

# ARXPS-ANALIZA BAKTERIJ *ESCHERICHIA COLI*, OBDELANIH V KISIKOVI PLAZMI

Kristina Eleršič, Janez Kovač, Martina Modic, Miran Mozetič

ZNANSTVENI ČLANEK

Institut »Jožef Stefan«, Jamova 39, 1000 Ljubljana

## POVZETEK

S tehniko ARXPS (*Angular Resolved X-Ray Photoelectron Spectroscopy*) smo posneli fotoelektronske spektre bakterij. Primerjali smo referenčne bakterije s tistimi, obdelanimi v reaktivni kisikovi plazmi. S spreminjanjem kota snemanja XPS-spektrov smo dobili informacije o sestavi bakterijskih vzorcev v različnih globinah. Ugotovili smo, da se kemijska zgradba bakterijske stene spreminja po globini, kar je povezano z zgradbo celične stene. Obdelava bakterij s kisikovo plazmo je pokazala močan porast vsebnosti mikroelementov, kar smo razložili kot odziv bakterij na stres zaradi vpliva okolja.

**Ključne besede:** ARXPS, bakterije, kisikova plazma

## ARXPS analysis of bacteria *Escherichia coli* treated with reactive oxygen plasma

### ABSTRACT

Spectra of bacteria were recorded with ARXPS (*Angular Resolved X-Ray Photoelectron Spectroscopy*) technique that allows for variable angle of impact of electrons. Spectra of the control bacteria were compared to those of reactive oxygen plasma treated bacteria. By varying the impact angle of electrons we obtained different depth profiles of the bacteria samples and thus different structures of the bacteria cell wall as the structure of the cell wall is not uniform throughout its depth. Treatment of the bacteria in reactive oxygen plasma shows an increase of microelements. It is due to bacterial response to the environmental stress.

**Keywords:** ARXPS, bacteria, oxygen plasma

## 1 UVOD

Bakterije so velika skupina mikroskopsko majhnih živih organizmov. Laboratorijsko so zelo dobro preučene, predvsem zaradi svoje preproste zgradbe. Bakterije nimajo organelov, kot so npr. mitohondriji ali kloroplasti, prav tako nimajo celičnega jedra. Zaradi teh lastnosti jih prištevamo k veliki skupini preprostih celičnih organizmov, imenovani prokarionti.

Glede na zgradbo njihove celične stene jih delimo na dve veliki skupini, in sicer na po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije. Po Gramu pozitivne bakterije imajo preprostejšo zgradbo celične stene, ki je sestavljena iz več plasti peptidoglikana. V celični steni je teihoična kislina, ki ima vlogo pri adheziji bakterij na podlago ter deluje kot kelator. Po Gramu negativne bakterije imajo posebno zgradbo celične stene. Ta vsebuje le nekaj (okoli 4) plasti peptidoglikana, medtem ko je pri po Gramu pozitivnih bakterijah teh plasti tudi do 40. Celice so obdane še z dodatno zunanjo celično membrano, v katero so vgrajeni lipopolisaharidi. V zunanji membrani so porini, ki so kot majhne pore, ki prepuščajo nekatere

molekule, da vstopijo skozi zunanjo membrano. Prostor med peptidoglikanskim slojem in zunanjo membrano imenujemo periplazemski prostor. Teihoične kisline pri po Gramu negativnih bakterijah ni. Na polisaharidno ogrodje so pripeti lipoproteini, ki jih pri po Gramu pozitivnih bakterijah ni. Dodatna celična membrana, obogatena z lipopolisaharidi, bakterijo še dodatno ščiti pred razpadom. Pri bakterijah je to velika prednost, saj se tako lažje ubranijo nekaterih antibiotikov, peptidov ali pred drugimi zunanjimi vplivi [1–3]. Ker so po Gramu negativne bakterije boljše preučene in se uporabljajo za različne preiskave, smo izbrali bakterijo, ki je glavni predstavnik skupine po Gramu negativnih bakterij, in sicer je to bakterija *Escherichia coli*.

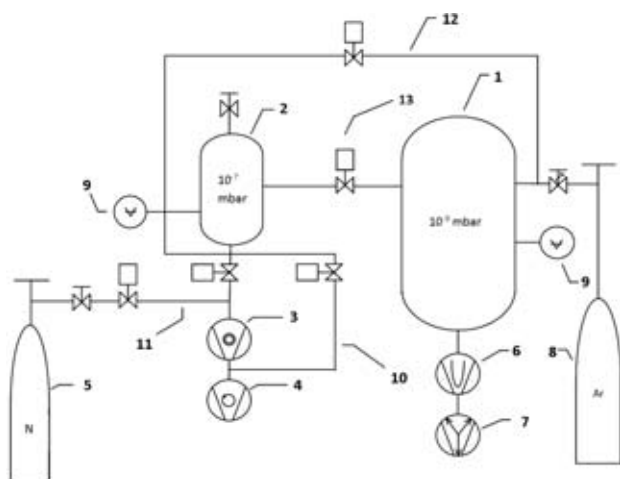
Bakterije imajo več mehanizmov pripenjanja na podlago, prav tako imajo na površini različne molekule, ki so odgovorne za prepoznavanje podlage, katere se bakterija oprime. Da bi določili, katere molekule so odgovorne za oprijemanje na podlago, potrebujemo metodo, ki bi analizirala kemijske skupine na površini. Ena od tehnik pri preučevanju tega je lahko tudi metoda XPS z dopolnilno metodo snemanja pod različnimi koti.

Poleg preučevanja mehanizmov razgradnje bakterij pod vplivom reaktivne kisikove plazme je bila ta tehnika uporabljena tudi pri obsežnih študijah o zgradbi bakterijskih sten. Z XPS-analizo so različne seve bakterij uvrstili v skupine na podlagi zgradbe in kemijske sestave membran. Pokazali so, da se ujemajo z že obstoječimi razvrstitvami v redove, kot so *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus* ... [4].

Bakterijska zunanost je sestavljena iz več tipov molekul. Sama membrana je sestavljena iz fosfolipidov, na katere so dodatno vezani glikolipidi, glikoproteini in polisaharidi. Bakterije so živa bitja, zato v XPS-spektrih organskih molekul prevladujejo elementi ogljik, kisik in dušik. Membrana iz fosfolipida kaže na prisotnost fosforja, znotraj pa se nahajajo soli, torej vidimo natrij in kalij.

## 2 ULTRAVISOKOVAKUUMSKI SISTEM XPS-SPEKTROMETRA

Rentgenska fotoelektronska spektroskopija (*X-Ray Photoelectron Spectroscopy* – XPS ali *Electron Spectroscopy for Chemical Analysis* – ESCA) je ena najpogosteje uporabljenih metod za preiskavo sestave,



**Slika 1:** Shema ultravisokovakuumskega sistema XPS-spektrometra: 1 – komora, 2 – predkomora, 3 – turbomolekularna črpalka, 4 – rotacijska črpalka, 5 – jeklenka z dušikom, 6 – sublimacijska črpalka, 7 – ionsko-getska črpalka, 8 – jeklenka z argonom, 9 – merilnik tlaka, 10 – obtočna linija za črpanje predkomore, 11 – linija za pre-zračevanje sistema z dušikom, 12 – linija za črpanje argona med ionskim jedkanjem, 13 – ventil med komorama za uravnavanje tlaka

kemičnega stanja in elektronskih lastnosti površin [5]. Metoda temelji na pojavu fotoefekta: atome površine vzorca najprej obsevamo z rentgensko svetlobo, nato pa z elektroni, ki so bili izbiti z notranjih atomskih energijskih nivojev, izmerimo energijo [6].

Vakuumski sistem sestoji iz ionsko-getske črpalke, titanove sublimacijske črpalke, turbomolekularne črpalke, rotacijske črpalke, merilnika tlaka, ventilatorja, komore in predkomore za hitro vstavljanje vzorcev (**slika 1**). Tlak v glavni komori je navadno nižji od  $10^{-9}$  mbar (UVV), v predkomori pa  $10^{-7}$  mbar.

### 3 EKSPERIMENTALNI SISTEM ZA XPS

Površino vzorcev smo analizirali z metodo XPS. Za vzbujanje smo uporabili rentgenske žarke iz monokromatskega izvira Al  $K_{\alpha 1,2}$  z energijo 1486,6 eV. Analizirana površina je imela premer 400  $\mu\text{m}$ , analizna globina pa je bila okoli 1 nm. Fotoelektroni so bili analizirani s hemisferičnim analizatorjem pod različnimi koti ( $20^\circ$ ,  $45^\circ$  in  $70^\circ$ ) glede na normalo na površino vzorca. Energijska ločljivost spektra je 0,5 eV. Pregledni spektri so bili zajeti pri energiji prehoda elektronov skozi analizator 187,85 eV, visokoločljivostni pa pri 29,35 eV in koraku 0,125 eV. Referenčni vrh C 1s je bil pri 284,8 eV. Uporabili smo tudi elektronsko puško za nevtralizacijo naboja na površini vzorca.

### 4 EKSPERIMENTALNI SISTEM ZA BAKTERIJE

Uporabljali smo standardni laboratorijski sev bakterije *Escherichia coli* ATCC25922 (*E. coli*). Bakterije smo namnožili na LB (gojišče Lurea Bretani, sestavljeno iz kazeinskega hidrolizata, 10 g/L, kvasnega ekstrakta, 5 g/L, in NaCl, 10 g/L) umerjeno na pH 7,0 z NaOH. Iz LB agarjevih gojišč smo prekonočne kolonije redčili z vodo ter nato nanesli na plazemsko aktivirane silicijeve rezine. Aktivacija rezin je potekala 3 s v kisikovi plazmi. Uporabili smo jo predvsem zato, da smo se znebili nečistoč na podlagi ter aktivirali površino, da se je povečala njena površinska energija. Povečanje površinske energije pomeni tudi večjo hidrofilitnost vzorca. Tako se kapljica zaradi povečane hidrofilitnosti na površini silicijeve rezine razporedi po celotni površini in je analiza z mikroskopi lažja. Pri hidrofobnih podlagah se tvori kapljica, ki se noče dotikati podlage in tako dobimo bakterije le na enem mestu, kar otežuje nadaljnje analize.

Laboratoriji po svetu pripravijo bakterije za analizo z XPS-metodo po različnih postopkih, bodisi da z encimi naluknjajo membrano in odstranijo celično tekočino ter tako gledajo izključno bakterijsko ovojnico. Nekateri pa pripravijo bakterije v tekočem gojišču ter jih nato obdelajo tako, da jih hitro zamrznejo in s tem odstranijo vodo. Iz ostanka ovojnic naredijo tako imenovano pasto. XPS-analiz na bakterijah, ki bi bile direktno izpostavljene vakuumu v XPS-komori, v literaturi še nismo našli [4, 7–9].

Pri eksperimentu smo za obdelavo bakterij uporabili šibko ionizirano plazmo, ki smo jo ustvarili z induktivno sklopljenim radiofrekvenčnim generatorjem, ki je deloval pri frekvenci 27,12 MHz in moči 120 W. Izvorni plin je bil kisik pri sobni temperaturi in tlaku 75 Pa. Čas izpostavitve bakterij je bil 2 min.

### 5 REZULTATI

XPS-spektre bakterij smo posneli pri različnih kotih analizatorja elektronov glede na površino vzorca ( $\Theta$ ), in sicer pri kotih  $20^\circ$ ,  $45^\circ$  in  $70^\circ$ .

Kot  $\Theta$  imenujemo tudi izstopni kot elektronov glede na površino vzorca (ang. *take-off angle*). S spreminjanjem izstopnega kota elektronov glede na površino vzorca se spreminja globina, iz katere prihajajo elektroni, ki jih analiziramo. Pri večjih izstopnih kotih glede na površino vzorca analiziramo globlje področje, medtem ko pri majhnih izstopnih kotih analiziramo predvsem zgornje plasti vzorca, ki so tik pod površino. Debelina področja, ki ga analiziramo, je podana s sinusom izstopnega kota. Pri izstopnem kotu  $\Theta = 90^\circ$  glede na površino vzorca, kjer je  $\sin 90^\circ = 1$ , analiziramo najdebelejšo plast.

**Tabela 1** prikazuje molske deleže elementov pri različnih kotih detekcije. Analiza je bila narejena na bakteriji *E. coli* pod tremi koti detektorja. Bakterije so bila nanesene v več plasteh na silicijevo rezino. Podatki v **tabeli 1** pomenijo molske deleže elementov, ki sestavljajo bakterije, pridobljeni pa so bili z ARXPS pod različnimi koti. Ugotovljamo, da se koncentracija ogljika z večanjem kota zmanjšuje. Nasprotno pa se koncentracije dušika, klora ter natrija z večjim kotom detekcije povečujejo. Prav tako lahko opazimo padanje koncentracije silicija pri večjih kotih detekcije. Medtem ko za koncentraciji fosforja in kisika tega ne moremo zagotovo trditi.

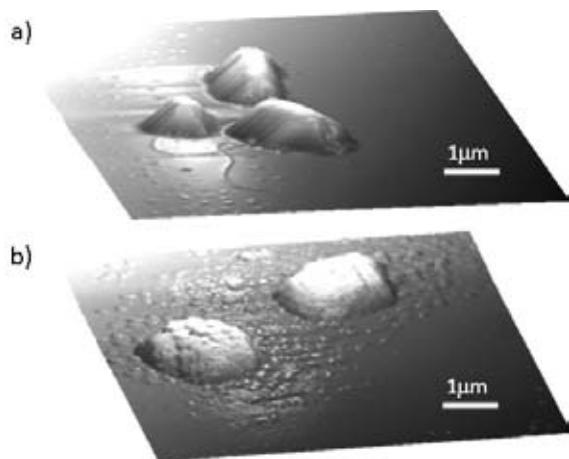
**Tabela 1:** Molski deleži elementov bakterije, dobljeni pri različnih kotih detekcije, %

kot detekcije	C	O	N	Cl	Na	Si	P
20°	68,6	16,0	6,7	3,7	2,7	1,6	0,7
45°	64,0	19,0	7,7	2,9	3,9	1,3	1,1
70°	60,3	18,5	8,6	4,6	5,7	1,1	1,1

**Tabela 2** prikazuje molske deleže elementov pri različnih kotih detekcije bakterije, ki je bila obdelana v kisikovi plazmi 2 min. Tukaj se prav tako kot pri neobdelanih bakterijah koncentracija ogljika z večanjem kota zmanjšuje. Fosfor in žveplo pa z naraščajočim kotom naraščata. Koncentracija kalija je pri vseh treh kotih obdelave enaka in verjetno ni toliko odvisna od globine, medtem ko je o tem za druge elemente težko sklepati.

**Tabela 2:** Molski deleži elementov bakterije, obdelane v plazmi, dobljeni pri različnih kotih detekcije, %

kot detekcije	C	O	N	Na	Si	P	S	K
20°	33,9	40,1	4,2	13,9	1,8	2,5	3,4	0,2
45°	23,4	44,8	4,2	19,9	1,4	2,6	3,6	0,2
70°	26,4	43,3	3,3	18,7	1,8	2,8	3,7	0,2



**Slika 2:** AFM-posnetek bakterij *Escherichia coli*: (a) neobdelana referenčna bakterija s pilusi, (b) uničene bakterije po 2-minutni obdelavi v kisikovi plazmi

Pri obdelavi bakterij s kisikovo plazmo se spremeni površina bakterij, ki postane bolj hrapava in začne razpadati. Dveminutna plazemska obdelava pojedka organele, s katerimi se bakterije premikajo (flagele in piluse) in vrhnji sloj bakterijske stene. To nam pokaže AFM-analiza bakterij, kar je nazorno prikazano na **sliki 2**.

## 6 DISKUSIJA

Bakterije, ki niso bile obdelane v plazmi, smo preiskali z ARXPS. Spektri pokažejo padanje ogljika, in sicer ga je največ na površini in v prvi plasti, s povečanjem kota pa koncentracija začne padati. Globina analiziranih elektronov se večja z večanjem kota, kar pomeni, da je ogljika v notranjih plasteh manj kot na površini. Enako je pri bakterijah, obdelanih v plazmi. Koncentracija dušika se zmanjša po obdelavi s plazmo, saj se pri obdelavi s reaktivnimi delci iz plazme pojedkajo glikoproteini ter organeli za pripenjanje bakterij na površino, kot so flagele in pilusi. Le-ti so sestavljeni pretežno iz aminokislin, zato pri analizi dobimo zmanjšano koncentracijo dušika. Koncentracija kisika je seveda pri obdelanih bakterija zelo velika. Predvidevamo, da so kisikovi reaktivni delci iz plazme lahko prodrli v globino bakterije, saj kisik zaznamo tudi v notranjosti. Koncentracija natrija in klora po obdelavi v kisikovi plazmi naraste. Bakterije namreč, ko zaznajo nevarnost, spustijo v okolje soli kot nekakšen obrambni mehanizem [4]. Pri tem kot analize ne vpliva bistveno na rezultat.

Analiza bakterij pod različnimi koti nam je dala veliko informacij o sami površini. Ker se globina analize z večanjem kota večja, pomeni, da pri majhnem kotu dobimo zelo majhno globino analiziranih elektronov. Zaznamo le površinske molekule. Koncentracija ogljika je pri obdelanih in neobdelanih bakterijah večja, kar je logično, saj imajo bakterije na površini plast iz lipopolisaharida, ki vsebuje velik delež ogljika in ščiti bakterijo pred zunanjimi vplivi. Bolj v notranjosti se koncentracije elementov, ki so gradniki proteinov in soli (kot so natrij, kalij in klor), povečujejo.

Elementi, kot so vodik, kisik, dušik, ogljik in žveplo, zavzemajo navadno več kot 99 % mase živih celic. Največji delež imata vodik in kisik, saj je približno 70 % celotne mase bakterij voda. Z analizo smo opazovali suhe bakterije, poleg tega XPS-spektroskopija ne zaznava vodikovih atomov. Analiza je pokazala, da koncentracija ogljika z globino hitro pada. 1 % celotne mase so anorganski ioni [3], kar pomeni približno  $2,5 \cdot 10^8$  molekul. To se pokaže v povečani koncentraciji predvsem natrija in delno tudi klora. Bakterije, obdelane v kisikovi plazmi, kažejo veliko prisotnost kisika. Poleg tega, da je kisik iz vode,

je verjetno neki delež kisika tudi zaradi obdelave v plazmi.

Razgradnja bakterij poteka v več korakih, zato je mehanizem zelo zapleten. Različni delci v plazmi različno interagirajo z molekulami na površinah bakterij, in tudi mehanizmi obrambe bakterij so različni in kompleksni. Do samega postopka uničenja bakterije tako verjetno ne vodi le en sam proces, pač pa jih poteka več hkrati. Predpostavlja se, da bakterijo lahko uničijo atomi in ioni, ki so v plazmi, tako da jedkajo površino in da bakterijsko DNK nato uničuje UV-sevanje, ki je v plazmi [10]. To naj bi povzročilo povezovanje timinov v pare in lepljenje DNK. Samo izpostavitve vakuumu ne uniči bakterije, vendar pa vakuum lahko pripomore k hitrejšemu propadu bakterije, ko je njena membrana že poškodovana.

## 7 SKLEP

ARXPS-analiza je potrdila, da obstaja nekaj mehanizmov propada bakterij, kot je na primer povečana koncentracija natrija in kalija, ki ga bakterije spustijo v okolje v določenih primerih, predvsem, kadar je ogrožena njihova eksistenca. Povečana je koncentracija fosforja na površini, ker so bile odstra-

njene nekatere vrhnje plasti in je preostali del fosfolipidni dvosloj. XPS-analiza nam da veliko podatkov o kemijski sestavi, kar pripomore k interpretaciji sterilizacijskih mehanizmov. Metoda je uporabna za določanje elementne sestave, medtem ko na prisotnost organskih molekul lahko sklepamo iz elementne sestave.

## 8 LITERATURA

- [1] M. Moreau, N. Orange, M. G. J. Feuilloley, *Biotechnology Advances*, 26 (2008) 6, 610–617
- [2] Murray R. Patrick, *Manual of Clinical Microbiology*. 7th Edition, American Society for Microbiology, Washington, 2005
- [3] M. Obata-Yasuoka, W. Ba-Thein, T. Tsukamoto, H. Yoshikawa, H. Hayashi, *Microbiology*, 148 (2002) 2745–2752
- [4] H. C. von der Mai, J. de Vrise, H. J. Bussher, *Surface science reports*, 39 (2000) 1–24
- [5] V. Nemanič, ur., *Vakuumska znanost in tehnika*, Društvo za vakuumsko tehniko Slovenije, Ljubljana, 2003
- [6] J. Kovač, A. Zalar, *Vakuumist*, 25 (2005) 3, 19–24
- [7] Y. Ma, G.-J. Zhang, *IEEE transactions on plasma science*, 36 (2008) August, 1615–1620
- [8] L. Leone, J. Loring, S. Sjoeborg, P. Persson, A. Schukarev, *Surface and Interface Analysis*, 38 (2006) 202–205
- [9] J. J. Ojeda, M. E. Romero-Gonzales, R. T. Backman, R. G. J. Edyvean, S. A. Banwart, *Langmuir*, 24 (2008) 4032–4040
- [10] A. Vesel, U. Cvelbar, M. Mozetič, N. Krstulović, I. Labazan, S. Milošević, *Materiali in tehnologije*, 177 (2004) 3–4, 38