

ANALÝZA FOSFOLIPIDOVÝCH BIOMARKERŮ PLYNOVOU CHROMATOGRAPHIÍ

STANISLAV OPLUŠTIL^{a*}, DAVID CHRASTINA^a, MARTIN RULÍK^b, PETR BARTÁK^a, PETR BEDNÁŘ^a a LUBOMÍR ČÁP^a

^a Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Třída Svobody 8, 771 46 Olomouc, ^b Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
s.oplustil@post.cz

Došlo 16.6.06, přepracováno 8.1.07, přijato 22.1.07.

Klíčová slova: fosfolipidy, lipidy, etherové lipidy, biomarkery, plynová chromatografie

Úvod

Biologické membrány jsou předmětem velkého zájmu badatelů, jelikož jsou s nimi úzce spjaté mnohé životně důležité procesy, jako je transport látek, transformace energie, regulace metabolismu, koordinace biologických procesů či buněčná diferenciací.

Během evoluce se každý živý systém vyvíjel a přizpůsoboval změnám a existenci v novém prostředí. U buněčných membrán docházelo během tohoto procesu nejen k velkým strukturním změnám, ale i k významným změnám jejich funkce.

Viditelné znaky přizpůsobení se organismu nehostinným a často extrémním podmínkám prostředí je možné pozorovat u archaebakterií (Archaea). Extrémní teploty a hodnoty pH, vysoké koncentrace solí nebo striktně anaerobní prostředí byly nesporně důvodem k tomu, že tyto organismy jsou vybavené nezbytnými komponentami a jedinečnými biologickými procesy. Jedním z nejdůležitějších biochemických rysů archaebakterií je kromě jiného také unikátní lipidové složení a z toho odvozená specifická struktura membrány, což také slouží jako hlavní chemotaxonomický znak této skupiny mikroorganismů.

Studium archaebakteriálních membrán otvírá nové a doposud nevyřešené problémy membranologie. Můžeme předpokládat, že zavedení metod molekulární biologie, které zatím u Archaea nejsou příliš aplikovány, přinese

mnohé významné objevy z teoretického, ale i praktického hlediska.

Sedimenty rybníčního a říčního dna jsou významným místem, kde se často kumulují po různě dlouhou dobu organické látky a kde můžeme očekávat přítomnost řady mikroorganismů včetně zástupců říše Archaea.

Analýza fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) je jednou z nejmodernějších biochemických metod, kterou lze využít k popisu a charakterizaci mikrobiálních společenstev. Mastné kyseliny poskytují informace jednak o všeobecné struktuře aktivních mikrobiálních společenstev a jednak také o biomase určitých skupin mikroorganismů^{1,2}.

Fosfolipidy nejsou zásobními látkami, v živých buňkách je jejich množství přibližně konstantní; po smrti buňky se velice rychle odbourávají. Z toho důvodu dobře určují velikost biomasy živých buněk. Analýza celkové biomasy je relativně jednoduchá a je založena na izolaci fosfolipidové frakce a kolorimetrickém stanovení fosforu³ nebo na stanovení nespecifických mastných kyselin (kyselina palmitová)⁴.

Některé mastné kyseliny jsou naopak velmi specifické pro určitou skupinu organismů, pro určitý rod nebo dokonce druh. Doposud je známa celá řada různých specifických biomarkerů a jejich počet neustále stoupá v souvislosti s pokračujícím mikrobiologickým výzkumem. Například větvené a cyklické mastné kyseliny se vyskytují převážně v bakteriích a výskyt těchto mastných kyselin bývá spojován s bakteriální aktivitou⁵. Nenasycené cyklické mastné kyseliny by mohly být potenciálními biomarkery bakterií rodu *Clostridium* včetně mezofilních, termofilních a psychrofilních bakterií⁶.

Archaebakterie se liší od ostatních bakterií obsahem unikátní skupiny tzv. etherových lipidů, ve kterých jsou uhlovodíkové řetězce spojeny s glycerolem etherovou vazbou místo esterové⁷. Hlavní lipidy jsou diethery či tetraethery, které jsou velmi odolné k degradaci. Jejich přítomnost v biomembránách snižuje jejich prostupnost pro ionty a protony a umožňuje přežívání archaebakterií v extrémních podmínkách. Polární etherové lipidy tvoří 80–95 % membránových lipidů archaebakterií. Zbývajících 5–20 % tvoří převážně neutrální skvaleny (C₃₀) a jiné isoprenoidy⁸.

Dietherové lipidy archaebakterií jsou schopné vytvářet běžnou lipidovou dvojvrstvu díky interakcím proti sobě orientovaných fytanylových řetězců. Délka fytanylového řetězce je shodná s délkou řetězce mastných kyselin u běžných lipidů bakterií a eukaryot a tak je i celá dvojvrstva podobná běžné fosfolipidové membráně.

Cílem této práce je ověření praktické využitelnosti analýzy lipidových markerů (esterové i etherově vázaných) při charakterizaci reálných vzorků sedimentů a biologických kalů.

* Stanislav Opluštíl se s touto prací úspěšně zúčastnil soutěže O cenu firmy Merck 2006 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

Experimentální část

Přístroje a chemikálie

Měření byla prováděna na plynovém chromatografu HP 6890 s hmotnostním spektrometrem 5973 N MSD (Agilent, Palo Alto, USA). Byla použita nepolární kolona HP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) s teplotním programem 50 °C – 1 min – 10 °C min⁻¹ – 150 °C – 5 °C min⁻¹ – 300 °C – 19 min a heliem jako nosným plynem s průtokem 0,9 ml min⁻¹ (99,998 %, SIAD, Bergamo, Itálie). Rozpouštědla (methanol, hexan, chloroform) a běžné chemikálie (hydroxid draselný, kyselina octová) byly čistoty p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR). Jako standard etherového lipidu byl použit dipalmitylglycerolether (*O,O'*-dihexadecylglycerol) (Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Švédsko).

Analýza esterových lipidů

Běžný postup analýzy fosfolipidových mastných kyselin zahrnuje extrakci lipidů organickými rozpouštědly, frakcionaci a izolaci fosfolipidů chromatografií na silikagelu, transesterifikaci mastných kyselin a analýzu methylesterů plynovou chromatografií⁹.

37 g vlhkého sedimentu (obsah vody do 35 %), 30 ml fosfátového pufru (0,05 mol l⁻¹, pH 7,4), 37,5 ml chloroformu a 75 ml methanolu bylo sonifikováno 20 min v ultrazvukové lázni. Kapalná fáze byla oddělena centrifugací a přenesena do dělicí nálevky. Po přidavku 37,5 ml chloroformu a 37,5 ml redestilované vody byl vzorek protřepáván 20 min a ponechán přes noc.

Spodní organická fáze byla oddělena, zfiltrována přes fritu a odpařena do sucha při teplotě nepřesahující 37 °C. Extrakt byl rozpuštěn v 1 ml chloroformu a přenesen na silikagelové kolonky (Bond Elute-SI, 500 mg, 3 ml) předem promyté 5 ml směsí methanol / chloroform (4:1). Neutrální lipidy a glykolipidy byly postupně vymyty 5 ml chloroformu a 5 ml acetonu. Nakonec byly eluovány fosfolipidy 5 ml methanolu a roztok byl odpařen do sucha. Fosfolipidová frakce byla rozpuštěna v 1 ml směsí toluen / methanol (1:1) a 1 ml methanolickeho roztoku hydroxidu draselného (0,2 mol l⁻¹) a inkubována 15 min při 37 °C. Vzorek byl zneutralizován 0,2 ml kyseliny octové (1 mol l⁻¹), byly přidány 2 ml směsí hexan / chloroform (4:1) a 2 ml destilované vody. Vzorek byl protřepán a organická fáze (horní) byla oddělena. Vodná fáze byla dvakrát extrahována 2 ml směsí hexan / chloroform (4:1). Spojený extrakt byl odpařen na objem 1 ml a analyzován plynovou chromatografií.

Pro označení mastných kyselin byly použity obvyklé zkratky ve formátu: <počet atomů uhlíku> : <počet dvojných vazeb> ω <poloha první násobné vazby od methylového konce řetězce>. Tak například palmitolejová kyselina obsahující 16 uhlíkových atomů a jednu dvojnou vazbu na sedmém uhlíkovém atomu (od CH₃ konce) je označena 16:1ω7. Pro rozvětvené iso- (methylskupina na druhém

uhlíku od CH₃ konce řetězce) a anteiso- (methylskupina na třetím uhlíku od CH₃ konce řetězce) kyseliny a pro cyklické kyseliny odvozené od cyklopropanu bylo použito označení i-, a-, a cy-. Označení 10Me- znamená methylskupinu na desátém atomu uhlíku od karboxylového konce řetězce.

Analýza etherových lipidů

Pro analýzu etherových lipidů byl použit stejný extrakční postup. Směs lipidů (bez frakcionace na silikagelu) byla hydrolyzována 20 ml roztoku hydroxidu draselného (1 g KOH, 4 ml H₂O, 16 ml methanolu) v ultrazvukové lázni (5 min při 25 °C) a ponechána 3 h při 60 °C. Po ochlazení byly etherové lipidy extrahovány třikrát 5 ml směsí hexan / chloroform (4:1) a odpařeny do sucha. Volná hydroxyskupina etherových lipidů byla silylována 250 μl bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem (BSTFA) 12 h při 60 °C, vzorek byl odpařen v proudu dusíku do sucha, rozpuštěn v 1 ml hexanu a analyzován plynovou chromatografií¹⁰.

Výsledky a diskuse

Pro analýzu esterově vázaných mastných kyselin byly fosfolipidy izolované ze vzorků sedimentů transesterifikovány na odpovídající methylestery mastných kyselin a analyzovány plynovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií. Jednotlivé methylestery byly identifikovány na základě elučních (retenční časy) a spektrálních (hmotnostní spektra) dat.

Relativní zastoupení (v %) jednotlivých fosfolipidových mastných kyselin ve vybraných typech sedimentů je uvedeno v tabulce I. Všechny uvedené vzorky jsou charakteristické výrazným zastoupením nasycené kyseliny palmitové (16:0) a nenasycených kyselin palmitolejové (16:1ω7) a olejové (18:1ω9). Tyto kyseliny bývají označovány jako tzv. nespecifické a mohou sloužit jako nespecifické markery biologické kontaminace, např. při hodnocení biofilmu usazeného na vnitřní stěně vodovodního potrubí¹¹. Isomery kyseliny palmitolejové, označené 16:1ω6 a 16:1ω8, jsou považovány za biomarkery methanotrofních bakterií. Jejich významnější zastoupení v „anaerobnějším“ říčním sedimentu odebraném ve stojaté vodě nad jezem odpovídá předpokládané produkci metanu v rezervoáru. Kyselina linolová (18:2ω6) bývá uváděna jako typický biomarker hub. Její vysoký obsah v aktivovaném kalu z čistírny odpadních vod dobře odpovídá předpokládané přítomnosti mikroskopických hub, které jsou běžnou součástí vloček aktivovaného kalu. Vzorek písku z vodárenského filtru je charakteristický mnohem jednodušším profilem mastných kyselin. Tento fakt je v dobrém souladu s předpokládanou nepatrnou bakteriální kontaminací surové podzemní vody. Odhady počtu mikrobiálních buněk ve vzorku písku z vodárenského filtru (~10⁶ buněk/g sušiny při použití konverzního faktoru 0,5 fmol fosfolipidu na buňku) jsou o jeden až dva řády nižší než odpovídající počty buněk

Tabulka I

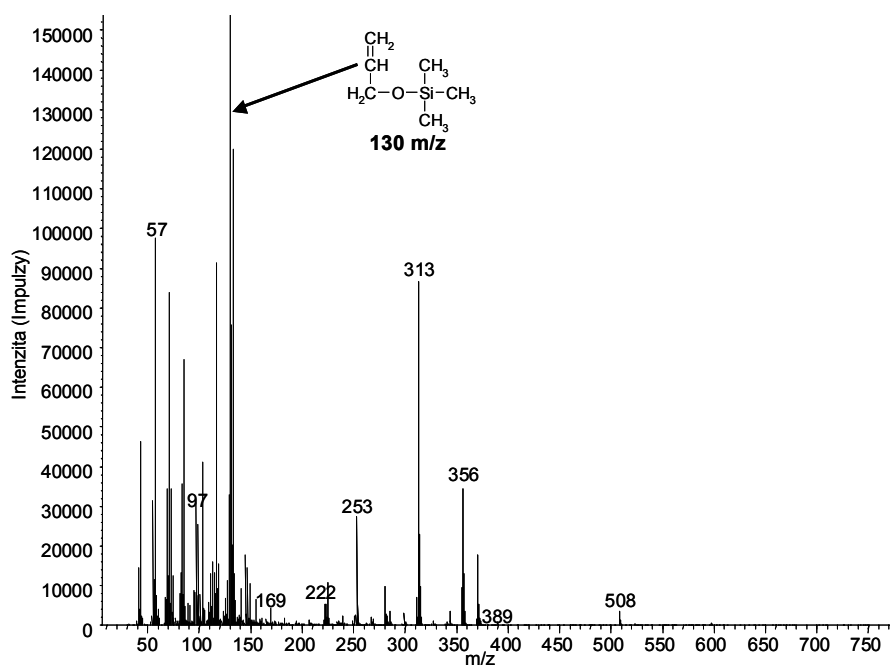
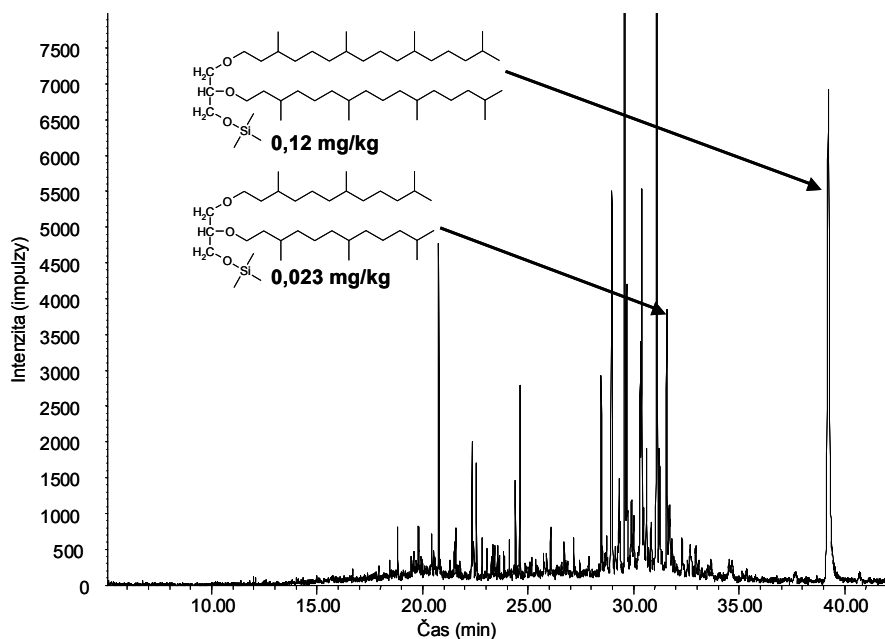
Relativní zastoupení (v %) esterově vázaných fosfolipidových mastných kyselin ve vybraných vzorcích (zkrácená nomenklatura mastných kyselin je vysvětlena v experimentální části)

Mastné kyseliny	Říční sediment (anaerobní)	Říční sediment (aerobní)	Aktivovaný kal	Vodárenský písek
<i>Nasyčené</i>				
12:0	1,2	0,5	7,5	5,7
14:0	1,6	2,3	5,6	4,6
15:0	0,7	1,4	3,3	–
16:0	12,5	22,2	13,4	35,5
18:0	1,9	–	2,9	–
20:0	1,0	0,2	3,3	–
21:0	0,7	0,1	–	–
22:0	1,7	0,2	0,07	–
23:0	0,6	0,1	~0,01	–
24:0	1,5	0,2	~0,01	–
26:0	0,7	0,1	–	–
28:0	0,6	–	0,01	–
30:0	0,2	–	–	–
<i>Nenasycené</i>				
16:1 ω 6	4,6	2,5	3,5	–
16:1 ω 7	33,3	11,4	22,0	35,5
16:1 ω 8	1,4	0,5	–	–
18:1 ω 7	10,9	9,7	14,0	6,2
18:1 ω 9	3,9	9,8	11,5	–
18:2 ω 6	2,6	2,7	4,2	–
20:1	0,3	0,1	0,01	–
20:4	0,3	0,8	0,1	–
20:5	0,1	1,7	~0,01	–
22:6	–	0,3	–	–
<i>Větvené a cyklické</i>				
i14:0	1,0	2,0	–	–
i15:0	3,7	6,0	2,4	12,5
a15:0	4,8	12,0	6,2	–
i16:0	1,4	1,7	–	–
10Me16:0	3,0	5,6	–	–
i17:0	0,5	1,6	–	–
cy17:0	2,4	2,6	–	–
cy19:0	0,8	1,7	–	–

nalezených v říčních sedimentech ($\sim 10^8$ buněk/g sušiny).

Pro analýzu etherových fosfolipidů se nejlépe osvědčil postup založený na extrakci lipidů stejnou extrakční směsí jako u běžných esterových lipidů a následné hydrolyze esterově vázaných mastných kyselin. Běžné, esterově vázané lipidy jsou tak převedeny na polární nízkomoleku-

lární produkty a nehydrolyzovatelné etherově vázané lipidy pak mohou být extrahovány směsí hexan – chloroform. Volnou hydroxyskupinu (po hydrolyze fosfátu) je vhodné silylovat bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidem (BSTFA) a vzniklé trimethylsilylery analyzovat GC-MS. Jako srovnávací látka pro analýzu etherových lipidů byl použit

Obr. 1. Hmotnostní spektrum O,O' -dihexadecylglyceroluObr. 2. Ionový chromatogram vzorku vyhnilého kalu (m/z 130)

dipalmitylglycerolether (O,O' -dihexadecylglycerol) v jehož hmotnostním spektru (obr. 1) byl pozorován jako nejintenzivnější ion o m/z 130 odpovídající pravděpodobně zbytku molekuly po odštěpení obou alkoxykupin

($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$). Tento fragment je společný všem O,O' -dialkylglycerolům a selektivní monitorování iontu o m/z 130 tak dovoluje citlivou a specifickou detekci dietherových fosfolipidů.

Na obr. 2 je uveden iontový chromatogram vyhnílého kalu z čističky odpadních vod rekonstruovaný pro ion m/z 130. Ve vzorku se podařilo nalézt dva etherové lipidy, které byly identifikovány na základě hmotnostních spekter jako O,O' -bis(3,7,11-trimethyldodecyl)glycerol ($t_{R1} = 31,55$ min) a O,O' -bis(3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)glycerol ($t_{R2} = 39,23$ min).

Závěr

Většina dosud známých lipidových biomarkerů mikroorganismů byla navržena na základě analýzy čistých kultur získaných kultivačním způsobem (*in vitro*). V této práci byly studovány praktické možnosti využití popsaných lipidových biomarkerů při charakterizaci reálných vzorků sedimentů a vyhnílého kalu (bez kultivace). Dosažené výsledky naznačují, že dosud navržené biomarkery dovolují přibližnou kvantifikaci mikrobiální biomasy v sedimentech a hrubou charakterizaci společenstva např. ve smyslu převládajícího způsobu získávání energie. Jelikož se počet známých specifických biomarkerů neustále zvětšuje (např. 10Me18:0 pro aktinomycety), lze předpokládat, že řada z nich se dobře osvědčí i při charakterizaci mikrobiálních společenstev v reálných ekosystémech. Nadějnou skupinou jsou nehydrolyzovatelné etherové lipidy specifické pro mikroorganismy říše Archaea, jejichž výzkum konvenčními metodami je komplikován mimo jiné i značnými experimentálními těžkostmi při jejich kultivaci. Studium biochemické, genetické a molekulárně-biologické podstaty Archaeabakterií přitom má klíčový význam nejen pro porozumění evoluční biologii, ale například i pro biotechnologické využití těchto výjimečných (extremofilních) organismů.

Autoři děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy za finanční podporu (projekt MSM 6198959216) a Ing. M. Urbánkové z Čistírny odpadních vod Olomouc za pomoc při odběru vzorků z vyhnívacích nádrží.

LITERATURA

1. Rulík M, Lamačová J., Barták P., Rolčík J.: *Význam a využití metody analýzy fosfolipidových mastných kysel*

lin pro charakteristiku a kvantifikaci mikrobiálních společenstev. V: Sborník referátů přednesených na semináři Mikrobiologie vody 2002 (Baudišová D., ed.), str. 55. Ostravice 2002.

2. Kaneda T.: *Microbiol. Rev.* 55, 288 (1991).
3. Vestal J. R., White D. C.: *Bioscience* 39, 535 (1989).
4. Findlay R. H., Dobbs F. C., v knize: *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology* (Kemp P. F., Sherr B. F., Sherr E. B., Cole J. C., ed.), str. 271–284. Lewis Publishers, Boca Raton 1993.
5. Gehron M. J., Davis J. D., Smith G. A., White D. C.: *J. Microbiol. Methods* 2, 165 (1984).
6. DeRosa M., Gambacorta A., Gliozzi A.: *Microbiol. Rev.* 50, 70 (1986).
7. Chan M., Himes R. H., Akagi J. M.: *J. Bacteriol.* 106, 876 (1971).
8. Kates M.: *The Biochemistry of Archaea*. kap 9. Elsevier Science Publisher, Ottawa 1993.
9. Tunlid A., Ringelberg D., Phelps T. J., Low C., White D. C.: *J. Microbiol. Methods* 10, 139 (1989).
10. Nichols P. D., Mooney B. D., Elliott N. G.: *J. Chromatogr., A* 936, 183 (2001).
11. Herb S., Stair J. O., Ringelberg D. B., White D. C., Flemming H. C.: *Water Sci. Technol.* 32, 141 (1995).

S. Opluštil^a, D. Chrastina^a, M. Rulík^b, P. Barták^a, P. Bednář^a, and L. Čáp^a (^aDepartment of Analytical Chemistry, ^bDepartment of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc): **Analysis of Phospholipids Biomarkers by Gas Chromatography**

Most known lipid biomarkers were found by analysis of pure bacterial cultures *in vitro*. The practical impact of a biomarker including possible interferences should be tested in extensive research of target strains in real ecosystems. Phospholipid fatty acids identified in river sediments, activated sludge and waterworks sand filters correspond with those proposed previously as biomarkers typical of expected microorganisms. Two ether lipids regarded as specific biomarkers of the Archaea kingdom were identified in digested sludge from a sewage water plant.