Discutând despre specia *Escherichia coli*, s-au evidențiat următoarele:

- atât în modul de operare pozitiv, cât și în modul de operare negativ au fost observate diferențe între punctele corespunzătoare probelor prelevate la diferiți timpi de incubare, care au apărut separate unele față de altele.
- Canalele/detectorii C1 și C2, corespunzătoare în principal semnalului ionilor reactanți NU au prezentat răspunsuri semnificative, după cum de altfel ne așteptam, acestea fiind îndepărtate din graficele punctelor, pentru a se evita aglomerarea acestora.

În altă ordine de idei, concluzionăm în final că utilizând softul SPSS, mai exact aplicând metoda „Principal Components Analysis” (PCA) probelor analizate cu un Spectrometru de Mobilitate Ionică cu câmp electric transversal **EnviroNics IMS** s-au putut observa **diferențe între probele blank** prelevate la diferiți timpi de incubare (mai exact între eșantioane recoltate după 24, 48 și 72 de ore de incubare). De asemenea, aparatul a sesizat **discriminare între toate cele trei zile** (cei trei timpi de incubare) când a fost vorba despre probele care au avut incubată specia *Escherichia coli*, în timp ce pentru celelalte două specii monitorizate, *Bacillus subtilis* și *Staphylococcus aureus* a fost evidențiată **discriminare** clară doar **între două** din cele trei zile.

Evaluarea comparativă a compușilor chimici *specifici* și a compușilor chimici *comuni* celor trei specii de bacterii monitorizate

Utilizând ca metodă de confirmare/validare datele obținute în urma analizei GC/MS (gaz-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă) și procesate ulterior cu ajutorul software-ului Analyzer Pro și a bazei de date NIST (*National Institute for Science and Technology*) s-au identificat o serie de compuși chimici. Profilul probelor de aer headspace observat, care a fost foarte complex, a evidențiat atât prezența aceleiași substanțe chimice în toate cele trei zile în care s-a efectuat monitorizarea, cât și apariția diverselor substanțe chimice într-una sau două din zilele în care s-au prelevat probe, însă, cel mai des s-au întâlnit substanțe chimice identice pentru probe prelevate în condiții similare (eșantioane care inoculau aceeași specie bacteriană, timpi de incubare identici).

Prin urmare, s-au identificat patru substanțe chimice caracteristice bacteriei *Bacillus subtilis*, și câte doi compuși chimici specifici bacteriilor *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*. În același timp s-au găsit și compuși comuni celor trei specii analizate (cum ar fi disulfura de dimetil, care a fost întâlnită în toate probele analizate, însă n-a fost găsită în blank-urile aferente probelor prelevate) și chimicale comune pentru două din cele trei specii monitorizate (spre exemplu,

triclorometanul a fost comun probelor în care s-au inoculat speciile *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* în timp ce toluenul a fost găsit atât în probele care au avut incubată bacteria *Bacillus subtilis* cât și în probele care găzduiau *Staphylococcus aureus*). [Rațiu et al, 2011].

Tabelul 6 Compuși chimici caracteristici pentru fiecare specie de bacterii monitorizate

Compuși specifici pentru <i>Bacillus subtilis</i>		Compuși specifici pentru <i>Escherichia coli</i>		Compuși specifici pentru <i>Staphylococcus aureus</i>	
Compus	RI	Compus	RI	Compus	RI
4-Penten-2-ol, 2-metil	799	Guanidină	799	Acid propanoic 2-hidroxi-2-metil-, metil ester	800
Heptan 3-etil-5-metil-	825	Citrazinic triTMS	1122	Acetamidoacetaldehida	804
Fenilglioxal	942				
Trisulfură de dimetil	946				

Am considerat substanțele chimice întâlnite în toate cele trei zile în care s-a efectuat monitorizarea, la aceiași timpi de retenție ca fiind compuși caracteristici fiecărei dintre cele trei specii. Aceștia sunt indicați atât în Tabelul 6 (cu indicii de retenție RI aferenți), cât și în Figurile 23, 24, 25 – unde este prezentată ca exemplu câte o substanță considerată specifică pentru fiecare specie bacteriană monitorizată și unde este prezentat spectrul de masă al fiecărui compus chimic întâlnit în probele headspace asociat unei anumite substanțe prin comparație cu spectrul de masă aferent substanței respective găsit în baza de date. Compușii siloxani prezenți în probe apar în mod firesc în toate probele prelevate în tuburi de tip Tenax - Carbotrap, ei fiind rezultați din procesul de desorbție a tuburilor. Aceștia nu au fost considerați ca fiind compuși specifici bacteriilor.

Analizând Tabelul 6 remarcăm următoarele aspecte:

- 4-Penten-2-ol, 2-metil, Heptan 3-etil-5-metilen-, Fenilglioxal, Trisulfura de dimetil sunt considerați compuși caracteristici speciei *Bacillus subtilis*, fiind evidențiați la indicii de retenție care pot fi urmăriți în Tabelul 6.
- Citrazinic triTMS și Guanidina au fost întâlniți în probele în care a fost incubată bacteria *Escherichia coli* la indicii de retenție care pot fi observați în Tabelul 6.
- Acid propanoic 2-hidroxi-2-metil-, metil ester și Acetamidoacetaldehida (Tabelul 6) i-am considerat specifici pentru *Staphylococcus aureus*. Ei au apărut în toate probele care găzduiau acest stafilococ.

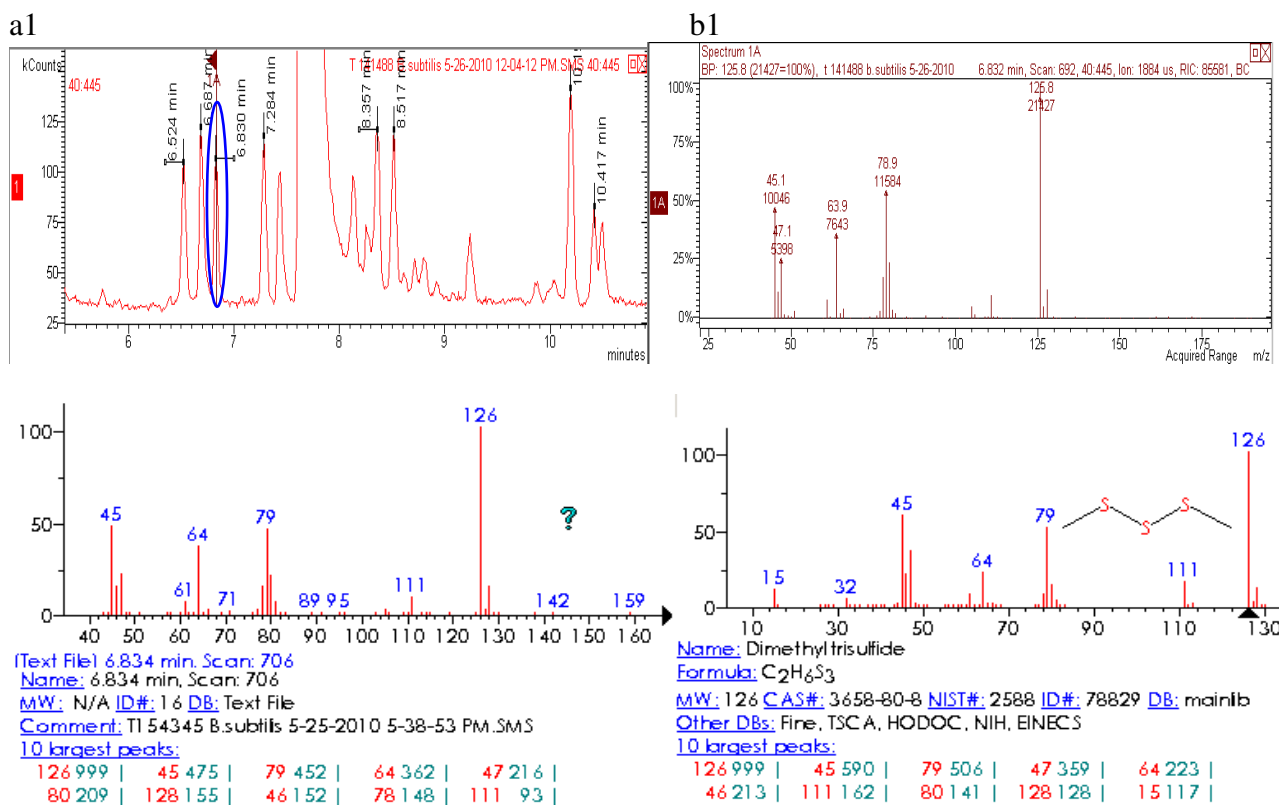


Figura 23. Evidențierea disulfurii de dimetil ca și compus caracteristic speciei *Bacillus subtilis* prin intermediul gazcromatogramei GC (a1) și al spectrului de masă (b1), vizualizate cu ajutorul software-ului instrumentului VARIAN GC-MS și confirmat cu software-ul AnalyzerPro și cu baza de date NIST (partea de jos). [Rațiu et al, 2011]

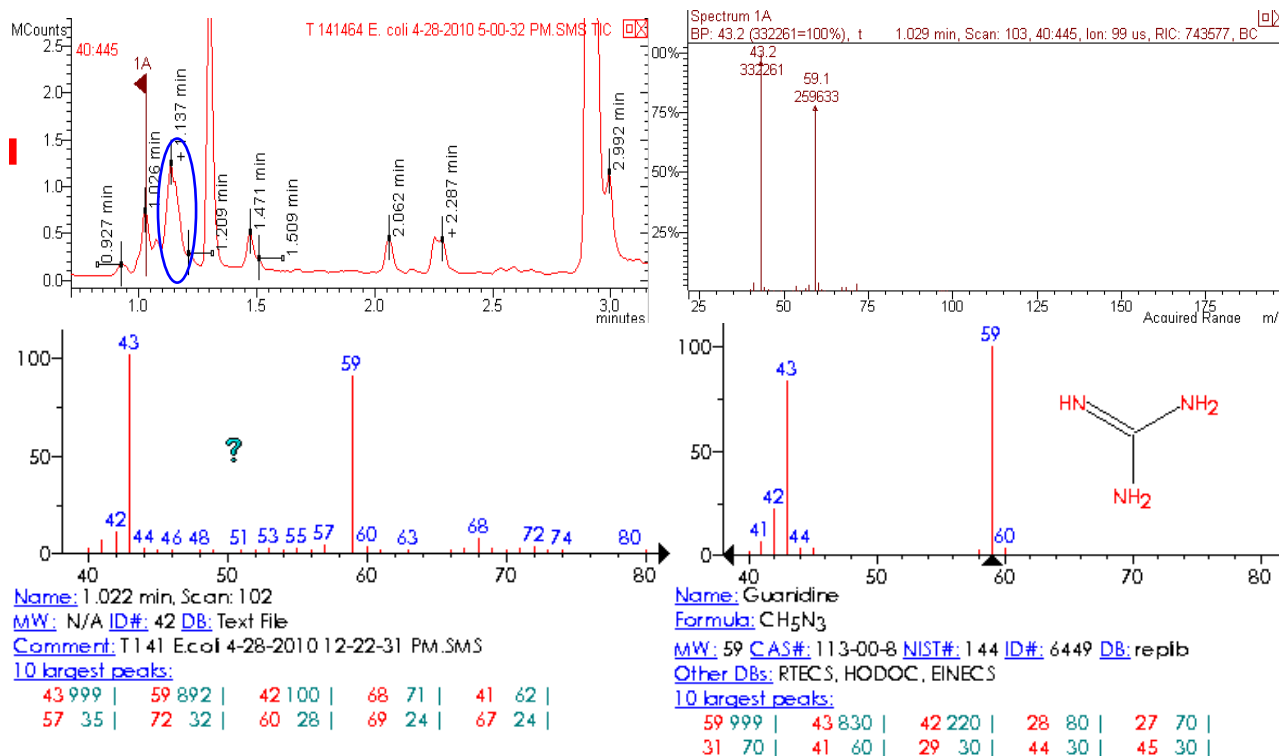


Figura 24. Evidențierea guanidinei ca și compus caracteristic speciei *Escherichia coli* prin intermediul gazcromatogramei GC (a2) și al spectrului de masă (b2), vizualizate cu ajutorul software-ului instrumentului VARIAN GC-MS și confirmat cu software-ul AnalyzerPro și cu baza de date NIST (partea de jos). [Rațiu et al, 2011]

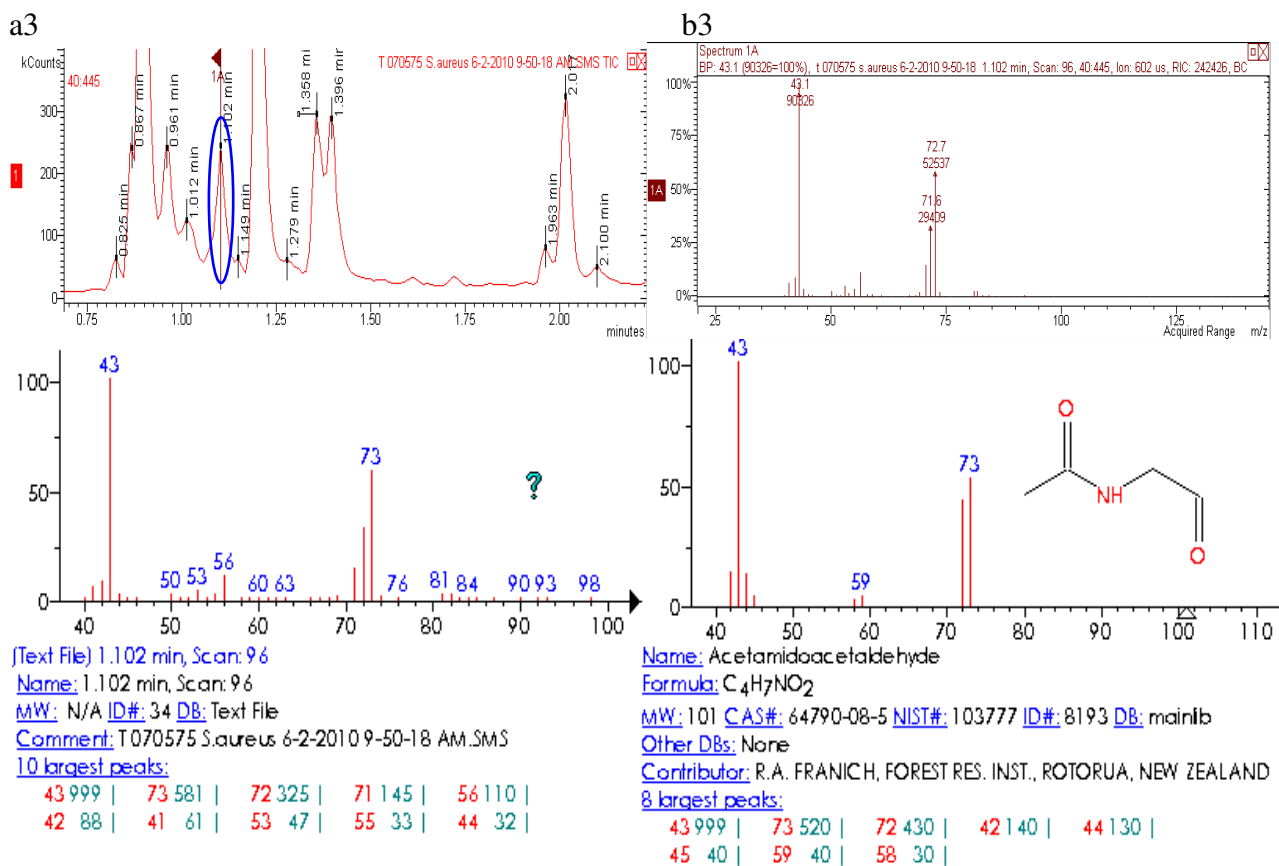


Figura 25. Evidențierea acetamidoacetaldehidei ca și compus caracteristic speciei *Staphylococcus aureus* prin intermediul gazcromatogramei GC (a3) și al spectrului de masă (b3), vizualizate cu ajutorul software-ului instrumentului VARIAN GC-MS și confirmat cu software-ul AnalyzerPro și cu baza de date NIST (partea de jos) [Rațiu et al, 2011].

Pe lângă compușii caracteristici fiecărei specii în parte, s-au evidențiat și compuși chimici comuni celor trei, sau doar la două din cele trei specii de bacterii monitorizate, după cum putem observa în Tabelul 7.

Tabel 7. Compuși chimici comuni pentru speciile de bacterii monitorizate

Compuși comuni specifici bacteriilor <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> și <i>Staphylococcus aureus</i>		Compuși comuni specifici bacteriilor <i>Escherichia coli</i> și <i>Staphylococcus aureus</i>		Compuși comuni specifici bacteriilor <i>Bacillus subtilis</i> și <i>Staphylococcus aureus</i>	
Compus	Timp de retenție	Compus	Timp de retenție	Compus	Timp de retenție
Disulfură de dimetil	827 / 828	Triclorometan	807 / 808	Toluen	833

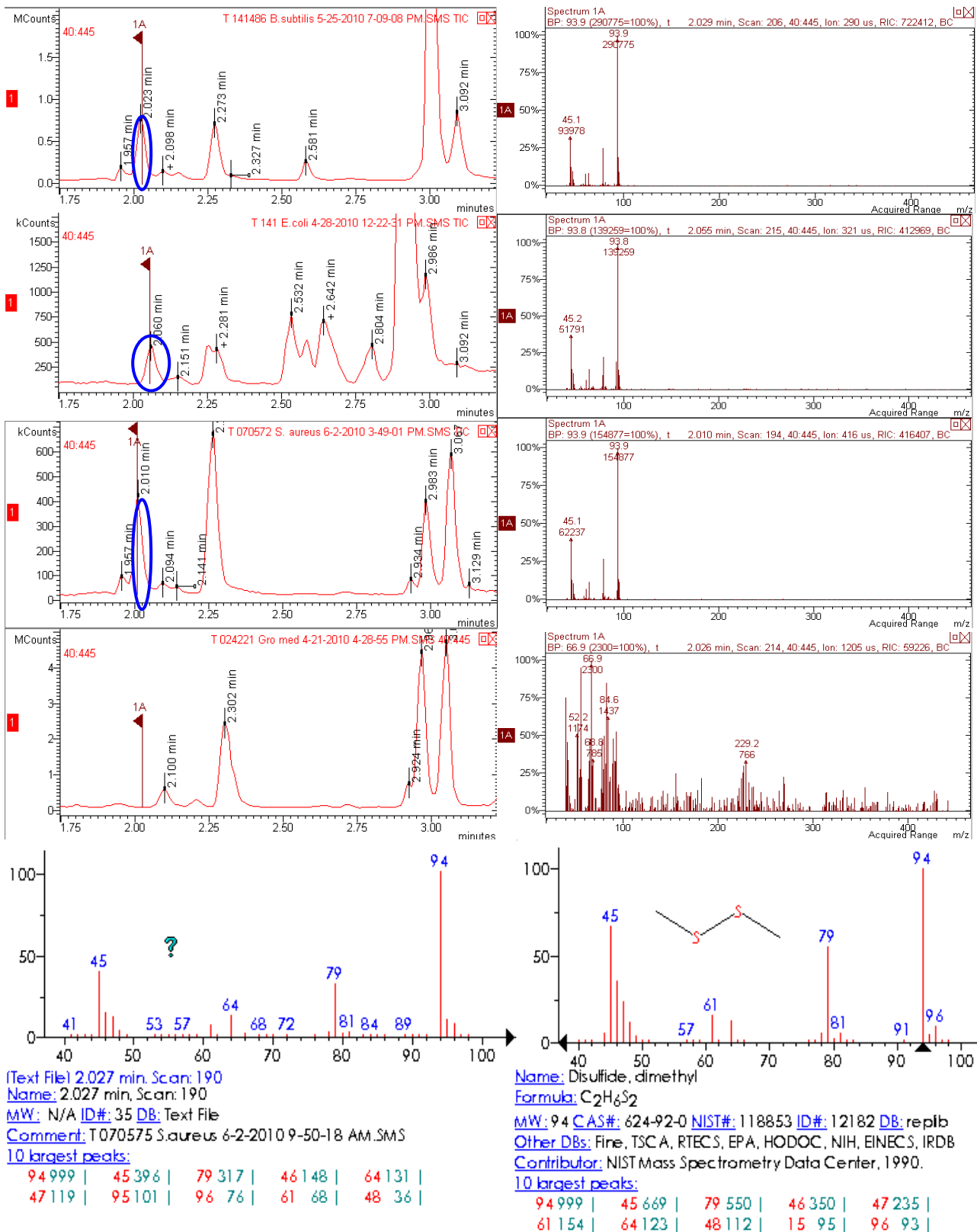


Figura 26. Evidențierea disulfurii de dimetil ca și compus caracteristic speciilor *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* și *Staphylococcus aureus* prin intermediul gazcromatogramei GC (partea stângă) și al spectrului de masă (partea dreaptă), vizualizate cu ajutorul software-ului instrumentului VARIAN GC-MS confirmat cu software-ul AnalyzerPro și cu baza de date NIST (partea de jos). [Raiu et al, 2011].

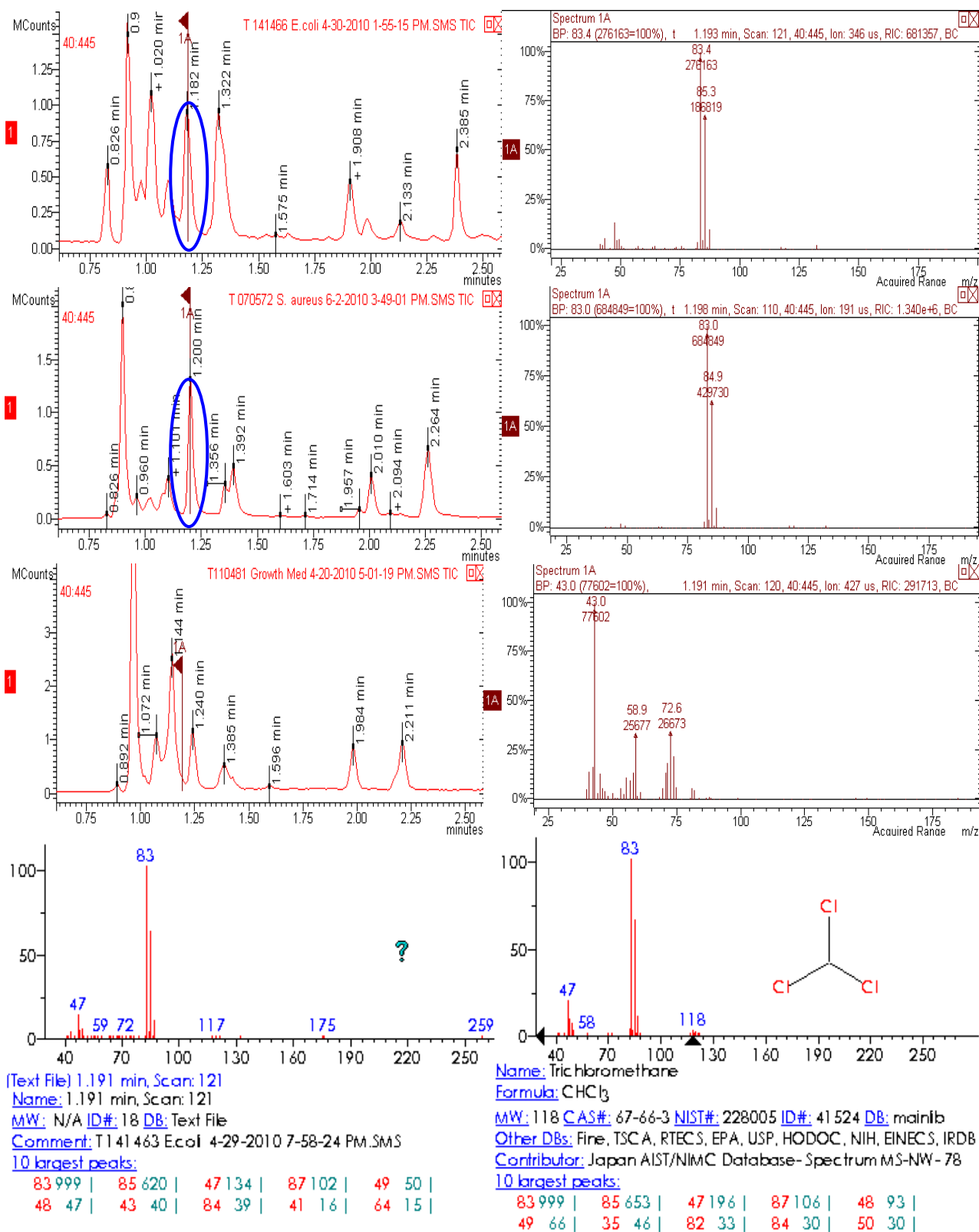


Figura 27. Evidențierea triclorometanului ca și compus caracteristic speciilor *Escherichia coli*, și *Staphylococcus aureus* prin intermediul gazcromatogramei GC (partea stângă) și al spectrului de masă (partea dreaptă), vizualizate cu ajutorul software-ului instrumentului VARIAN GC-MS confirmat cu software-ul AnalyzerPro și cu baza de date NIST (partea de jos) [Rațiu et al, 2011].

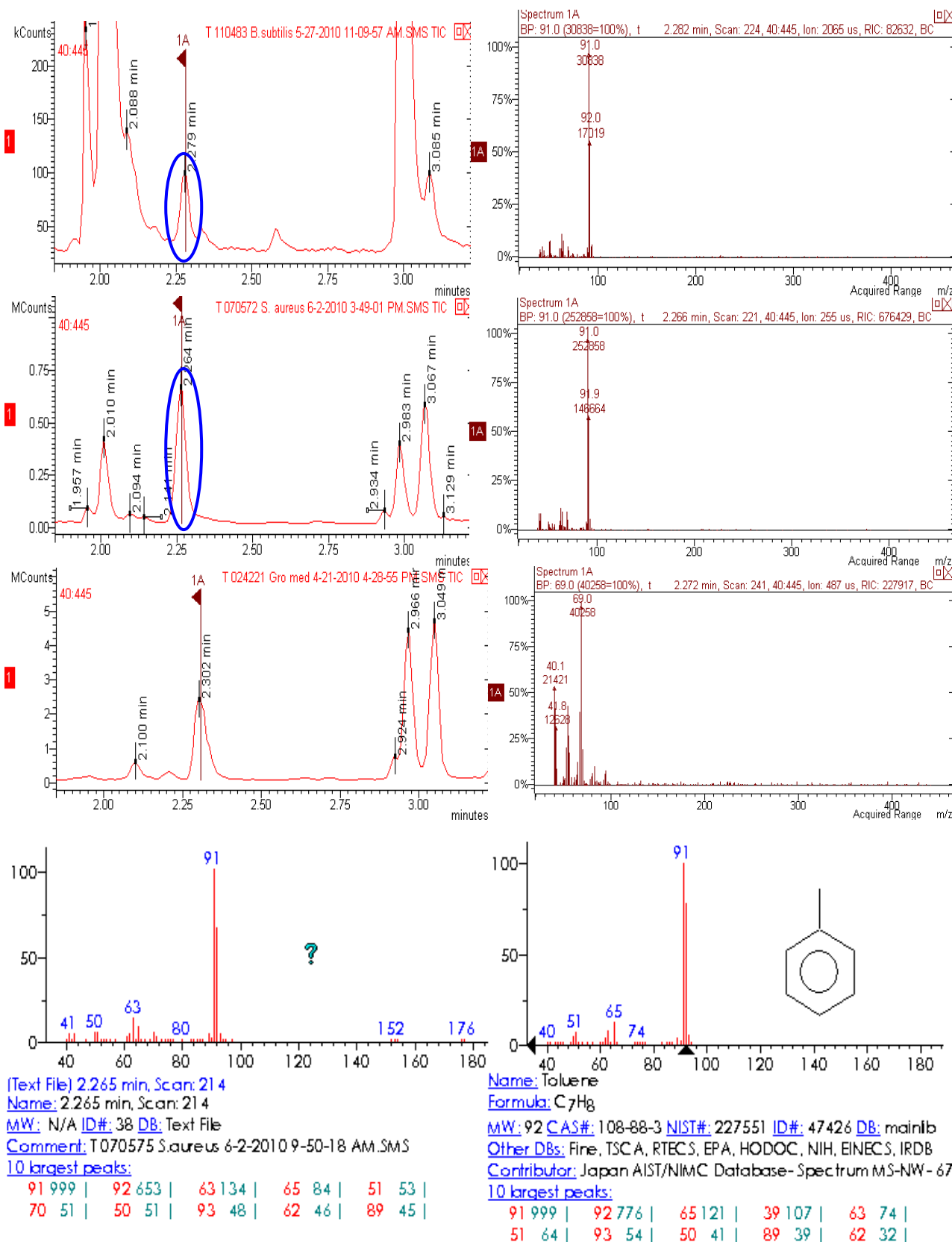


Figura 28. Evidențierea toluenului ca și compus caracteristic speciilor *Escherichia coli*, și *Staphylococcus aureus* prin intermediul gazcromatogramei GC (partea stângă) și al spectrului de masă (partea dreaptă), vizualizate cu ajutorul software-ului instrumentului VARIAN GC-MS confirmat cu software-ul AnalyzerPro și cu baza de date NIST (partea de jos) [Rațiu et al, 2011].

Prin urmare, concluziile care se desprind sunt următoarele:

- Disulfura de dimetil a fost întâlnită în probele care au avut incubate cele trei specii: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* (Tabelul 7) și nu a fost evidențiată în probele fără bacterii (blank), unde a fost prezent doar mediul de creștere, după cum demonstrează Figura 26, motiv pentru care această substanță a fost considerată comună pentru cele trei specii de bacterii studiate.
- Eșantioanele care au avut inoculate speciile *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* au avut ca și compus comun triclorometanul, apărut la timpii de retenție care se remarcă în Tabelul 7. Triclorometanul nu a fost prezent în probele blank, fapt dovedit de asemenea de Figura 27.
- Toluenul a putut fi decelat în probele cu *Bacillus subtilis* și *Staphylococcus aureus* (Tabelul 7), el nefiind prezent în probele care conțineau doar mediul de cultură, după cum arată Figura 28.

4. Concluzii

Metodele analitice instrumentale sau microbiologice sunt folosite pentru a exploata o proprietate bine stabilită a analitului. Astfel, s-a utilizat proprietatea o-nitrofenolului de a avea o presiune de vapori relativ mare, ceea ce permite analiza directă a acestor vapori folosind Spectrometria de Mobilitate Ionică. În acest mod, prin detectarea o-NP dispunem de un algoritm de detecție a bacteriilor sensibil, relativ compact și simplu.

Ca la orice tehnică analitică, utilitatea Spectrometriei de Mobilitate Ionică pentru o aplicație particulară trebuie să fie abordată strict pe o bază individuală. Factorii ce trebuie luați în considerare includ limitele de detecție, timpul de răspuns, interferențele matricii, costul, timpul de calibrare, portabilitatea, etc.

Sistemele de introducere a probelor sunt esențiale pentru IMS, în special dacă analiții nu sunt în întregime extrași din probă, sau dacă sunt transferați mai multor aparate cuplate între ele. Sistemele de introducere a probelor se utilizează, astfel, în funcție de diferite caracteristici ale aparaturii dar, mai ales, de starea de agregare a probei utilizate.

Aplicațiile bio-medicale și farmaceutice se bazează pe proprietatea vaporilor odorizanți proveniți din procese metabolice de a reflecta bolile persoanei de la care provin. Astfel, metaboliții întâlniți în aerul expirat pot fi direct corelați cu existența diferitelor boli. Unii metaboliți sunt biomarkeri, spre exemplu acetona apare în cazul diabeticii, acidul azotic este corelat cu afecțiuni astmatice, amoniacul denotă existența unor probleme hepatice, în timp ce alții indică prezența unor bacterii.

Utilizându-se Spectrometria de Mobilitate Ionică au putut fi detectate eficient și rapid diverse tipuri de infecții vaginale, s-a realizat cu succes detecția, identificarea și monitorizarea unor compuși volatili utilizați ca anestezici inhalanți în timpul operațiilor și s-au diagnosticat direct afecțiuni pulmonare, dintr-o simplă probă de respirație umană preluată.

Aparatura portabilă, limitele joase de detecție, răspunsul în timp real și ușurința cu care se poate folosi instrumentația IMS, permit monitorizarea și asigurarea calității produselor farmaceutice, dar și asigurarea sănătății și siguranței angajaților companiilor farmaceutice.

Există două metode principale de detecție a markerilor biologici prin tehnicile Spectrometriei de Mobilitate Ionică, respectiv: detecția microorganismelor cu ajutorul markerilor produși prin procese enzimatică și detecția microorganismelor cu ajutorul markerilor produși prin piroliză.

Pentru detecția microorganismelor cu ajutorul markerilor produși prin procese enzimatică, există de asemenea două alternative: se poate utiliza un substrat de creștere, căruia i se adaugă în mod intenționat un anumit nutrient, care fiind metabolizat va produce o substanță chimică cunoscută și detectabilă cu ajutorul aparatului utilizat, sau pot fi monitorizați în mod direct compuși organici volatili generați în atmosfere headspace.

Detecția microorganismelor cu ajutorul markerilor produși prin piroliză funcționează pe principiul degradării termice rapide (piroliză), care are loc înainte ca ionii să fie separați și detectați în spectrometrul de mobilitate ionică. Astfel, piroliza poate fi utilizată cu succes pentru a clasifica sau identifica bacterii cu ajutorul markerilor generați – spre exemplu, piridina, acidul picolinic, acidul dipicolinic, acizi grași și esterii metilici ai acizilor grași.

Au existat și tentative de a obține rezultate similare prin introducerea bacteriilor întregi în pirolizator, rezultatele fiind însă relativ controversate.

Pentru prezentul proiect de cercetare au fost prelevate probe de bacterii din atmosfera headspace la diferiți timpi de incubare, respectiv după 24, 48 și 72 de ore, obținându-se astfel pentru fiecare cultură de bacterii două seturi de date, provenite de la cele două aparate cu care s-a lucrat: Gaz-Cromatograf cuplat cu Spectrometru de Masă (GC/MS) și, independent de acest lanț instrumental, cu un Spectrometru de Mobilitate Ionică cu câmp electric transversal (Enviroics

IMS). Atât pentru probele analizate cu sistemul GC/MS, cât și pentru cele analizate cu Environics IMS s-a lucrat cu aceleași culturi de bacterii, probele fiind prelevate după același timp de la începerea incubării.

Prin analiza directă a probelor de aer headspace de deasupra culturilor bacteriene, urmată de procesarea datelor obținute cu ajutorul instrumentului Environics IMS, s-a putut remarca diferențiere între:

- probele care conțineau bacterii și cele care au avut incubat doar mediul de creștere (agar);
- probele care conțineau diferite specii de bacterii;
- probele care au avut inoculate aceleași specii de bacterii, dar au fost prelevate după diferiți timpi de incubare.

Utilizând datele de la GC-MS ca metodă de confirmare/ validare, s-a observat că profilul probelor de aer headspace a fost foarte complex. Cu toate acestea s-a evidențiat atât prezența aceleiași substanțe chimice în toate cele trei zile în care s-a efectuat monitorizarea, cât și apariția diverselor substanțe chimice într-una sau două din zilele în care s-au prelevat probe, însă, cel mai des s-au întâlnit substanțe chimice identice pentru probe prelevate în condiții similare (eșantioane care inoculau aceeași specie bacteriană, timpi de incubare identici). Prin urmare, s-au identificat patru substanțe chimice caracteristice bacteriei *Bacillus subtilis*, și câte doi compuși chimici specifici bacteriilor *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*. În același timp s-au găsit și compuși comuni celor trei specii analizate și chimicale comune pentru două din cele trei specii monitorizate.

Rezultatele obținute de noi sunt în acord cu cele publicate de grupuri de cercetători din Finlanda, care s-au concentrat asupra diferențierii probelor de aer ce conțin compuși organici volatili de la mucegaiurile din clădiri [Räsänen et al, 2010], respectiv din Germania, care s-au focalizat asupra metaboliților produși de mucegaiuri [Tiebe et al, 2010].

Potențiale direcții de cercetare:

1. Investigarea unui număr extins de specii de microorganisme.
2. Utilizarea de substraturi enzimatică care să producă analiți-țintă volatili, capabili să genereze răspunsuri puternice și selective în IMS.
3. Investigarea simultană, în paralel, a profilelor chimice produse de diverse specii de microorganisme, utilizându-se diverse tipuri de instrumentație IMS: (a) IMS tradițională (tip time-of-flight); (b) IMS cu aspirație (câmp transversal); (c) spectrometre DMS (Differential Mobility Spectrometry); (d) sisteme tandem, cum sunt GC-IMS sau GC-DMS.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Bocoș-Bințișan, V.; „*Tehnici moderne în analiza de ultraurme, cu impact în igiena industrială, protecția mediului și aplicații de securitate*”, Editura Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca, 2004.
2. Peter-Snyder, A.; Shoff, Donald B.; Eiceman, G.A.; Blyth, D.A.; Parsons, J.A., „*Detection of bacteria by ion mobility spectrometry*”, *Analytical Chemistry*, 1991, 63(5), 526-529.
3. Strachan, N.J.C.; Nicholson, F.J.; Ogden, I.D., „*An automated sampling system using ion mobility spectrometry for the rapid detection of bacteria*”, *Analytica Chimica Acta*, 1995, 313, 63-67.
4. Peter-Snyder, A.; Miller, M.; Shoff, D.A.; Eiceman, G.A.; Blyth, D.A.; Parsons, J.A., „*Enzyme-substrate assay for the qualitative detection of microorganisms by ion mobility spectrometry*”, *Journal of Microbiological Methods*, 1991, 14, 21-32.
5. Smith, G.B.; Eiceman, G.A.; Walsh, M.K.; Critz, S.A.; Andazola, E.; Ortega, E.; Cadena, F., „*Detection of Salmonella typhimurium by hand-held ion mobility spectrometer: a quantitative assessment of response characteristics*”, *Field Analytical Chemistry and Technology*, 1997, 1(4), 213-226.
6. Creaser, C.S.; Griffiths, J.R.; Bramwell, C.J.; Noreen, S.; Hill, C.A.; Thomas, C.L.P.; „*Ion mobility spectrometry: a review. Part 1. Structural analysis by mobility measurement*”, *Analyst*, 2004, 11, 984-994.
7. Eiceman, G.A., „*Ion Mobility Spectrometry as a Fast Monitor of Chemical Composition*”, *Trends in Analytical Chemistry*, 2002, 21(4), 259-274.
8. Arce, L.; Menendez, M.; Garrido-Delgado, R.; Valcarcel, M., „*Sample introduction systems coupled to ion-mobility spectrometry equipment for determining compounds present in gaseous, liquid and solid samples*”, *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27(2), 139-150.
9. Borsdorf, H.; Eiceman, G.A., „*Ion Mobility Spectrometry: Principles and Applications*”, *Applied Spectroscopy Reviews*, 2006, 41, 323-375.
10. Przybylko, A.R.M.; Thomas, C.L.P.; Anstice, P.J.; Fielden, P.R.; Brokenshire, J.; Irons, F., „*The determination of aqueous ammonia by ion mobility spectrometry*”, *Analytica Chimica Acta*, 1995, 311, 77-83.
11. Baumbach, J.I.; Sielemann, S.; Xie, Z.Y.; Schmidt, H., „*Detection of the gasoline components methyl tert-butyl ether, benzene, toluene, and m-xylene using ion mobility spectrometers with a radioactive and UV ionization source*”, *Analytical Chemistry*, 2003, 75(6), 1483-1490.
12. Rearden, P.; Harrington, P.B., „*Rapid screening of precursor and degradation products of chemical warfare agents in soil by solid-phase microextraction ion mobility spectrometry (SPME-IMS)*”, *Analytica Chimica Acta*, 2005, 545(1), 13-20.

13. Liu, X.; Nacson, S.; Grigoriev, A.; Lynds, P.; Pawliszyn, J., „*A new thermal desorption solid-phase microextraction system for hand-held ion mobility spectrometry*”, *Analytica Chimica Acta*, 2006, 559, 159-165.
14. Eiceman, G.A.; Karpas, Z., „*Ion Mobility Spectrometry*”, CRC Press (Taylor & Francis), 2005.
15. Karpas, Z.; Chaim, W.; Gdalevsky, R.; Tilman, B.; Lorber, A., „*Novel application for ion mobility spectrometry: diagnosing vaginal infections through measurement of biogenic amines*”, *Analytica Chimica Acta*, 2002, 474, 115–123.
16. Baumbach, J.I., „*Process analysis using ion mobility spectrometry*”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 384(5), 1059-1070.
17. O’Donnell, Ryan M.; Sun, Xiaobo; Harrington, Peter de B., „*Pharmaceutical applications of ion mobility spectrometry*”, *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27, 1.
18. Peterson, D.E.; Eden, G.C.; Apodaca, C.R.; Argyres, D.P.; Kennedy, A.L.; Barnhill, J.G.; Felton, L.A., „*Ion mobility spectrometry for determination of active drug in blinded dosage forms*”, *AAPS News Magazine*, 2005, 18-19.
19. Vautz, W.; Baumbach, J.I., „*Analysis of Bio-Processes using Ion Mobility Spectrometry*”, *Engineering in Life Sciences*, 2008, 8(1), 19-25.
20. Prasad, S.; Pierce, K.M.; Schmidt, H.; Rao, J.V.; Guth, R.; Synovec, R.E.; Smith, G.B.; Eiceman, G.A., „*Constituents with independence from growth temperature for bacteria using pyrolysis-gas chromatography/differential mobility spectrometry with analysis of variance and Principal Components Analysis*”, *Analyst*, 2008, 133(6), 760-767.
21. Prasad, S.; Pierce, K.M.; Schmidt, H.; Rao, J.V.; Guth, R.; Bader, S.; Synovec, R.E.; Smith, G.B.; Eiceman, G.A., „*Analysis of bacteria by pyrolysis gas chromatography-differential mobility spectrometry and isolation of chemical components with a dependence on growth temperature*”, *Analyst* 2007, 132(10), 1031-1039.
22. Prasad, S.; Schmidt, H.; Lampen, P.; Wang, M.; Guth, R.; Rao, J.V.; Smith, G.B.; Eiceman, G.A., „*Analysis of bacterial strains with pyrolysis-gas chromatography/differential mobility spectrometry*”, *Analyst*, 2006, 131(11), 1216-1225.
23. Schmidt, H.; Tadjimukhamedov, F.; Mohrenz, I.V.; Smith, G.B.; Eiceman, G.A., „*Microfabricated differential mobility spectrometry with pyrolysis gas chromatography for chemical characterization of bacteria*”, *Analytical Chemistry*, 2004, 76(17), 5208-5217.
24. Bocoş-BinţiŃan, V.; RaŃiu, Ileana-Andreea, „*Detection of Some Bacterial Markers by Ion Mobility Spectrometry - Preliminary Investigations*”, *Environment and Progress*, no. 13 / 2009; Roşu, Cristina; Costin, Dan; Ozunu, Alexandru (editors), Editura FundaŃia pentru Studii Europene (EFES), Cluj-Napoca, ISSN 1584-6733, cod CNCSIS 697/2006, 2009, pp. 49-58.
25. Räsänen, R.M.; Håkansson, M.; Viljanen, M., „*Differentiation of air samples with and without microbial volatile organic compounds by aspiration ion mobility spectrometry and semiconductor sensors*”, *Building and Environment*, 2010, 45, 2184-2191.

- 26.** Moll, V.H., „*Control and calibration of dopant chemistries in ion mobility systems using piezoelectric actuators*”, PhD Thesis, University of Loughborough, Loughborough, UK, 2011.
- 27.** Moll, V.H.; Bocos-Bintintan, V.; Chappell, J.; Hutt, D.; **Ratiu, Ileana-Andreea**; Thomas, C.L.P., „*Optimisation of piezoelectric injection of dopants and drift gas modifiers in transverse ion mobility spectrometry*”, International Journal for Ion Mobility Spectrometry, 2010, 13(4), 149-155.
- 28.** Huo, R.; Agapiou, A.; Bocos-Bintintan, V.; Brown, L.J.; Burns, C.; Creaser, C.S.; Devenport, N.A.; Gao-Lao, B.; Guallar-Hoyas, C.; Hildebrand, L.; Malkar, A.; Martin, H.J.; Moll, V.H.; Patel, P.; **Ratiu, Andreea**; Reynolds, J.C.; Sielemann, S.; Slodzynski, R.; Statheropoulos, M.; Turner, M.A.; Vautz, W.; Wright, V.E.; Thomas, C.L.P., „*The Trapped Human Experiment*”, Journal of Breath Research, 2011, Vol. 5, No. 4, pp. 1-12. [DOI: 10.1088/1752-7155/5/4/046006]. Impact factor: 1.828.
- 29.** Moll, V.H.; Bocos-Bintintan, V.; Huo, R.; **Ratiu, Ileana-Andreea**; Guallar-Hoyas, C.; Anttalainen, O.; Thomas, C.L.P.: „*Developing ion mobility spectrometric methods for use in trapped human simulation experiment*”. Presented at The 19th International Conference on Ion Mobility Spectrometry ISIMS 2010, Albuquerque, New Mexico, USA, 18th – 23th July 2010.
- 30.** Huo, R.; Agapiou, A.; Bocos-Bintintan, V.; Brown, L.; Burns, C.; Creaser, C.S.; Devenport, N.; Guallar-Hoyas, C.; Hildebrand, L.; Malkar, A.; Martin, H.; Moll, V.H.; Patel, P.; **Ratiu, Ileana-Andreea**; Reynolds, J.C.; Sielemann, S.; Slodzynski, R.; Statheropoulos, M.; Turner, M.; Vautz, W.; Wright, V.; Thomas, C.L.P. „*The Trapped Human Experiment*”. Presented at The 20th International Conference on Ion Mobility Spectrometry ISIMS 2011, Edinburgh, Scotland, United Kingdom, 24th – 29th July 2011 (Scientific communication – 28.07.2011).
- 31.** **Ratiu, Ileana-Andreea**; Bocoş-BinţiŃan, Victor; Moll, Victor Hugo; Turner, Matthew; Burns, Corrinne; Cosma, Constantin; Thomas, C.L. Paul: „*Characterization of some chemicals, possible bacterial markers, from culture headspace air samples using TD-GC-MS*”. Presented at The 17th International Symposium on Separation Sciences ISSS 2011, Cluj-Napoca, Romania, September 5-9 2011 (Communication OP-9, Thursday 08.09.2011).
- 32.** **Ratiu, Ileana-Andreea**; Bocoş-BinţiŃan, Victor; Moll, Victor Hugo; Turner, Matthew; Burns, Corrinne; Cosma, Constantin; Thomas, C.L. Paul, „*Characterization of possible bacterial markers, from culture headspace air samples using TD-GC-MS*”. Chromatographia – SUBMITTED, Nov. 2011.
- 33.** **Ratiu, Ileana-Andreea**; Bocos-Bintintan, V.; Moll, V.H.; Turner, M.A.; Thomas, C.L.P., „*Fast detection and discrimination of different microorganism strains using an Environics ChemPro-100i aspiration ion mobility spectrometer*” - manuscript in preparation.
- 34.** Moll, V.; Bocos-Bintintan, V.; **Ratiu, Ileana-Andreea**; Ruszkiewicz, D.; Thomas, C.L.P., „*Control of Dopant Chemistry in Differential Mobility Spectrometry using a Piezoelectric Injector*”, Analyst – Submitted on 15 Nov. 2011.