

Szybka i wiarygodna identyfikacja drobnoustrojów to jeden z najskuteczniejszych sposobów ograniczania szkód wywołanych przez infekcje, oceny bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności i linii produkcyjnych oraz poszukiwania nowych szczepów do zastosowań komercyjnych. Techniki identyfikacji mikroorganizmów oparte na testach biochemicznych są czasochłonne i pracochłonne, a często niewystarczające do rozróżnienia gatunków podobnych fenotypowo. Obecnie „złotym standardem” w identyfikacji mikroorganizmów jest technika sekwencjonowania 16S rRNA, która charakteryzuje się wysoką czułością, wiarygodnością i odtwarzalnością, jednak jej głównym problemem jest długi czas potrzebny do uzyskania wyniku oraz wysoki koszt analizy¹. W ostatnich latach coraz większy nacisk kładzie się na poszukiwanie nowoczesnych, niezawodnych, a jednocześnie szybkich metod wykrywania drobnoustrojów. Do takich metod zaliczyć można technikę MALDI MS, w której identyfikacja odbywa się na podstawie profilowania proteomu i porównywania z komercyjnie dostępnymi bazami danych². Jednak w przypadku blisko spokrewnionych gatunków identyfikacja często bywa nieprecyzyjna, a uzyskiwany wynik jest w dużej mierze zależny od przygotowania próbki (dobór matrycy, ilość materiału nałożonego na płytkę), a także posiadanego instrumentu (różne bazy danych zależne od producenta)³. Metodą analityczną, która zapewnia dużą powtarzalność wyników jest technika magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)⁴. Technika ta jest stosowana w badaniach metabolicznych⁴ i lipidomicznych⁵, jak również do poszukiwania specyficznych biomarkerów chorobowych⁶. Podjęto również próby zastosowania metody NMR do identyfikacji mikroorganizmów, jednak badania te dotychczas opierały się na detekcji charakterystycznych produktów metabolizmu wydzielanych przez bakterie do moczu w przypadku bakterii powodujących zakażenia dróg moczowych⁷ lub metabolitów wydzielanych do pożywki hodowlanej⁸. W jednej z prac podjęto także próbę rozróżnienia szczepów *Bacillus cereus* wyizolowanych z różnych środowisk na podstawie widm NMR¹⁰. W powyższych przypadkach stosowano jedynie metodę 1H NMR oraz wyłącznie w odniesieniu do metabolitów.

Celem projektu jest sprawdzenie możliwości zastosowania różnych wariantów techniki NMR do rozróżniania wybranych gatunków bakterii ważnych z punktu widzenia zdrowia człowieka – cztery gatunki patogenne, gram ujemne: *Citrobacter freundii* i *Citrobacter braakii* oraz *Escherichia coli* i *Shigella flexneri*, jak również cztery probiotyczne, gram dodatnie: *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus paracasei* oraz *Streptococcus salivarius* i *Streptococcus vestibularis* na podstawie profilowania lipidomicznego. Bakterie dobrano parami, ze względu na trudności w ich rozróżnieniu metodami biologii molekularnej i MALDI^{9,11}. Dla każdego gatunku zostanie wykonana ekstrakcja lipidowych składników komórkowych metodą Folcha¹², dzięki której zostanie rozdzielona frakcja polarna od niepolarniej. Rozpuszczalnik z frakcji polarnej zostanie odparowany na suszarce próżniowej, a wyekstrahowane związki ponownie rozpuszczone w deuterowanym rozpuszczalniku. Wszystkie próbki zostaną przygotowane w trzech powtórzeniach. Dla tak przygotowanych roztworów zostaną zarejestrowane widma 1H, 13C oraz 31P na spektroskopie NMR Bruker Avance III 700 MHz dostępnym w Pracowni Analiz Instrumentalnych na Wydziale Chemii UMK. Uzyskane wyniki będą ze sobą porównywane za pomocą narzędzi statystycznych dostępnych na platformie MetaboAnalyst¹³. Metody takie jak analiza składowych głównych (PCA), analiza dyskryminacyjna metodą częściowej regresji najmniejszych kwadratów (PLS-DA), czy ANOVA posłużą do określenia czy za pomocą zastosowanej metodyki istnieje możliwość całkowitego odróżnienia badanych mikroorganizmów, a także do wyboru sygnałów najbardziej różnicujących porównywane widma. Mikroorganizmy będą ze sobą porównywane w zaproponowanych parach, jako blisko ze sobą spokrewnione, a także w porównaniu do bardziej odległych genetycznie pozostałych szczepów. Dla sygnałów najbardziej różnicujących widma zostanie przeprowadzona wielowymiarowa analiza przy wykorzystaniu krzywej ROC celem określenia mocy dyskryminacyjnej metody odróżniania bakterii. Jako metoda referencyjna identyfikacji mikroorganizmów zastosowana będzie technika MALDI z wykorzystaniem spektrometru mas Bruker microflex LT oraz bazą danych Biotyper, dostępna w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK.

Według mojej najlepszej wiedzy, podobne badanie nie zostało dotychczas przeprowadzone. Ważne jest zatem sprawdzenie możliwości zastosowania różnych wariantów techniki NMR do rozróżnienia bakterii na podstawie profili lipidomicznych.

Rezultaty planowanego działania badawczego zamierzam opublikować w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym z listy JCR.

[1.] B. Buszewski et al., *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2021**, 139, 116250. [2.] F. Nomura, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, **2015**, 1854, 528. [3.] S. Lévesque et al., *PLOS ONE*, **2015**, 10, e0144878. [4.] A.-H. Emwas et al., *Metabolites*, **2019**, 9, 123. [5.] J. Li, T. Vosegaard, and Z. Guo, *Progress in Lipid Research*, **2017**, 68, 37. [6.] J. Nizioł et al., *Anal Bioanal Chem*, **2020**, 412, 5827. [7.] A. Gupta et al., *BJU International*, **2009**, 104, 236. [8.] T. L. Palama et al., *Analyst*, **2016**, 141, 4558. [9.] M. Zloch et al., *Future Microbiology*, **2020**, 15, 1157. [10.] J. G. Bundy et al., *FEMS Microbiology Letters*, **2005**, 242, 127. [11.] C.-H. Huang et al., *Frontiers in Microbiology*, **2018**, 9, 112. [12.] J. Folch et al., *Journal of Biological Chemistry*, **1957**, 226, 497. [13.] Z. Pang et al., *Nucleic Acids Research*, **2021**, 49, W388.