



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

OPTIMALIZACE HYDROGELOVÉHO NOSIČE PRO POSUZOVÁNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY BIOCIDNÍCH POVRCHŮ

OPTIMIZATION OF HYDROGEL CARRIER FOR ASSESSMENT OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BIOCIDAL SURFACES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Adam Antálek

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Marcela Králová, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1894/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Adam Antálek**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Procesy a materiály medicínských aplikací
Vedoucí práce: **Ing. Marcela Králová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Optimalizace hydrogelového nosiče pro posuzování antimikrobiální aktivity biocidních povrchů

Zadání diplomové práce:

1. Sestavte literární rešerši shrnující současný stav o testech viability pomocí barvicích postupů a v oblasti otiskového vzorkování mikrobiálních populací.
2. Navrhněte a optimalizujte složení a vlastnosti hydrogelové kompozice vhodné pro statickou metodu posouzení antimikrobiálních vlastností povrchů.
3. Prostudujte statickou metodu antimikrobiálních vlastností fotoaktivních materiálů a porovnejte s normovanými postupy.

Termín odevzdání diplomové práce: 29.4.2024:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Adam Antálek
student

Ing. Marcela Králová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Táto diplomová práca sa zaoberá optimalizáciou zloženia a vlastností hydrogélů ako nosičů mikrobiálních populací pre hodnotenie antimikrobiálních účinků. Existujú normované postupy pre hodnotenie antimikrobiálních povrchů, avšak zahrňajú nedostatky, ako napríklad nutnosť testovania výhradne v laboratorných podmienkach. V predloženej práci je navrhnutá nová metodika hodnotenia, ktorá využíva modifikovaný rezazurínový test a hydrogély ako platformy pre výsev baktérií, vďaka čomu je možné posúdiť skúmaný antimikrobiálny povrch. Podarilo sa optimalizovať zloženie a vlastnosti hydrogélůvých nosičů vzhľadom na ich botnacie a mechanické vlastnosti, a zlepšiť tak recovery oproti štandardizovaným postupom. Testy na antimikrobiálnom materiály ukázali, že použité baktérie na hydrogélůch ďalej rástli, čo znemožňuje použitie kompozitného hydrogélů pre túto aplikáciu.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

antimikrobiálne povrchy, hydrogély, agaróza, ι-karagenan, rezazurín, reológia, statická metóda

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the optimization of the composition and properties of hydrogels as carriers of microbial populations for the evaluation of the antimicrobial effects. There are standardized procedures for assessing antimicrobial surfaces, but they have shortcomings, such as the necessity of testing exclusively under laboratory conditions. In the presented work, a new evaluation methodology is proposed, which utilizes a modified resazurin test and hydrogels as platforms for bacterial seeding, enabling the assessment of the investigated antimicrobial surface. The composition and properties of hydrogel carriers were successfully optimized with respect to their swelling and mechanical properties, thereby improving recovery compared to standardized procedures. Tests on antimicrobial materials showed that the bacteria used on hydrogels continued to grow, rendering the use of composite hydrogels for this application impractical.

KEY WORDS

antimicrobial surfaces, hydrogels, agarose, ι-carrageenan, resazurin, rheology, static method

BIBLIOGRAICKÁ CITÁCIA

ANTÁLEK, Adam. *Optimalizace hydrogelového nosiče pro posuzování antimikrobiální aktivity biocidních povrchů*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156392>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Marcela Králová.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne a všetky použité literárne zdroje som správne a úplne odcitoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

Podpis študenta

POĎAKOVANIE

Týmto by som chcel poďakovať najmä svojej vedúcej diplomovej práce, pani Ing. Marcela Královej, Ph.D., za jej ochotu, zhovievavosť, trpezlivosť, priateľský prístup, rady a pomoc pri meraní a písaní tejto práce. Pánovi doc. Ing. Petrovi Dzikovi, Ph.D. za jeho rady a pomoc pri riešení problémov. Taktiež by som chcel poďakovať za pomoc a ochotu pánovi Ing. Jiřímu Smilkovi Ph.D. pri meraní reologických vlastností. V neposlednom rade patrí vďaka kolegom z laboratória 3078, najmä mojej konzultantke a kamarátke pani Ing. Sylvii Patakyovej. Veľká poďakovanie patrí mojej rodine, priateľke a najbližším kamarátom za oporu, pomoc a dôveru, ktorú do mňa za celé štúdium vkladali.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Fotokatalytické povrchy	8
2.2	Testovanie antimikrobiálnych vlastností fotokatalytických povrchov	9
2.2.1	ISO 27447:2019	9
2.2.2	ISO 22196:2011	10
2.3	Escherichia Coli	10
2.4	Hydrogély	11
2.4.1	Fyzikálne hydrogély	13
2.4.2	Hydrogélové nosiče mikrobiálnych kultúr.....	17
2.5	Resazurín	17
2.6	Použité laboratórne metódy	18
2.6.1	Gravimetrické stanovenie botnacích vlastností hydrogélrov – „Tea-bag“ metóda.....	18
2.6.2	UV/VIS spektrofotometrické stanovenie transmitančných vlastností hydrogélrov	19
2.6.3	Stanovenie mechanických vlastností pomocou oscilačného amplitúdového testu	21
3	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	23
3.1	Stanovenie mikrobiálnych populácií farbivami technikami	23
3.2	Odtlačkové vzorkovanie bakteriálnych populácií.....	24
3.3	Aplikačné možnosti hydrogélrov	25
3.3.1	Parametre ovplyvňujúce adhéziu MO na hydrogély	27
3.4	Nová metodika	28
4	CIELE PRÁCE	32
5	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	33
5.1	Použité prístroje a chemikálie.....	33
5.2	Príprava hydrogélrových kompozícií	34
5.2.1	Návrh a 3D tlač odlievacej formy	34
5.2.2	Príprava vodného roztoku PBS pre rozpúšťanie polymérov	35
5.2.3	Rozpúšťanie polymérov a odlievanie hydrogélrov	35
5.3	Testovanie botnacích vlastností hydrogélrov.....	36
5.4	Testovanie transmitančných vlastností kompozícií	37
5.5	Test recovery po odtlačku na poréznom povrchu po nabotnaní pomocou farbiva..	37
5.6	Testovanie reologických vlastností amplitúdovým testom.....	38
5.7	Statické mikrobiálne testy.....	39
5.7.1	Príprava roztoku resazurínu	40
5.7.2	Očkovanie baktérií zo zásoby peliet E. coli	40
5.7.3	Príprava suspenzie E. coli	40
5.7.4	Kalibračná rada E. coli pre vybranú kompozíciu.....	40
5.7.5	Statické testy na vybraných fotokatalytických povrchoch.....	42
5.7.6	Recovery testy na vybraných poréznych a hladkých materiáloch	42
6	VÝSLEDKY A DISKUSIA	44
6.1	Botnacie vlastnosti	46
6.2	Optické vlastnosti (transmitancia).....	47
6.2.1	Transmitančné vlastnosti	47
6.2.2	Overenie recovery pomocou farbiva.....	48

6.3	Reologické vlastnosti	50
6.4	Statické testovanie antimikrobiálnych vlastností fotokatalyzátoru	52
6.4.1	Kalibrácia resazurínovej metódy pre hydrogél ovú kompozíciu „A“	52
6.4.2	Statické testy	53
6.4.3	Recovery pre vybrané dotatočné povrchy	55
7	ZÁVER	56
8	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	58
9	ZOZNAM SKRATIEK A SYMBOLOV	65

1 ÚVOD

V súčasnosti sa pre hodnotenie antimikrobiálnych vlastností povrchov a povlakov bežne používajú normované postupy (podľa ISO noriem: ISO 27447:2019 a ISO 22196:2011), ktorých princípom je nanosenie mikrobiálnej suspenzie na skúmaný povrch, kde je táto suspenzia po určitú dobu ponechaná v kontakte so skúmaným antimikrobiálnym materiálom. Následne sa opláchnutím mikroorganizmy (MO) zo skúmaných povrchov zbierajú a nakoniec sa preživšie kolónie počítajú.

Hlavnými nevýhodami týchto techník je ich časová náročnosť, veľká spotreba materiálov a nutnosť vyhodnocovania výsledkov výhradne v laboratórnych podmienkach (tzv. *ex situ*, t. j. mimo inštalované povrchy). S hodnotením už inštalovaných povrchov sú spojené mnohé problémy ako potreba preniesť skúmaný povrch do laboratórneho prostredia, čím dochádza k väčšiemu či menšiemu poškodeniu. Navyiac u týchto metód je testovanie obmedzené na vzorky malých rozmerov a výsledky bývajú často zaťažené značnou chybou, ktorá vzniká práve pri zbieraní MO oplachom. V tomto prípade sú získavané cca 50–80% výťažnosti pôvodne nanesej mikrobiálnej suspenzie, čoho dôsledkom je chyba počítania MO.

V rámci projektov riešených v laboratóriu fotochémie bola navrhnutá a vyvíjaná nová metodika, ktorá by vyššie uvedené nedostatky odstránila. Táto metodika sa zakladá na farbiacich technikách, ktorými by bolo nahradené počítanie životaschopných (viabilných) buniek, čím by bol výrazne zkrátený čas potrebný pre získanie výsledkov antimikrobiálnej aktivity povrchov. Už v minulosti boli použité napr. resazurínové testy, ako ukazateľ kontaminácie mlieka baktériami a kvasinkami a k určetniu cytotoxicity a minimálnej inhibičnej koncentrácie pre antibiotiká. Mikroorganizmy ukotvené na vhodnom nosiči budú na skúmaný povrch prenesené, čím sa umožní hodnotenie antimikrobiálnych vlastností aj u inštalovaných povrchov (tzv. test *in situ*, na mieste) a súčasne použitie nosičov zaistí, že vyvinutá metodika bude zároveň aplikovateľná pre hodnotenie antimikrobiálnych vlastností povrchov rôznych rozmerov. Následne bude nosič odňatý z testovaného povrchu a resazurínovou metódou bude stanovené množstvo viabilných MO.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Fotokatalytické povrchy

Fotokatalytické povrchy sa stali nevyhnutnou súčasťou v aplikáciách ako čistenie a dezinfekcia vody a prostredia. Zastávajú hlavnú funkciu v technológiách samočistiacich povrchov a materiálov. Samočistiace a samodezinfekčné materiály zahŕňajú použitie fotokatalytických reakcií, ktoré sú schopné rozkladať organickú hmotu¹ a inaktivovať mikroorganizmy (MO)². Fotokatalytické povrchy ponúkajú efektívne, jednoduché a ekonomicky dostupné riešenie pri spomaľovaní kontaktného šírenia infekcií, nielen v miestach s vysokým výskytom MO (ako napr. nemocnice³), ale i na verejných priestranstvách či v domácnostiach².

Fotokatalyzátory sú materiály, ktoré sú po vystavení vhodnému žiareniu (UV a/alebo VIS) schopné absorbovať fotóny, ktorých energia je využitá pre iniciáciu a urýchlenie chemických reakcií. Na základe mechanizmu fotokatalýzy a produkcie biocídneho účinku je možné tieto materiály rozdeliť do troch kategórií; fotokatalyzátory na báze: polovodičov (TiO₂⁴, ZnO⁵, CuS⁶ atď.), lokálnej povrchovej plazmónovej rezonancie nanočastíc vzácnych kovov⁷ (Ag⁸, Au⁹), a fotoresponzívnych polymérov¹⁰. Najčastejšie používaným materiálom pre antimikrobiálne povrchy sú fotokatalytické polovodiče, napríklad oxid titaničitý (TiO₂), kedy absorpcia fotónov s dostatočnou energiou spôsobí excitáciu valenčných elektrónov do energetickej hladiny vodivostných pásov, čím dôjde ku generácii elektrón-diera párov (elektróny vo vodivostných energetických pásoch; diery vo valenčných energetických pásoch)¹¹. Následne dochádza buď k spätnej rekombinácii elektrón-diera párov, alebo dochádza k ich difúzii na povrch fotokatalyzátora, kde sa môžu zúčastniť redoxných reakcií^{11,12}.

Antimikrobiálny účinok spočíva v reakcii medzi reaktívnymi formami kyslíka (ROS) a MO. ROS ako singletový kyslík, superoxidový anión, hydroxylový radikál atď.; vznikajú redoxnými reakciami fotokatalyzátora so vzdušným kyslíkom a/alebo vodou/vzdušnou vlhkosťou¹¹.

V prípade, kedy dochádza k rekombinácii excitovaných elektrónov (návrat elektrónov na pôvodné energetické hladiny) v elektrón-diera pároch, sa absorbovaná energia uvoľňuje formou tepla¹², ktoré môže mať tiež biocídny účinok. Tohoto fototermálneho efektu využívajú napríklad metalorganické nanočastice na báze uhlíku a Ag₂S⁸.

Bolo navrhnutých i komercializovaných mnoho druhov fotokatalytických materiálov na báze keramiky¹³, skla¹⁴, betónu¹⁵, plastov¹⁶ i papiera¹⁷.

2.2 Testovanie antimikrobiálnych vlastností fotokatalytických povrchov

V súčasnosti existuje len zopár metód hodnotenia biocídnej aktivity fotokatalytických povrchov. Normované metódy typicky využívajú hodnotenie pomocou mikrobiálnych kultúr^{18,19}. Techniky mikrobiálnej kultivácie využívajú úbytku životaschopných MO vplyvom biocídnych efektov fotokatalyzátora, kedy sa na skúmaný materiál nanášajú mikrobiálne suspenzie a preživšie MO sa potom inkubujú a nakoniec stanovujú pomocou kolorimetrických, kultivačných či počítačích metód. Jednou z možných metód hodnotenia antimikrobiálnych účinkov, je metóda stanovenia viability MO pomocou resazurínu^{20,21}. Výsledné počty preživších MO sa vyjadrujú pomocou jednotiek tvoriacich kolónie na jednotku objemu (CFU/ml). Táto hodnota sa potom porovná s hodnotou stanovenej koncentrácie MO vystavených povrchu neaktívneho fotokatalyzátora (bez excitačného žiarenia), na základe čoho sa potom vyhodnotí účinnosť antimikrobiálneho efektu skúmaného materiálu¹⁹.

2.2.1 ISO 27447:2019

Norma ISO 27447:2019 špecifikuje testovaciu metódu pre stanovenie antimikrobiálnej aktivity materiálov s fotokatalytickými účinkami. Neslúži však na stanovenie antifungálnej a antivírusovej aktivity. Norma je určená pre rôzne druhy polovodičových látok používaných v konštrukčných materiáloch rôznych tvarov (ako napríklad: ploché dosky alebo textílie), nezahŕňa však práškové, granulované alebo porézne materiály s fotokatalytickými vlastnosťami. Táto metóda spočíva v aplikácii bakteriálnej suspenzie (napríklad: suspenzia *Escherchia Coli*) na skúmanú vzorku fotokatalytického materiálu a následne je vzorka vystavená vhodnému žiareniu v závislosti od použitého fotokatalyzátora. Po určitej dobe pôsobenia žiarenia sú zo vzorky baktérie vymývané. Na záver sa stanovuje početnosť baktérií agarovej dilučnej metódy. Zároveň s týmto stanovením, prebieha paralelný experiment bez prístupu svetla, aby bolo možné určiť skutočný účinok fotokatalyzátora. Nakoniec, po vyhodnotení viability baktérií v oboch experimentech, sa pokusy porovnávajú a následne sa vyhodnotí účinnosť biocídnych účinkov fotokatalyzátora²².

2.2.2 ISO 22196:2011

Norma ISO 22196:2011 štandardizuje postup stanovenia antibakteriálnej aktivity na všeobecne neporéznych povrchoch a zároveň sa zameriava na testovanie povrchoch a materiálov používaných v odvetviach priemyslu ako stavebníctvo, potravinárstvo, zdravotníctvo a domácnosti. Cieľom je poskytnúť univerzálnu testovaciu metódu na posúdenie biocídnych vlastností týchto povrchoch a materiálov.

Tento postup posudzovania antimikrobiálnych účinkov využíva dva bakteriálne kmene, a to *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*, ktoré sa bežne používajú ako modelové mikroorganizmy, vďaka ich bežnému výskytu v prostredí. Testovaný materiál je pripravený a sterilizovaný podľa stanovených postupov a vzorky sú miestnené do Petriho misiek s nanesenou bakteriálnou suspenziou. Takto pripravené vzorky sú následne umiestnené do inkubačnej komory na dobu 24 hodín. Po uplynutí inkubačnej doby sa stanovuje viabilita mikroorganizmov metódou kultivácie na platni, ktorá sa musí inkubovať ďalších 40 až 48 hodín. Mikroorganizmy, ktoré zostávajú na povrchu sa počítajú, z čoho sa vypočíta miera redukcie mikroorganizmov. Testovanie sa vykonáva pri 24 až 48 hodinových kontaktných intervaloch, a to v niekoľkých opakovaníach. Na záver je možné pomocou výsledkov vyhodnotiť účinnosť skúmaných materiálov a navzájom ich porovnávať. Norma zahŕňa i pokyny na hodnotenie vplyvu faktorov prostredia ako napríklad pH a teplota¹⁸.

2.3 Escherichia Coli

Escherichia Coli je jedným z najviac študovaných organizmov a má významný podiel vo vývoji mnohých fundamentálnych konceptov v biológii. *E. coli* je často využívaná v biochemickom a genetickom výskume²³. Je súčasťou normálnej mikroflóry cicavcov, kde tvorí prevládajúci typ fakultatívnych mikróbov gastrointestinálneho traktu. Má vplyv na ustavenie normálnej mikroflóry ale aj pri šírení chorôb²⁴. *E. coli* je gramnegatívny organizmus triedy *bacillus*, tyčinkovitého tvaru s rozmermi 1 μm na dĺžku a 0,35 μm na šírku, hoci rozmery sa môžu značne líšiť v závislosti od kmeňa a podienok prostredia²⁵. Na povrchu môže disponovať útvarmi ako bičíky, ktoré používa k pohybu alebo vlásoknicami, ktorými sa môže prichytiť k povrchu iných mikroorganizmov/buniek²⁶. Z hľadiska ekológie je *E. coli* fakultatívny aeróbný organizmus (v prítomnosti kyslíka vyoužíva aeróbnej respirácie alebo využíva

fermentáčnej dráhy v jeho neprítomnosti), ktorý využíva redoxný stav zásoby chinónu a podľa dostupnosti kyslíka môže aktivovať alebo potlačiť metabolické enzýmy respiračných metabolických dráh²⁷. *E. coli* a iné enterobaktérie môžu byť považované za prvé mikroorganizmy, ktoré kolonizujú tráviacu sústavu ľudí (črevá) vďaka schopnosti metabolizovať kyslík resp. fermentovať iné zlúčeniny, pretože tieto fakultatívne baktérie zkonsumujú zvyšný kyslík v tomto prostredí a následne môžu striktne anaeróbne baktérie kolonizovať prostredie čriev, čím sa *E. coli* stáva dominantným mikroorganizmom normálnej ľudskej mikroflóry²⁸.

Kmene typické pre laboratórnu kultiváciu sú nepatogénne a rýchlo rastú v širokom spektre kvapalných a tuhých médií. Ako organizmus kmeňa enterobaktérií, rastie *E. coli* optimálne pri 37 °C v aeróbných podmienkach. V tuhom médiu a znížením teploty na 4 °C je možné predĺžiť dobu skladovania kultúry až po dobu 3 mesiacov, čo však môže viesť k zníženiu jej životaschopnosti. *E. coli* je však možné skladovať po neobmedzenú dobu v roztoku glycerolu (30 hm.%) pri –80 °C. Typická kultivácia prebieha pri hodnote pH 7,0. Pri ideálnych podmienkach (t. j. 37 °C, pH 7,0; prevzdušňovanie a bohaté tekuté médium/bujón) je možné dosiahnuť rýchly rast, kedy je čas zdvojnásobenia počtu buniek približne 20 minút²⁹. *E. coli* je schopná využívať niekoľko alternatívnych zlúčenín ako zdroj uhlíka, avšak preferovaným zdrojom je glukóza. Pravdepodobne najučinnejší fyzikálne-chemickým faktorom spôsobujúcim inaktiváciu alebo usmrcovanie *E. coli* je UV žiarenie³⁰.

Tomuto organizmu však chýba veľa významných vlastností pre použitie v biotechnologických aplikáciách, ako sú viabilita a rast pri extrémnych teplotách alebo pH, schopnosť degradovať toxické zlúčeniny, nečistoty v prostredí, či polyméry²⁶.

2.4 Hydrogély

Hydrogély sú trojrozmerné siete polymérnych materiálov, ktorých reťazce sú vysoko hydrofilné tak, že sú schopné asociovať s veľkým množstvom vody (od 10–20 % do tisíc-násobkov hmotnosti samotného (suchého) polyméru) bez procesu rozpúšťania reťazcov³¹. Hydrogély možno rozdeliť do dvoch skupín, na základe ich chemického alebo fyzikálneho charakteru väzby medzi jednotlivými reťazcami polyméru. Chemické hydrogély majú tieto väzby pevné a stabilné. Zatiaľ čo fyzikálne siete majú väzby dočasné a vznikajú priestorovým prepletením reťazcov alebo fyzikálnou interakciou (iónové interakcie, vodíkové

väzby či hydrofóbne interakcie)^{31,32}. Jednou z najdôležitejších vlastností hydrogélou je schopnosť botnať (absorbovať vodu). Keď je suchý hydrogél vystavený vodnému roztoku, molekuly vody prenikajú do matrice a hydratujú najprv najviac polárne, hydrofilné skupiny či domény polyméru, čo vedie k tzv. primárne viazanej vode. Počas hydratácie hydrofilných skupín hydrogélová sieť botná (zväčšuje svoj objem), a teda sa botnaním sieť rozvoľňuje. V botnajúcej polymérnej sieti sa hydrofóbne skupiny stéricky vystavujú vodnému prostrediu a následne sa tiež prelínajú (prepletávajú) s molekulami vody pričom vzniká hydrofóbne viazaná voda alebo tzv. sekundárne viazaná voda. Primárne a sekundárne viazaná voda sa spoločne označuje ako celková viazaná voda. Dôsledkom saturácie celkovou viazanou vodou je vznik osmotickej hnacej sily a systém tak absorbuje prebytočné množstvo vody. Takto absorbovaná voda sa označuje ako voľná a predpokladá sa, že vyplňa priestor medzi reťazcami polyméru a/alebo vyplňa priestor rôzne veľkých pórov. Takýto hydrogél botná až do dosiahnutia rovnováhy. Pokiaľ je polymérna sieť alebo väzby medzi reťazcami degradabilné, hydrogél sa začína rozpadáť a rozpúšťať rýchlosťou závislou na zložení systému³¹. Botnacie vlastnosti je možné posudzovať pomocou jednoduchkej gravimetrie.

Mechanické vlastnosti hydrogélou môžu byť v objeme celého vzorku heterogénneho charakteru a môžu sa meniť v závislosti od povahy použitého materiálu a mechanizmu sieťovania. Mechanické vlastnosti sú dôsledkom hustoty zosieťovania. Zvýšením tejto hustoty je možné pripraviť hydrogély vynikajúcou tuhosťou. Naopak znížením hustoty zosieťovania je možné získať hydrogél flexibilnejší hydrogél. Zmeny mechanických vlastností závisia na širokej škále premenných ako napríklad: Youngov, Poissonov, elastický a viskózný modul. Tieto vlastnosti je možné skúmať pomocou Dynamickej Mechanickej Analýzy (DMA) a oscilačnej reometrie. Toto sú výkonné a bežne využívané nástroje pre štúdium viskoelastického správania polymérov. Jedná sa o meranie odozvy materiálu na oscilačné napätie. Fázové oneskorenie medzi aplikovaným a nameraným napätím vypovedá o tendencii materiálu k toku (viskozitný modul), zatiaľ čo obnovenie štruktúry materiálu vypovedá o tuhosti (elastický modul)³³.

2.4.1 Fyzikálne hydrogély

Hydrogély môžu byť sieťované prostrednítvom fyzikálnych (reverzibilných) interakcií, medzi ktoré patria: molekulárne (stérické) prepletenie reťazcov alebo fyzikálne-chemické interakcie. To sú napríklad: vodíkové väzby, hydrofóbne interakcie, kondenzácia nábojov alebo supramolekulárnymi asociáciami. Interakcie, ktoré sa vyskytujú v tomto type hydrogélův sú slabého charakteru. Sú však prítomné vo veľkom počte aj u permanentných sietí a tak významne prispievajú ku komplexnejšiemu charakteru systému. Interakcie fyzikálne sieťovaných hydrogélův výrazne závisia od vonkajších podmienok (pH, iónová sila, zloženie rozpúšťadla alebo teplota). Umožňujú tak širokú všestrannosť použitia s ohľadom na životné prostredie, pretože na rozdiel od kovalentne sieťovaných materiálov nie je potrebné používať často toxické sieťovacie činidlá, ktoré môžu byť často v štruktúre polymérnej siete inkorporované. Fyzikálne systémy získavajú popularitu v biomedicínskych aplikáciách a potravinovom priemysle vzhľadom na ich jednoduchú prípravu a bez nutnosti odstraňovania toxických činidiel^{32,34}.

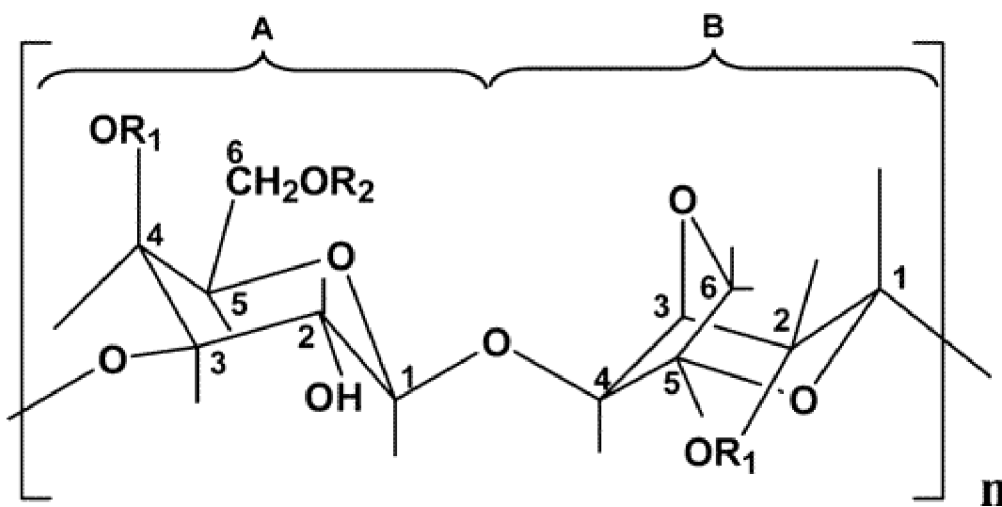
Fyzikálne hydrogély je možné získať rôznymi stratégiami, medzi ktoré patria: sieťovanie zahrievaním/chladnutím, iónové interakcie, koacervácia komplexov (elektrostatické interakcie opačne nabitých komplexných zlúčenín/polymérov), vodíkové väzby, pomocou amfifilných graft- či blokových makromolekúl, sieťovanie kryštalizáciou, proteínové interakcie, stereo komplexácia, zmrazovanie-rozmrazovanie^{32,34-36}.

Hydrogély na báze agarózy

Agaróza je prírodný polysacharid rastlinného pôvodu získavaný z červených morských rias (Rhodophyceae). Tento lineárny polymér je zložený z (1-3)-viazaných agarobiózových jednotiek β -D-galaktopyranózy (1-4)-viazaných na 3,6-anhydro- α -L galaktopyranózu, ktoré sú zložkami galaktánu^{37,38} (Obr. 1). Agaróza sa vyznačuje netoxickým charakterom, ľahkou dostupnosťou, nízkou cenou a jednoduchým mechanizmom gelácie. Má tiež veľmi dobrú tepelnú citlivosť. Vo všeobecnosti je rozpustná vo vode pri 90 °C a vytvára hydrogél pri schladnutí pod 40 °C³⁸. Po ochladení veľmi rýchlo prechádza fázovým sol-gél prechodom a vytvára trojrozmernú sieť. Tam jednotlivé reťazce agarózy najskôr vytvárajú štruktúru dvojitéh helixov (špirál) stabilizované vodíkovými väzbami. Ďalšie chladenie vedie

k agregácii vytvorených helixov, čoho dôsledkom je fyzikálne zosieťovaný systém hydrogélovej siete agarózy. Výhodou je, že proces nevyžaduje použitie iných sieťovacích činidiel, avšak vyvolanie kovalentného sieťovania môže viesť k lepším mechanickým vlastnostiam³⁹. Vďaka hustej trojrozsomernej sieti a rýchlej kinetike gélovacieho procesu, vytvára agaróza odolné a zároveň vysoko elastické gély⁴⁰. Na rozdiel od karagenanov, nemá agaróza sulfátové skupiny⁴¹.

Agaróza je bežne používaná v biomedicínskych aplikáciách, ako napríklad bunková terapia, kontrolované uvoľňovanie liečivých látok a tkanivové inžinierstvo. Vďaka biokompatibilite agaróza nevyvoláva imunitnú odozvu organizmov⁴⁰.

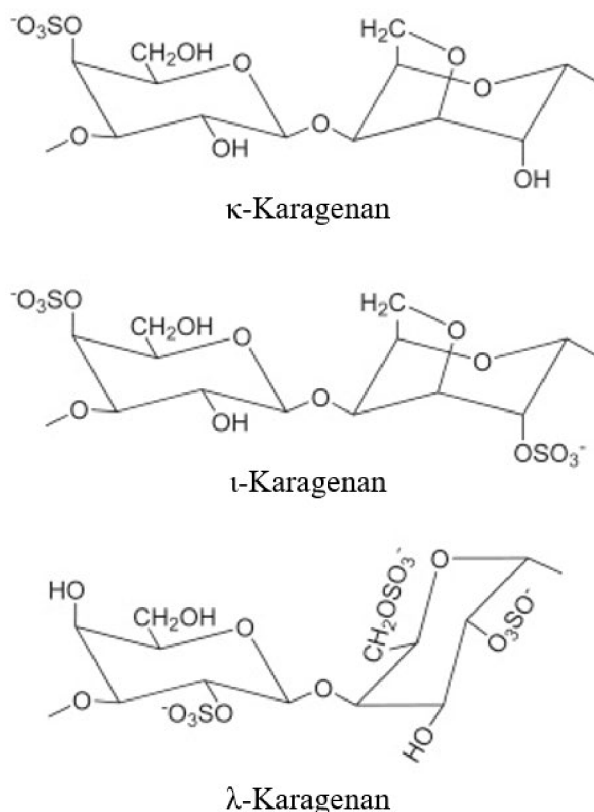


Obr. 1: Idealizovaná štruktúra AB opakujúcich sa jednotiek agarózy. (A) 1,3-viazaný β -D-galaktózový zvyšok; (B) 1,4-viazaný 3,6-anhydro- α -L-galaktózový zvyšok. Natívna agaróza: $R_1=R_2=H$ ⁴²

Hydrogély na báze karagenanu

Karagenany sú skupina lineárnych sulfonovaných polysacharidov extrahovaných, rovnako ako agaróza, z červených morských rias. Existujú tri hlavné typy karagenanu: κ -, ι - a λ -karagenany. Tieto rôzne druhy polysacharidov sa líšia podľa počtu a polohy sulfonových skupín (Obr. 2), ale žiaden komerčný proces prípravy karagenanov nemá presne definovanú štruktúru produktu, ktorého pomenovanie závisí na prevládajúcom type obsiahnutého polysacharidu. κ -karagenan je zložený zo striedajúcich sa α -(1,3)-D-galaktózo-4-sulfátových a β -(1,4)-3,6-anhydro-D-galaktózových jednotiek (monosacharidov). ι -karagenan sa skladá z α -(1,3)-D-galaktózo-4-sulfátových a β -(1,4)-3,6-anhydro-D-galaktózo-2-sulfátových

jednotiek. λ -karagenan sa líši od κ - a ι - tým, že má disulfované-D-galaktóзовé zvyšky a nemá 4-sulfátové esterové skupiny ale má meniace sa množstvo 2-sulfátových esterových skupín.



Obr. 2: Idealizovaná štruktúra opakujúcich sa jednotiek κ -; ι - a λ -karagenanov⁴³.

Karagenany gélujú pri procese chladnutia a objasneniu mechanizmu gelácie boli venované mnohé štúdie. Všeobecné vysvetlenie je, že gelácia karagenanov, najmä κ -, zahŕňa dva samostatné a po sebe nasledujúce kroky; po ochladení prechádza konformácia štruktúry z cievky na helix a následne dochádza, vďaka iónovým interakciám, k agregácii medzi helixami vďaka katiónom prítomným vo vodnom roztoku⁴⁴. κ -a ι - karagenan tvoria termoreverzibilné gély ochladzovaní horúcich vodných roztokov, zatiaľ čo λ -karagenan negéluje takmer vôbec. Zvyšujúci sa počet sulfátových skupín znižuje schopnosť gelácie (agaróza > κ -karagenan > ι -karagenan > λ -karagenan). Schopnosť gelácie sa pripisuje rozdielom v iónovej sile jednotlivých polysacharidov⁴¹. Agregácia (konformačná zmena) vplyvom katiónov sa rozdeľuje do troch kategórií, vzhľadom na ich účinok podporujúci prechod z cievky na helix. V prípade κ -karagenanu majú najvyššiu účinnosť nešpecifické monovalentné katióny (Li, Na) potom divalentné katióny (Ca, Mg) a účinnosť najnižšiu účinnosť majú špecifické monovalentné katióny (K, Cs)⁴⁵. U nešpecifických monovalentných a u divalentných katiónov

boli zistené len malé zmeny helix-podporujúcich a -stabilizačných účinkov. Účinnosť špecifických monovalentných katiónov sa líši v rámci veľkých odchyliet. Napriek tomu táto skupina katiónov podporuje interhelikálnu agregáciu a tým i geláciu kappa-karagenanu, a zdá sa, že na tvorbe gélu sa nepodiela žiadna kryštalycká štruktúra⁴⁵⁻⁴⁷.

Podobný prechod z cievky na helixovú konformáciu, bol zistený aj u ι -karagenanu, ale katiónová selektivita je oveľa nižšia, pretože hustota náboja je oveľa vyššia než u κ -karagenanu. Taktiež neexistujú žiadne presvedčivé dôkazy interhelikálnej agregácie ι -karagenanu, čo naznačuje, že miesta viažuce katióny karagenanu sa nepripisujú len sulfátovým skupinám, ale väčší majú vytvorené „dutiny“ pozdĺž helix-štruktúry⁴⁵. Bolo zistené, že sulfátové skupiny len prispievajú k zvýšeniu elektrostatického potenciálu povrchu makromolekuly, pričom lokálna koncentrácia viažucich sa katiónov, sa zvyšuje v blízkosti helix-konforméra⁴⁸.

Ďalší model, tzv. „vláknitý model“, popisuje geláciu katiónovo-závislých polysacharidov tvoriacich helixy, vrátane karagenanu a deacylovanej gellanovej gummy. Model predpokladá, že pri dostatočne vysokých koncentráciách tieto polysacharidy vytvárajú makroskopické sieťové štruktúry dôsledkom tvorby neagregovaných dlhých vlákien, ktoré prenikajú celým objektom, pričom sa nepredpokladá spájanie blízkych interhelikálnych vlákien⁴⁹⁻⁵². Predpokladá sa, že mikroskopická molekulová štruktúra riadi makroskopické reologické vlastnosti polysacharidov, najmä prírodných, vrátane karagenanov, vo vodnom prostredí. Tieto systémy sú heterogénneho charakteru, kvôli ich polydisperzite⁴⁴.

Karagenany sa predovšetkým používajú v potravinárskom priemysle. Slúžia ako zahusťovacie, stabilizačné, a najmä ako texturizačné činidlá, napríklad v mliekarenských výrobkoch⁴⁵. Vďaka netoxicity, biodegradabilite a kompatibilite sa na ne pozornosť upriamuje aj vo farmaceutickom a bioinžinierskom priemysle. Ich fyzikálne-chemické a bioaktívne vlastnosti z nich činia vhodné biomateriály pre transport liečiv a pre rozvoj tkanivového inžinierstva⁵³.

2.4.2 Hydrogélové nosiče mikrobiálnych kultúr

Jednou z hlavných výhod hydrogélů je ich všestrannosť. Tú zabezpečujú ich jedinečné vlastnosti ako sú: porozita, schopnosť botnať, mechanická pevnosť, viskoelasticita/rigidita, permeabilita, mikroenviromentálne snímanie ale najmä biokompatibilita a biodegradabilita. Vďaka týmto vlastnostiam poskytujú hydrogély vhodnú platformu pre širokú škálu mikrobiálnych/antimikrobiálnych aplikácií.

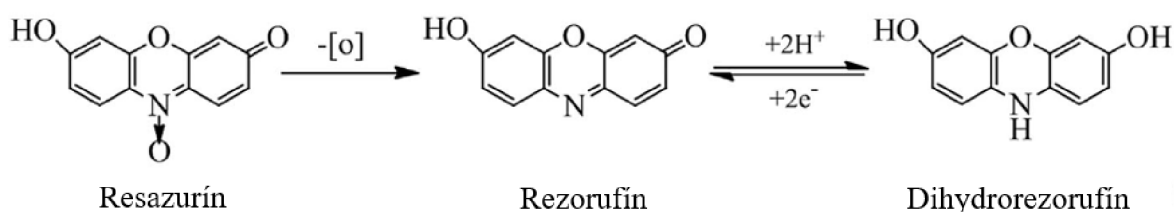
Pre aplikáciu hydrogélů ako nosičův mikrobiálnych kultúr je mikrobiálna adhézia a rast najdôležitejšími vlastnosťami. Vodné prostredie hydrogélů, pórovitosť a možnosť modifikácie ich fyzikálne-chemických vlastností, vytvárajú priaznivé prostredie pre bakteriálnu interakciu a adhéziu. Bakteriálna adhézia na hydrogélóvé povrchy je komplexný proces riadený viacerými faktormi vrátane rigidity hydrogélů, porozity, hrúbky, drsnosti povrchu, hydrofility, živného média a mobility baktérií⁵⁴.

Baktérie zvyčajne adherujú na povrchy spočiatku prostredníctvom „reverzibilnej interakcie“, kedy interagujú s povrchmi interakciami na dlhé a krátke vzdialenosti, ktoré pôsobia medzi baktériami a povrchom hydrogélů. Sily poháňajúce adhéziu zahŕňajú Van der Waalsove sily, elektrostatickú príťažlivosť, Brownov pohyb, gravitačná sila, hydrofóbne interakcie, vodíkové väzby, iónové a dipólové interakcie⁵⁵⁻⁵⁷. Ďalšia fáza adhézie, tzv. „ireverzibilná adhézia“, zahŕňa ukotvenie baktérií na hydrogélóvy povrch dôsledkom sekrécie látok mikroorganizmami, ktoré vytvárajú kovalentné väzby s daným povrchom. Okrem toho túto fázu adhézie riadia aj bunkové štruktúry ako sú: bičik, kapsuly a sliz tvoriace polysacharidy^{55,57}. Je dôležité tiež poznamenať, že mechanizmus adhézie na hydrogély nie je univerzálne aplikovateľný pre všetky bakteriálne druhy a kmene, vzhľadom na jedinečné vlastnosti rôznych druhov. Je však možné manipulovať s vlastnosťami hydrogélů tak, aby bola umožnená adhézia, rast a proliferácia, či tieto vlastnosti upraviť na funkciu úplne opačnú, a baktérie tým eliminovať⁵⁴.

2.5 Resazurín

Resazurín je netoxické, vo vode rozpustné farbivo. Je redukovateľné reakciami transféru elektrónov súvisiacich s respiráciou, na rezorufín. Koncentrácia vo vode rozpustného rezorufínu je ľahko merateľná fluorescenčnou alebo VIS spektrofotometriou⁵⁸.

Znižovaním dostupnosti kyslíka v rámci média, vďaka respirácii mikroorganizmov, resazurín po redukcii mení farbu z modrej, cez ružovú, na čiru⁵⁹. Prvý krok redukcie (viď Obr. 3) je spôsobený stratou kyslíka voľne viazaného na dusík fenoxazínového jadra. Táto zmena na ružový rezorufín nie je vratná oxidáciou atmosférickým kyslíkom a do značnej miery je tento krok nezávislý od redukčného potenciálu a obsahu kyslíka. Druhá fáza redukcie, na bezfarebný dihydrorezorufín, je vratná oxidáciou vzdušným kyslíkom⁶⁰. Resazurín je v roztoku bez MO veľmi stabilný, ale v prítomnosti živých MO sa veľmi rýchlo redukuje. Resazurín je využívaný reductázami respiračného metabolizmu (napríklad NADPH dehydrogenáza) ako elektrónový akceptor, čím sa resazurín redukuje na rezorufín⁵⁸, ktorý vyžaruje intenzívnu fluorescenciu s absorpčným maximom pri $\lambda_{\max} = 590 \text{ nm}$ ²⁰. Resazurín, slúžiac ako fluorescenčný kvantitatívny indikátor, sa používa na hodnotenie viability a bakteriálnej kontaminácie pri skúmaní antimikrobiálnej aktivity^{61,62}.



Obr. 3: Konverzia resazurínu na rezorufín a dihydrorezorufín⁶³.

2.6 Použité laboratórne metódy

2.6.1 Gravimetrické stanovenie botnacích vlastností hydrogéllov – „Tea-bag“ metóda

Rýchlosť botnania je jednou z najdôležitejších vlastností hydrogéllov. Pre stanovenie rýchlosti botnania je potrebné získať hodnoty botnacej kapacity v závislosti na čase. Vo väčšine prípadoch sa hodnoty tejto závislosti získavajú meraním voľnej absorpčnej kapacity v po sebe nasledujúcich časových intervaloch⁶⁴. Voľná absorpčná kapacita v čase S_t je v jednoduchosti percentuálny podiel nadobudnutej hmotnosti kvapaliny absorbovanej hydrogélom a spočíta sa podľa rovnice:

$$S_t = \frac{m_t - m_0}{m_0} \quad (1)$$

kde S_t je voľná absorpčná kapacita; m_t je hmotnosť hydrogéllov v čase t ; a m_0 je hmotnosť suchého hydrogéllov (jeho hmotnosť v čase $t = 0$). Jednotkou je kilogram.

Ako naznačuje názov, v tejto metóde sa používajú čajové sáčky (alebo ich alternatívy) pre jednoduchú manipuláciu pri vkladaní a vyťahovaní hydrogél z botnacieho roztoku, sušení a vážení hydrogél. Pre zvýšenie presnosti váženia sa z hydrogél (a z čajového sáčku) odsaje prebytočná kvapalina pomocou buničiny alebo iného savého materiálu. Nakoniec sú hodnoty S_t vynesené do grafickej závislosti na čase, z ktorej je možné usúdiť vyhovujúci čas botnania na požadovanú úroveň.

2.6.2 UV/VIS spektrofotometrické stanovenie transmitančných vlastností hydrogél

Pre stanovenie optických vlastností sa používa optická spektrometria, ktorá je založená na interakcii svetla a hmoty. UV/VIS spektrofotometria je technika založená na absorpcii svetla neznámou látkou (vzorkou). Vzorka je ožiarená elektromagnetickým žiarením rôznych vlnových dĺžok: viditeľného (VIS) a k nemu tesne priľahlých spektier, t. j. ultrafialové (UV) a časti blízkeho infračerveného (NIR). V závislosti od fyzikálne-chemických vlastností skúmanej látky je svetlo touto látkou čiastočne absorbované. Zvyšné svetlo je transmittované (prepustené) skrz vzorku a zaznamenáva sa ako funkcia vlnovej dĺžky vhodným detektorom. Výsledkom je špecifické absorpčné alebo transmitančné spektrum, na základe ktorého sa dá potom identifikovať skúmaná látka, jej koncentrácia, či transmitančné vlastnosti⁶⁵.

Je potrebné poznať transmitančné vlastnosti hydrogélovej platformy, pretože akonáhle je táto platforma priložená na fotokatalytický materiál, tvorí relatívne hrubú bariéru pre dopadajúce svetlo, ktoré aktivuje daný fotokatalyzátor. Je tak nutné, aby hydrogélová platforma mala dostatočne nízku optickú hustotu do takej miery, aby svetlo prenikajúce skrz platformu interagovalo s fotokatalyzátorom v dostatočnej intenzite pre jeho aktiváciu.

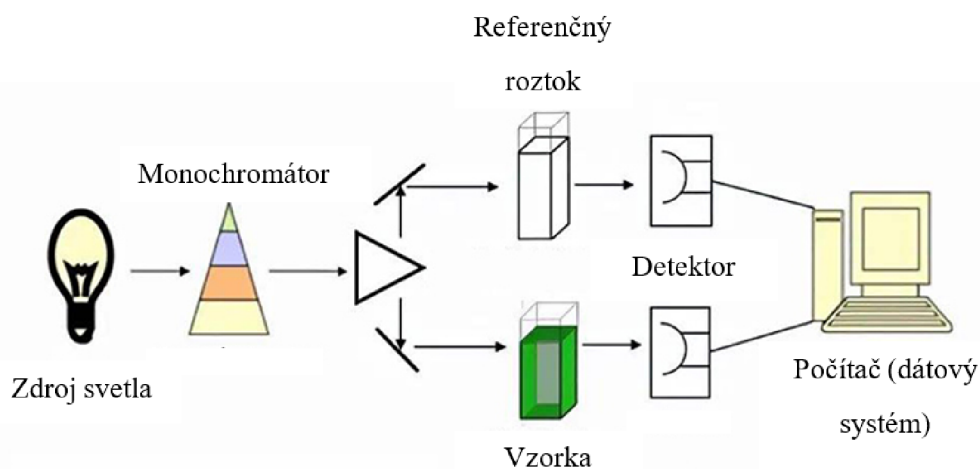
Transmitančné spektrum je možné zmerať na klasickom absorpčnom spektrofotometri v režime transmitancie. Je tiež možné toto spektrum zmerať na spektrofotometri v režime absorpcie, ale je následne nutný prepočet na transmitanciu pomocou úpravy základnej definície absorpcie:

$$A = -\log T \quad (2)$$

kde A predstavuje absorpciu a T je transmitancia.

UV/VIS spektrofotometer zaznamenáva intenzitu svetla prechádzajúceho skrz vrstvu hydrogél umiestneného na krycom sklíčku a porovnáva ju s intenzitou svetla predtým než príde do kontaktu so vzorkou. Hlavnými komponentami UV/VIS spektrofotometru sú: zdroj

svetla, monochromátor a vhodný detektor, ktorého signál je spracovaný počítačom (viď Obr. 4)⁶⁵. Pred samotným meraním vzorky je potrebné nastaviť nulovú hodnotu rozpúšťadla (v prípade kvapalnej vzorky a použitia kyvety) a jeho zmeranie slúži ako referencia. V praxi sú najpoužívanejšie spektrofotometre, ktoré používajú buď jednu alebo dve optické dráhy. V prípade použitia dvojlúčového spektrofotometra, prístroj meria súčasne blank aj vzorku, avšak stále je potrebné prístroj vynulovať na dané rozpúšťadlo. Druhým typom je spektrofotometer s jednou optickou dráhou, kedy sa najprv prístroj vynuluje na referenčné rozpúšťadlo a až následne je možné zmerať samotnú vzorku.

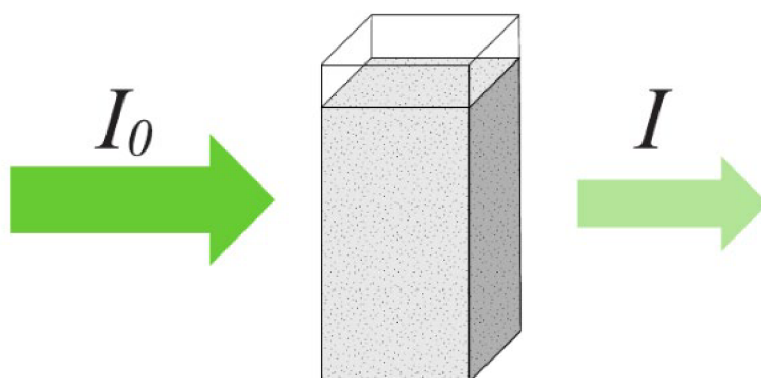


Obr. 4: Zjednodušená konštrukcia dvojlúčového UV/VIS spektrofotometru⁶⁶.

Detektor zaznamenáva intenzitu prechádzajúceho svetla vzorkom (I) a porovnáva ho s intenzitou zdrojového svetla (I_0) (Obr. 5) podľa vzťahu:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3)$$

kde $T\%$ je percentuálna transmitancia.

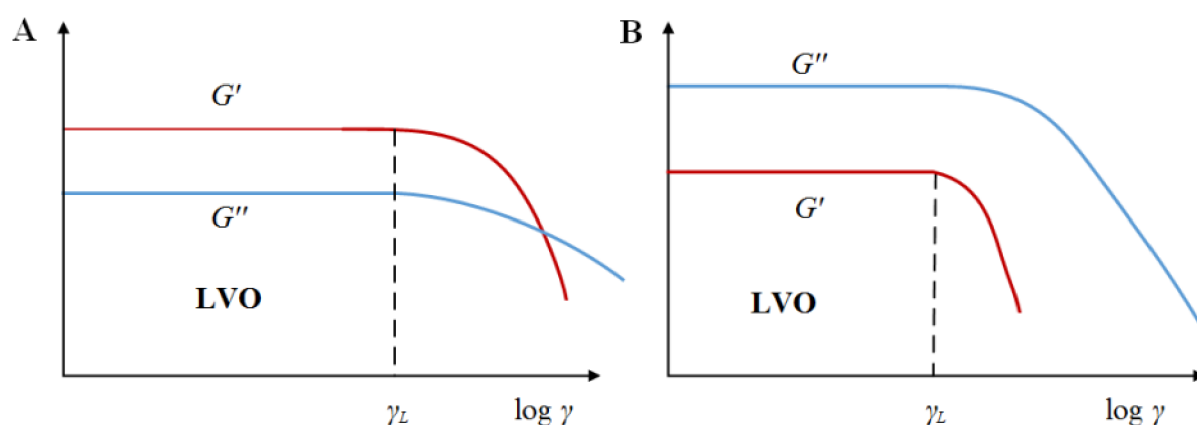


Obr. 5: Zoslabenie svetla absorpciou molekulami vzorku v kyvete⁶⁵.

2.6.3 Stanovenie mechanických vlastností pomocou oscilačného amplitúdového testu

Výsledky amplitúdových testov sú závislosti viskoelastických veličín, najčastejšie elastického (G') a viskózneho (G'') modulu, na zvyšujúcej sa amplitúde deformácie γ pri konštantnej frekvencii oscilácie senzoru^{67,68}. Tieto moduly poskytujú informácie o Newtonovskom správaní kvapalín, či o lineárne viskoelastickej oblasti (LVO) skúmaného materiálu (Obr. 6). Pri nízkych hodnotách deformácie sú oba tieto moduly konštantné, t. j. nezávislé na aplikovanej deformácii; a táto oblasť sa nazýva LVO^{67,68}. V tejto oblasti môžu nastať tri situácie:

- A) $G' > G''$: typické pre pevné, polotuhé a gélovité materiály (Obr. 6 A);
- B) $G' < G''$: správanie typické pre kvapaliny, ktoré nevytvárajú chemickú ani fyzikálnu sieť (Obr. 6 B);
- C) $G' = G''$: stav označovaný ako „at the gel point“, materiál sa nachádza na pomedzí vlastností kvapaliny a tuhého telesa.



Obr. 6: Závislosť elastického G' a viskózneho G'' modulu na amplitúde deformácie⁶⁹.

Zvyšovaním pôsobenia napätia dochádza (v bode prekríženia kriviek G' a G'') ku gel-sol transformácii, a materiál pri hodnotách $G'' > G'$ začína vykazovať správanie kvapaliny⁷⁰. Hodnota amplitúdy deformácie, pri ktorej končí LVO sa nazýva limitná amplitúda deformácie γ_L . Pri nižších hodnotách ako je γ_L , dochádza k elastickej deformácii. To znamená, že materiál je schopný kompenzovať vyvolanú deformáciu uložením deformačnej energie, do energie väzieb, a vráti sa do pôvodného stavu. Pri vyšších hodnotách amplitúdy deformácie dochádza k nevratnej zmene štruktúry, t. j. neelastickej deformácii, pri ktorej je energia

deformácie disipovaná (napr. vo forme tepla) a materiál tak už nie je schopný návratu do pôvodného stavu. Dochádza tak k nevratnému poškodeniu štruktúry materiálu⁶⁷⁻⁶⁹.

Hodnoty G' a G'' je možné vyjadriť ako zmiešaný, tzv. komplexný (G^*) modul, podľa vzťahu⁷¹:

$$|G^*| = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad (4)$$

Pomocou komplexných modulov je možné vypočítať priemernú veľkosť pórov a hustotu sieťovania (uzlov) polymérnej matrice v natívnej podobe (t. j. vo vodnom prostredí)⁷², z čoho je možné usúdiť, či nanosené baktérie sú schopné preniknúť povrchom a difundovať do objemu matrice.

Pre výpočet hustoty sieťovania je potrebné najprv vypočítať aritmetický priemer komplexného modulu v LVO. Nie je možné počítať tento priemer mimo oblasť LVO, pretože za LVO sa považujú hodnoty modulu v lineárnej oblasti s odchýlkou menšou ako 5 %⁷³. Naopak, pri štatistickej odchýlke vyššej ako 5 % sa uvažuje o deformáciách neelastických, t. j. nevratných, a hustota siete je tak ovplyvnená deformačnou zmenou štruktúry. Hustotu sieťovania (ρ_x) je možné vypočítať dosadením priemernej hodnoty komplexného (\bar{G}) modulu do rovnice⁷²:

$$\rho_x = \bar{G} / RT \quad (5)$$

kde R je univerzálna plynová konštanta; T je absolútna teplota; a jednotkou je $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ („látkové množstvo“ uzlov siete na jednotku objemu hydrogélu). Vďaka hustote sieťovania ρ_x a predpokladu, že skutočné póry sú nahradené modelom ideálnej homogénnej siete tvorenou súborom gúľ, ktorých priemer je ekvivalentný s priemerom skutočných pórov⁷⁴, zavedením *Avogadrovej konštanty* ($1/\rho_x N_A$) pre výpočet objemu jedného uzlu; je možné vypočítať objem póru, ktorý odpovedá:

$$\frac{4}{3} \pi \left(\frac{\xi_a}{2} \right)^3 = \frac{1}{\rho_x N_A} \quad (6)$$

kde N_A je *Avogadrova konštanta*. Riešením rovnice (6) pre ξ_a je vzťah:

$$\xi_a = \sqrt[3]{6 / \pi \rho_x N_A} \quad (7)$$

a po dosadení číselných hodnôt sa získa priemerná veľkosť pórov⁷².

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

3.1 Stanovenie mikrobiálnych populácií farbivými technikami

Stanovenie mikrobiálnych populácií je kľúčovým aspektom hodnotenia aktivity fotokatalytických materiálov s biocídnymi účinkami, vzhľadom k tomu, že viabilita MO je priamym dôkazom funkčnosti takýchto materiálov. Pre stanovenie MO populácií bolo vyvinutých mnoho metód. Najpoužívanejšie techniky zahŕňajú použitie farbív, vďaka ktorým je možné rozlíšiť životaschopné a mŕtve MO na základe integrity membrán a metabolickej aktivity⁷⁵. Medzi tieto metódy patrí: MTT⁷⁶, MTS⁷⁷ a NBT⁷⁸ testy, LIVE/DEAD farbenie⁷⁹ a testy založené na fluorescenčných sondách⁸⁰.

Princípom kolorimetrického stanovenia pomocou tetrazoliových farbív (MTT, MTS a NTB) je premena pôvodného farbiva (vďaka redučným reakciám mitochondriálnych enzýmov dýchacieho reťazca mikroorganizmov) na formazanové deriváty, ktoré sa usádzajú v bunkách vo forme nerozpustných častíc. Potom je nutné MO, s obsahom týchto produktov (farbiva), dezintegrovať a farbivo extrahovať, rozpustiť a následne fotometricky stanoviť^{76-78,81}.

LIVE/DEAD farbenie sú testy opäť založené na kolorimetrickom rozlíšení (ako vypovedá aj samotný názov) životaschopných a uhynutých mikroorganizmov⁷⁹. Jedná sa o komerčne dostupné sady farbív, ktorých použitie zahŕňa postupy dvojitého farbenia (použitie 2 farbív) fluorescenčnými látkami, ako sú SYTO9 a propidium jodid (PI), vďaka ktorým je možné rozlíšiť viabilné MO na základe integrity bunecných membrán^{79,82,83}. Napríklad M. Berney a kol. použili LIVE/DEAD™ BacLight™ farbiacu súpravu v kombinácii s prietokovou cytometriou pre stanovenie viability baktérií obsiahnutých v sladkovodných systémoch a boli schopní identifikovať prítomnosť bakteriálnych kmeňov: *Escherchia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Enterococcus faecalis*⁷⁹. J. Robertson a kol. boli schopní optimalizovať a zjednodušiť protokol použitia LIVE/DEAD™ BacLight™ súpravy v aplikácii fluorescenčného stanovenia viability pomocou prietokového cytometru, spektrofluorometru, mikrodoštičkového analyzátoru a systému Optrode (spektroskopický systém na báze optických vlákien vyvinutý na univerzite v Aucklande)⁸². Okrem toho sa tieto techniky farbenia viabilných MO používajú pri vyhodnocovaní životaschopnosti baktérií v rôznych prostrediach ako sú vodné systémy⁷⁹ a biofilmy⁸⁴; a sú tiež využívané v toxikológii, napríklad pri hodnotení cytotoxicity látok ako sú mykotoxíny⁸⁵.

Všetky farbiace techniky stanovenia MO založené na premene rezazurínu na rezorufín využívajú skutočnosti, že rýchlosť tejto konverzie koreluje s metabolickou aktivitou testovanej bakteriálnej populácie. Treba však poznamenať, že rôzne miery metabolickej aktivity pozorované počas testu môžu byť ovplyvnené rôznymi stavmi identických populácií alebo identických stavov rôznych mikrobiálnych kmeňov. Konvenčný prístup využíva konštantnú populáciu testovaných MO počas celého testu a ich interakciu s rôznymi vonkajšími vplyvmi počas doby testu. Následuje kvantitatívne stanovenie množstva rezorufínu vyprodukovaného počas testu. Príklady testov vykonávaných konvenčným spôsobom zahŕňajú štúdie C. N. Bakera a kol.⁸⁶; a M. U. Shiloha a kol.⁶¹. Resazurínové testy slúžia najmä pre hodnotenie antimikrobiálnej aktivity^{87,88}, bakteriálnej kontaminácie a viability MO, pretože oproti ostatným metódam (ako napr. MTT) ponúkajú testovanie bez narušenia viability stanovovaných MO⁸⁹. Táto metóda bola široko používaná pre stanovenie minimálnej inihibičnej koncentrácie (MIC) prírodných (esenciálne oleje⁹⁰, živočíšne extrakty⁹¹) i syntetických⁸⁸ antimikrobiálnych látok pôsobiacich na rôzne bakteriálne kmene²¹. A. Walzl a kol. boli schopní pomocou resazurínových testov rozlíšiť účinnosť cytotoxínov a cytostatík na tumorové a rakovinové bunky⁹². Resazurínové testovanie ukazuje všestrannosť a spoľahlivosť aj pri hodnotení dezinfekčných látok proti biofilmom⁵⁹; a pri monitorovaní viability a proliferácii buniek v systémoch buniek enkapsulovaných v hydrogélach⁹³.

3.2 Odtlačkové vzorkovanie bakteriálnych populácií

Veľmi dôležitým faktorom pre účinné stanovenie koncentrácie MO je spôsob mikrobiálneho vzorkovania. Vo všeobecnosti existujú tri metódy, sú to: sterové, oplachové a odtlačkové. Každá z týchto metód má výhody a svoje uplatnenie. Napríklad sterové techniky sú široko používané pri vzorkovaní väčších povrchoch a sú tiež vhodné pri vzorkovaní rôzne štrukturovaných súvislých povrchov⁹⁴. Avšak výzkumy ukázali, že pomery recovery u sterových techník sa líšia v závislosti od typu baktérií, s vyšším recovery pri gram-pozitívnych⁹⁵. Ďalej metódy oplachovania sú vo všeobecnosti preferované, pretože majú vyššie recovery a DGGE profily oproti sterovým metódam⁹⁴. Odtlačkové metódy sú používané v prípade potreby rýchlej identifikácie bakteriálnych kmeňov, najmä patogénov ako *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*⁹⁶.

3.3 Aplikčné možnosti hydrogélů

Okrem spomínaných farmaceutických, tkanivových a bioinžinierskych aplikácií ponúkajú hydrogély široké možnosti uplatnenia aj pri mikrobiologickom snímaní, mikrobiálnej kultivácii či selektívnom zachytávaní a triedení MO, pričom sa často tieto funkcie kombinujú⁵⁴. Pri týchto aplikáciách sú veľmi dôležité adhezívne vlastnosti a interakcie hydrogélového povrchu a mikroorganizmov⁹⁷. Používanie rôznych gélových platforiem, najmä na báze agaru, je bežné v rôznych klinických a mikrobiologických testoch⁹⁸ v tzv. agarovo-diskovej difúznej metóde, ktorá bola vyvinutá pred viac ako 80 rokmi⁹⁹. Vo všeobecnosti princípom tejto metódy je inokulácia hydrogélových platní štandardizovaným inokulom testovaných MO. Disky sú následne prekryté filtračným papierom, ktorý obsahuje skúmanú antimikrobiálnu látku, a inkubujú sa za vhodných podmienok. Antimikrobiálna látka difunduje do gélovej platničky a inhibuje rast a proliferáciu skúmaného MO⁹⁸. Existujú komerčne dostupné kultivačné platformy (ako napr. hygicult¹⁰⁰) na báze hydrogélů, ktoré slúžia predovšetkým na mikrobiálnu detekciu kotnaktým vzorkovaním. Tieto platformy by bolo hypoteticky možné použiť pre hodnotenie antimikrobiálnej aktivity, ale zatiaľ neexistujú vedecké publikácie, ktorých autori by sa o to pokúsili. Napriek tomu, že existujú aplikácie hydrogélů pri stanovovaní antimikrobiálnych vlastností, zatiaľ neexistujú publikácie, ktorých autori by využili práve hydrogélové platformy ako nosiče MO kultúr k vyhodnocovaniu biocídnych vlastností materiálov. Hydrogélové platformy priamo určené pre hodnotenie aktivity fotokatalytických biocídnych povrchů taktiež neexistujú. No práve vďaka univerzalite hydrogélů, ich biokompatibilite, netoxicity a podporným efektom mikrobiálneho života, je možné ich aplikovať práve na toto testovanie.

Vďaka širokým možnostiam modifikácie vlastností hydrogélů, boli skúmané hydrogély s možnosťou mikrobiálnej adhézie či už pre detekčné, transportné, farmaceutické alebo bioinžinierske aplikácie. Boli vyvinuté systémy na báze hydrogélů pre selektívne zachytenie baktérií z komplexných zmesí, kde sa veľmi často využíva hojná prítomnosť chemicky reaktívnych skupín v objeme alebo na povrchu polymérnej siete. Selektia mikroorganizmov je zabezpečená vďaka funkčným doménam/skupinám, ktoré môžu byť kovalentne a/alebo fyzikálne (elektrostatické interakcie) imobilizované na povrchu (a/alebo v objeme) hydrogélů. Avšak pre tieto aplikácie sú preferované modifikácie povrchu, pretože poskytujú priamy

kontakt funkčného elementu a povrchovými markermi mikroorganizmov. N. Bodenberger a kol. vytvorili kompozitný hydrogél na báze kovalentne sieťovaného sérového albumínového proteínu, ktorého povrch modifikovali lecitínom B, ktorý slúži rastlinným bunkám a baktériam pre bunkové rozpoznávanie. Týmto boli schopní po kontakte so suspenziou bakteriálnych kmeňov *Escherchia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* zabezpečiť stabilnú imobilizáciu na hydrogélom povrchu¹⁰¹. Príprava takéhoto kompozitu je však nákladná a náročná.

Pre imobilizáciu a cielené zachytávanie MO sa najčastejšie využívajú monoklonálne, polyklonálne a rekombinantné protilátky kovalentne imobilizované na hydrogélom nosiči¹⁰²⁻¹⁰⁵. Sú to glykoproteínové molekuly založené na imunitnej interakcii, ktoré sa nekovalentne viažu na antigény prítomné na povrchu baktérií. Táto metóda sa ukázala byť veľmi účinná, vďaka citlivej a vysoko špecifickej detekcii MO. Avšak výroba býva príliš nákladná, časovo náročná a často dochádza k štruktúrnym variantám v závislosti od vyrobenej šarže. Okrem toho, protilátky podliehajú rýchlej degradácii a tiež vykazujú nízku tepelnú stabilitu, takže sa nedajú príliš dlho skladovať. Avšak čo sa týka metód selektívneho zachytávania pomocou protilátok, ktoré sú špecificky vyrábané pre daný mikrobiálny kmeň, nie sú tieto metódy univerzálne aplikovateľné pre testovanie fotokatalyzátorov. Navyše môžu byť protilátky poškodzované efektom fotokatalyzátoru, nakoľko ich biocídne efekty sa často spoliehajú na reaktívne formy kyslíka^{106,107}. Tieto metódy ale nachádzajú uplatnenie v biosenzoroch, kde je špecifická detekcia nutnosťou¹⁰²⁻¹⁰⁵.

V prípade, kedy sa vyžaduje menej špecifické zachytenie baktérií je možné využiť vlastnosti povrchového náboja baktérií a hydrogélom. Bakteriálne bunky sú negatívne nabité v dôsledku prítomnosti karboxylových a amínových skupín v peptidoglykánových vrstvách. Je teda možné vyvíjať kladne nabité hydrogély, ktoré by mohli poskytnúť elektrostatickú interakciu s baktériami. Takéto hydrogély na báze chitosanu^{108,109} boli vyvinuté pre multifunkčné aplikácie bakteriálnej eliminácie. Na zlepšenie zachytávania baktérií prostredníctvom elektrostatickej príťažlivosti boli chitosanové hydrogély modifikované s použitím glycidyltrimetylamóniumchloridu (GTAC) a glycidylmetakrylátu (GMA)¹⁰⁹. Modifikované chitosanové hydrogély elektrostaticky zachytávali *S. aureus* a *E. coli* a po zachytení vykazovali antibakteriálne účinky v dôsledku prirodzených antibakteriálnych vlastností chitosanu. A práve vďaka antimikrobiálnej povahe chitosanu, ho nie je možné použiť pre hodnotenie fotokatalytickej aktivity, ktorá sa hodnotí práve pomocou viabilty MO.

Je tak nežiaduce aby hydrogél mal negatívne efekty na viabilitu používaných MO. Zachytávanie baktérií elektrostatickými interakciami je jednoduché a rýchle riešenie, ponúka však obmedzený potenciál pre vývoj robustných hydrogélových platforiem na zachytávanie baktérií, skrz nešpecifické interakcie. Okrem toho je elektrostatická adsorpcia slabá v porovnaní so stratégiami chemického zosieťovania v dôsledku reverzibilného nekovalentného zachytávania, ktoré môže znížiť účinnosť zachytávania baktérií. Nakoniec, elektrostatické zachytávanie nemusí byť možné pre multifunkčné kompozitné hydrogély určené na zapuzdrenie rôznych aktívnych prvkov, ako sú redoxné indikátory a živiny. Tie tiež obsahujú nabitú skupinu, ktoré môžu potenciálne interferovať s procesom zachytávania baktérií⁵⁴.

Dôležitými vlastnosťami ovplyvňujúcich bakteriálnu adhéziu na povrch hydrogélů sú: rigidita, porozita, hrúbka, drsnosť povrchu, hydrofilicita, živné médium a bakteriálna mobilita. Mnohé štúdie sú venované skúmaniu týchto parametrov pre zlepšenie bakteriálnej adhézie, avšak s cieľom eliminácie MO (pre biomedicínske aplikácie).

3.3.1 Parametre ovplyvňujúce adhéziu MO na hydrogély

Najviac študovaným parametrom je tuhosť (rigidita) hydrogélů, avšak neexistuje konsenzus o korelácii tuhosti hydrogélů a bakteriálnou adhéziou/rastom. Kolewe a kol. preukázali zvýšenú adhéziu pohyblivých *E. coli* baktérií a nepohyblivých *S. aureus*, zvýšením tuhosti poly(etylénglykoldimetakrylátu) (PEGDMA) a agarózových hydrogélů¹¹⁰. Taktiež demonštrovali vplyv hrúbky poly(etylén glykolového) (PEG) hydrogélů na bakteriálnu adhéziu, kedy bola zistená zvýšená adhézia na hrubších hydrogélůch so zvyšujúcou sa tuhosťou¹¹¹. Zatiaľ čo tieto štúdie naznačujú pozitívnu koreláciu medzi rastom baktérií a zvýšenou tuhosťou a hrúbkou hydrogélů, iné štúdie prinášajú výsledky opačné. Napríklad autori Wang. a kol. zvýšili tuhosť poly(akryl amidových) (PAAm) hydrogélů a pozorovali pokles adhézie *S. aureus* v porovnaní s menej tuhými hydrogélmi PAAm. Táto štúdia preukázala zvýšenie bakteriálnej adhézie pri znížení hustoty zosieťovania u hydrogélů na báze PAAm. Autori tiež naznačujú, že adhezívne vlastnosti hydrogélů sú spolu s tuhosťou spôsobené vlastnými charakteristikami použitého polyméru, najmä vyššou viskoelasticitou v porovnaní s tuhšími hydrogélmi na báze PEG. Tiež zdôrazňujú, že tuhšie hydrogély poskytujú zreteľné 2D rozhranie pevný hydrogél-bakteriálna suspenzia, kde je adhézia prirodzene reverzibilná. Naopak v ultramäkkých hydrogélůch je umožnená bakteriálna

interakcia vďaka 3D mikroprostrediu hydrogélu, ktoré umožňuje penetráciu do poréznej siete, čo je vhodné pre enkapsuláciu MO¹¹².

Bakteriálna adhézia je veľmi komplexný proces, ktorý si vyžaduje individuálny prístup ku každému zloženiu hydrogélovej matrice a použitému MO. Pri výskume bakteriálnej adhézie je potrebné experimentálne skúmať jednotlivé parametry a zamerať sa skôr na praktické znalosti.

Populárny je však vývoj hydrogélů s antimikrobiálnymi vlastnosťami na báze interpenetrovaného systému s organickými, anorganickými látkami či dokonca s biologickými extraktmi. Taktiež samotná polymérna matrica hydrogélu môže pôsobiť ako antimikrobiálna látka tak, že na reťazcoch polymérnej matrice sú naviazané funkčné skupiny s antimikrobiálnymi vlastnosťami (napr. sulfadiazínové bočné reťazce)¹¹³. Organickými látkami môžu byť antibiotiká (napr. nanočastice na báze poly(laktid-ko-glykolidu) s obsahom gentamicínu, enkapsulované v hydrogéli na báze gellanovej gumy)¹¹⁴, syntetické antimikrobiálne látky (napr. ornidazol (derivát nitroimidazolu) inkorporovaný v hydrogéli na báze dextrínu a poly(akrylovej kyseliny)¹¹⁵, antimikrobiálne peptidy (napr. enzymaticky sieťovaný ϵ -poly-L-lyzín). Ako antimikrobiálne látky sa často používajú anorganické látky, akými sú napríklad: kovové nanočastice na báze striebra^{116,117}, zlata¹¹⁸; a nanočastice kovových oxidov ako napríklad ZnO¹¹⁹ či TiO₂¹¹⁷. Veľmi často sa využívajú synergické účinky kovových nanočastíc a/alebo antibiotík (či už syntetických alebo prírodných)¹²⁰. Tieto antimikrobiálne hydrogély sa však nehodia pre skúmanie aktivity fotokatalyzátorov. Avšak venuje sa im obrovská pozornosť, pretože nachádzajú uplatnenie v tkanivovom inžinierstve a krytí rán.

3.4 Nová metodika

Štandardné kultivačné testy predstavujú niekoľko zásadných nevýhod, vrátane časovej a inštrumentálnej náročnosti, nízkej miery robustnosti a závislosti od bakteriálnej kultúry, ktoré je možné kultivovať, čo predstavuje zlomok celkových bakteriálnych kmeňov populácie¹²¹. Okrem toho, pri skutočnom mikrobiálnom vzorkovaní sterovými metódami, môže pri kultivácii dôjsť k selektívnemu uprednostneniu určitých mikrobiálnych kmeňov, čo môže zkrasliť konečné výsledky. Oproti tomu, metóda resazurínového testu hodnotí metabolickú aktivitu MO vrátane tých, ktoré sa nedajú kultivovať, vďaka čomu je možné použiť tento test pre stanovenie

zmiešaných bakteriálnych populácií a poskytuje presné výsledky pri využití fluorescenčného stanovenia.

Pre kvantifikáciu antimikrobiálnych účinkov fotokatalytických povrchov a povrchových modifikácií sa bežne používajú štandardizované postupy podľa uvádzaných noriem ISO v kapitolách 2.2.1 a 2.2.2. Tieto metódy využívajú niekoľkých spoločných princípov, ako napríklad nanosenie mikrobiálnej suspenzie na skúmaný povrch, kde zostáva v kontakte s povrchom počas stanoveného časového intervalu. Následne je mikrobiálna suspenzia opláchnutá z povrchu a počet preživších MO sa stanovuje prostredníctvom sériového riedenia, očkovania a počítania kolónií. Hlavnou nevýhodou týchto techník mikrobiálneho výsevu, je ich časová náročnosť a vysoká spotreba jednorazových plastových pomôcok a dajú sa vyhodnotiť len v laboratórnych podmienkach. To spôsobuje problémy pri testovaní už nainštalovaných a používaných povrchov, kedy by bolo potrebné získať vzorku takéhoto materiálu a jej následné testy v laboratóriu. Získanie vzorky však obnáša zámerné narušenie integrity testovaného materiálu, čo môže predstavovať problém ako v mieste inštalácie tak môže dôjsť k ovplyvneniu vlastností danej vzorky. Okrem toho tieto metódy umožňujú testovanie len malých vzoriek a výsledky sú často zaťažené signifikantnou chybou v dôsledku obmedzenej výťažnosti (recovery) po oplachu a odbere mikrobiálnej suspenzie. Výťažnosti sa pohybujú okolo 50 – 60 % pôvodnej koncentrácie mikrobiálnej suspenzie^{19,122}.

Výhodou novej metodiky je jednoduchšie a rýchlejšie použitie. To zahŕňa testovanie fotokatalyzátorov používaných mimo laboratórne podmienky v priestoroch ich inštalácie a používania bez porušenia ich povrchu alebo vlastností. Je to možné, vďaka mikroorganizmami vysiatej hydrogélovej platforme, ktorá je prenosná do terénnych podmienok a následne vyhodnocovaná v tých laboratórnych. Zároveň nová metodika sľubuje vyššie percentá „recovery“, t.j. pomer počtu baktérií, ktorých viabilita sa skutočne stanovuje, voči počtu baktérií pôvodne nanesených na skúmaný fotokatalytický povrch.

Ďalšími výhodami sú:

- použitie bez nutnosti oplachu mikroorganizmov zo vzorkovacej platformy, čo zabraňuje nepresnostiam merania a zlepšuje recovery baktérií;
- rýchle stanovenie mikroorganizmov do 24 hodín vrátane prípravy nosného hydrogélu;
- možné testovanie ľubovoľne veľkej plochy, použitím vyššieho počtu jednotlivých hydrogelových platforiem pre analýzu jediného súvislého povrchu fotokatalyzátora;

- nižšia spotreba jednorazových plastových pomôcok.

Nová metodika využíva princípu agarózových difúzných diskov, ale mikrobiálna kultúra o známej koncentrácii je vysievaná na hydrogélovú platformu, namiesto nanosenia priamo na fotokatalytický povrch. Hydrogél následne absorbuje kvapalinu bakteriálnej suspenzie, pričom by hydrogél nemal mať priamy efekt na viabilitu daných mikroorganizmov, ale mal by spĺňať len funkciu podporného materiálu (nosiča). Zároveň by nemali mikroorganizmy prenikať do objemu hydrogélu, ale mali by ulpievať len na jeho povrchu. K tomu je potreba dosiahnuť určitého stupňa zosieťovania, aby boli póry menšie, než sú rozmery používaných mikroorganizmov. Je tiež dôležité, aby hydrogélová platforma spĺňala určité mechanické vlastnosti, tak aby bolo možné so vzorkom manipulovať bez narušenia štruktúry.

Hydrogél s adherovanými mikroorganizmami je potom možné priložiť na fotokatalytický povrch, pričom gél by mal mať dostatočnú priepustnosť svetla, aby sa žiarenie dostalo v dostatočnej intenzite na povrch fotokatalyzátora. To by malo zaručiť pôsobenie antimikrobiálnych účinkov skúmaného povrchu. Kontakt medzi MO a povrchom fotokatalyzátora, sprostredkovaný hydrogélovou platformou, by za vhodných svetelných podmienok mal zabezpečiť vymieranie adherovaných mikroorganizmov. Po určitej dobe pôsobenia fotokatalyzátora, by malo byť možné hydrogél odstrániť z aktívneho povrchu, a následne fluorescenčne stanoviť viabilitu mikroorganizmov. Týmto spôsobom je možné vyhodnotiť účinnosť fotokatalyzátora s antimikrobiálnymi vlastnosťami.

Viabilita mikroorganizmov vystavených účinkom fotokatalytického povrchu sa vyhodnotí pomocou modifikovaného rezazurínového fluorescenčného testu. V diplomovej práci S. Patakyovej¹²³ sa ukázalo, že je možné určiť koncentráciu buniek bez potreby kvantitatívneho stanovenia rezorufínu, kedy bolo možné k vyhodnoteniu fluorescencie využiť fotografický záznam a PC software. Tento alternatívny prístup rezazurínového stanovenia zahŕňa použitie rôzne koncentrovaných mikrobiálnych populácií a hodnotenie prostredníctvom kinetiky konverzie rezazurínu na rezorufín. Je teda možné použiť inverzný vzťah medzi koncentráciou buniek a časom potrebným pre dosiahnutie maximálnej fluorescencie. Vysoká koncentrácia baktérií premieňa rezazurín rýchlejšie ako vzorky s nižšou koncentráciou mikroorganizmov. Preto je možné určiť nepriamo úmernú závislosť medzi počtom buniek a časom potrebným pre dosiahnutie maximálnej koncentrácie rezorufínu. Vďaka čomu sa dá zostaviť kalibračná rada a napokon i určiť koncentrácia mikroorganizmov v danej vzorke. Tohoto princípu využíva

i práca E. Trávníčkovej a kol. kde hodnotili antimikrobiálne vlastnosti filtračných membrán z elektrospínaných nanovlákién⁸⁸.

4 CIELE PRÁCE

Prvým cieľom tejto diplomovej práce je dohľadať a preštudovať relevantnú literatúru týkajúcu sa testovania fotokatalytických antimikrobiálnych povrchov pomocou mikroorganizmov. Pretože doposiaľ existujú len dve ISO normy popisujúce hodnotenie fotokatalytických antimikrobiálnych povrchov, ktoré obnášajú radu nevýhod (viď kapitolu 3.4), bola navrhnutá nová metodika, ktorá by všetky uvedené nedostatky odstraňovala. Princípom tejto metodiky je ukotvenie bakteriálnej suspenzie na nosič (hydrogélový bloček) a jeho prostredníctvom sú baktérie prenesené k skúmanému povrchu. Druhým a hlavným cieľom tejto práce bolo navrhnúť vhodné zloženie a vlastností hydrogélového nosiča a štúdium jeho fyzikálnych vlastností a následne preskúmať a posúdiť jeho vhodnosť pri vlastnom testovaní antimikrobiálnych vlastností fotokatalytických povrchov.

V tejto práci sa experimentálne rieši optimalizácia zloženia a postupu prípravy vhodného hydrogélú na základe botnacíh, optických a mechanických vlastností, ale taktiež na základe postupu opakovateľnej prípravy hydrogélových platforiem ako nosičov mikrobiálnych kultúr. Na základe teoretických znalostí a uvedených vlastností, bola z pilotných experimentov vybraná najvhodnejšia kompozícia hydrogélového nosiča na báze vrstveného hydrogélú zloženého z agarózy a ι -karagenanu. Optimalizovaný hydrogélový nosič je podrobený reologickým (pre určenie mechanických vlastností a veľkostí pórov, resp. hustoty zosieťovania), botnácím (pre dostatočne rýchly čas absorbovania MO suspenzie) a spektroskopickým testom (transmitančné vlastnosti pre dostatočnú priepustnosť žiarenia aktivujúce fotokatalytický povrch).

Následne, je pomocou statickej metódy hodnotenia antimikrobiálnych vlastností vybraných povrchov otestovaná funkčnosť optimalizovanej hydrogélovej platformy a výsledky sú porovnané s výsledkami normovaných postupov, získanými od kolegov na našom pracovisku.

5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1 Použité prístroje a chemikálie

Prístroj	Model
3D tlačiareň	Sindoh 3DWOX 1
Magnetická miešačka s ohrevom	Hei-PLATE Mix 'n' Heat Core+, HEIDOLPH
Spektrofotometer	Helios Alpha 9423 UVA 1002E
Analytické váhy	Entris [®] , Sartorius
Reometer	DHR-2, TA Instruments
Inkubátor s orbitálnym šejkrom	ES-20, Biosan
Teplotná skriňa	Venticell 222
Centrifúga	Hettich EBA 30

Chemikálie	Výrobca
Agaróza	Sigma Aldrich
ι-karagenan	Sigma Aldrich
Resazurín	Sigma Aldrich
Chlorid sodný	Penta
Chlorid draselný	Penta
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	Penta
Hydrogenfosforečnan disodný (dihydrát) p.a.	Penta
2,6-dichlorofenolindofenol	Sigma Aldrich
Živné médium s 1% peptómom	Himedia

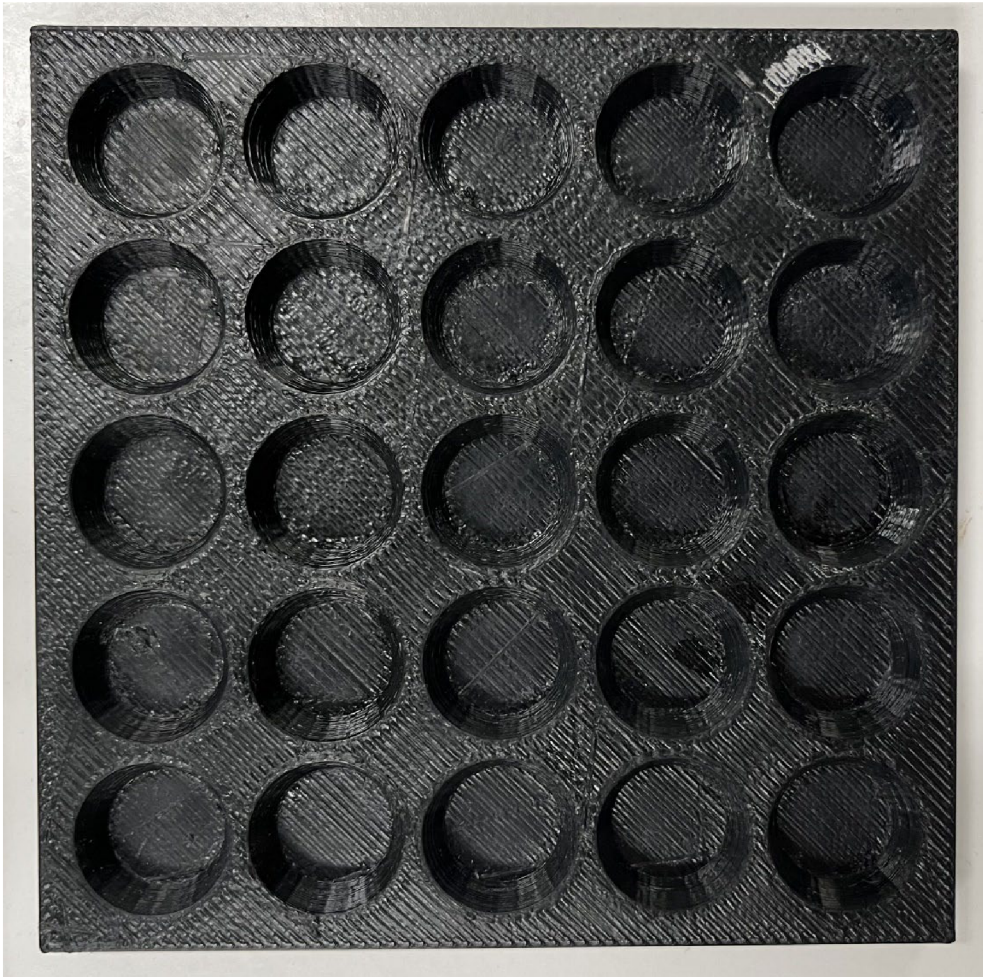
*použité mikroorganizmy Escherichia coli boli tískané z Českej zbierky mikroorganizmov (ccm 3988)

5.2 Príprava hydrogélových kompozícií

Pred prípravou hydrogélových bločkov boli vždy čerstvo navážené a pripravené roztoky polysacharidov (agaróza a ι-karagenan). Pri každom experimente boli vždy používané čerstvo odliate hydrogély.

5.2.1 Návrh a 3D tlač odlievacej formy

Bola navrhnutá formička pre odlievanie hydrogélom pomocou programu SketchUp Free. Formička (Obr. 7) s 25 jamkami o priemere jednej jamky 21 mm a hĺbkou 4 mm bola vytlačená z ABS plastového filamentu 1,75 mm.



Obr. 7: ABS formička vytlačená na 3D tlačiarni.

5.2.2 Príprava vodného roztoku PBS pre rozpúšťanie polymérov

Do odmernej banky s objemom 2000 ml bola pridaná deionizovaná voda v objeme 1600 ml. Na analytických váhach boli navážené chemikálie, ktoré sa postupne pridávali do odmernej banky s vodou. Poradie a prídavky chemikálií sú:

- 16,00 g NaCl
- 0,40 g KCl
- 3,61 g Na₂HPO₄
- 0,49 g KH₂PO₄

Po rozpustení chemikálií bola odmerná banka doplnená deionizovanou vodou po rysku. Následne bol pripravený roztok rozliaty do ôsmich uzatvárateľných fľašičiek po 200 ml. 8 fľašičiek bolo ďalej sterilizovaných v autokláve pri 120 °C po dobu dvoch hodín.

5.2.3 Rozpúšťanie polymérov a odlievanie hydrogélův

Boli pripravené roztoky agarózy (1% hm.) a ι-karagenanu (2% hm.) v PBS (presné navážky sú uvedené v Tab. 1).

Tab. 1: Navážky pre prípravu polymérnych roztokov agarózy a ι-karagenanu

Polymér	Hmotnostná koncentrácia (% hm.)	Navážka (g)	
		Polymér	Roztok PBS
Agaróza	1,00	0,50	49,50
ι-karagenan	2,00	1,00	49,00

Takto navážené roztoky boli následne rozpúšťané vo vodnej kúpeli pri 90 °C na magnetickej miešačke s ohrevom po dobu dvoch hodín. Roztoky boli odlievané do ABS formičky pomocou 1 ml mikropipety a mikropipetovacích špičiek, ktoré boli vyhriate na 85 °C v sušiarňi. Boli pripravené bločky čistého karagenanu a kompozitné hydrogélůvé bločky rôzneho zloženia agarózy : karagenanu (viď Tab. 2).

Vrstvené hydrogélůvé kompozície boli pripravované po jednom kuse tak, že do formičky sa najprv napipetoval horúci roztok agarózy a až potom roztok karagenanu. V prípade

kompozície 1:2 (objemový pomer pipetovaných polymérnych roztokov agarózy a ι-karagenanu) bol po 60 sekundách chladnutia nanosený daný obeh roztoku ι-karagenanu. V prípade kompozície 1:1 agaróza chladla 90 sekúnd. Objem a pomer pipetovaných roztokov sú uvedené v Tab. 2.

Tab. 2: Objemy pipetovaných roztokov polymérov pre jeden hydrogél dvoch kompozícií.

Kompozícia	Celkový objem (μl)	Objemový pomer (-)	Objem polymérneho roztoku (μl)	
A	600	1:2	Agaróza	200
			ι-karagenan	400
B	800	1:1	Agaróza	400
			ι-karagenan	400
C	800	-	ι-karagenan	800

Po nanesení roztoku ι-karagenanu sa nechali hydrogély voľne schladieť po dobu 10 minút, čo zaistilo úplné zosieťovanie. Po ztuhnutí boli hydrogély po jednom vyťahované z ABS formičky pomocou zahnutej kovovej špachtličky.

5.3 Testovanie botnacích vlastností hydrogélů

V tomto prípade bola „Tea-bag“ metóda opísaná v kapitole 2.6.1, modifikovaná a miesto čajového sáčika sa používalo jednoduché kovové sitko, vďaka ktorému sa predíde prebytočnému absorbovaniu kvapaliny čajovým sáčikom. Ak by sa naopak použila zmáčivá textília, ako je to v prípade čajového sáčika, došlo by k absorbovaniu kvapaliny aj týmto materiálom, čo nemusí byť u jednotlivých sáčikov vždy v rovnakom množstve. Botnací roztok sterilného PBS o objeme 50 ml v nízkej kadičke bol vždy vyhrievaný vo vodnej kúpeli na 37 °C. Najprv bola zaznamenaná hmotnosť suchého sitka a následne táto hodnota bola odčítaná od priemernej hmotnosti sitka namočeného a osušeného, podľa postupu uvedeného nižšie, do botnacieho roztoku PBS, čím sa získala priemerná hmotnosť roztoku PBS, ktorý je zachytený len sitkom. Ďalej bola zaznamenaná hmotnosť „suchého“ hydrogélu spolu so sitkom. Následne bol hydrogél v sitku opakovane ponáraný do roztoku PBS po dobu 60 sekúnd v 20 opakovaníach. Medzi každým ponorením je z povrchu hydrogélu a sitka odsatá prebytočná kvapalina jemným priložením buničiny a ihneď zaznamenaná hmotnosť sitka spolu s hydrogélom. Postup odsávania prebytočnej kvapaliny bol pri každom opakovaní prísne

dodržiavaný, aby nedošlo k prebytočnému, či naopak, nedostatočnému odsatiu prebytočnej kvapaliny. Buničina bola priložená na vrchnú stranu hydrogélú len raz, a sítko sa sušilo zo spodnej strany, tak isto buničinou, dokým neostala buničina suchá. Tento postup sušenia sitka bol stanovený na začiatku experimentu, kedy bolo potrebné zaznamenať priemernú hmotnosť kvapaliny ulpenej na sitku. Nakoniec bol získaný súčet hmotností botnaného hydrogélú, sitka a prebytočnej kvapaliny, ktorú nebolo možné odsaf buničinou. Z tohto dôvodu boli výsledné hodnoty korigované tak, aby bola získaná hmotnosť samotného hydrogélú botnaného v daných časových intervaloch. Časová závislosť botnacej kapacity bola získaná dosadením hmotnosti hydrogélú v čase do rovnice (1).

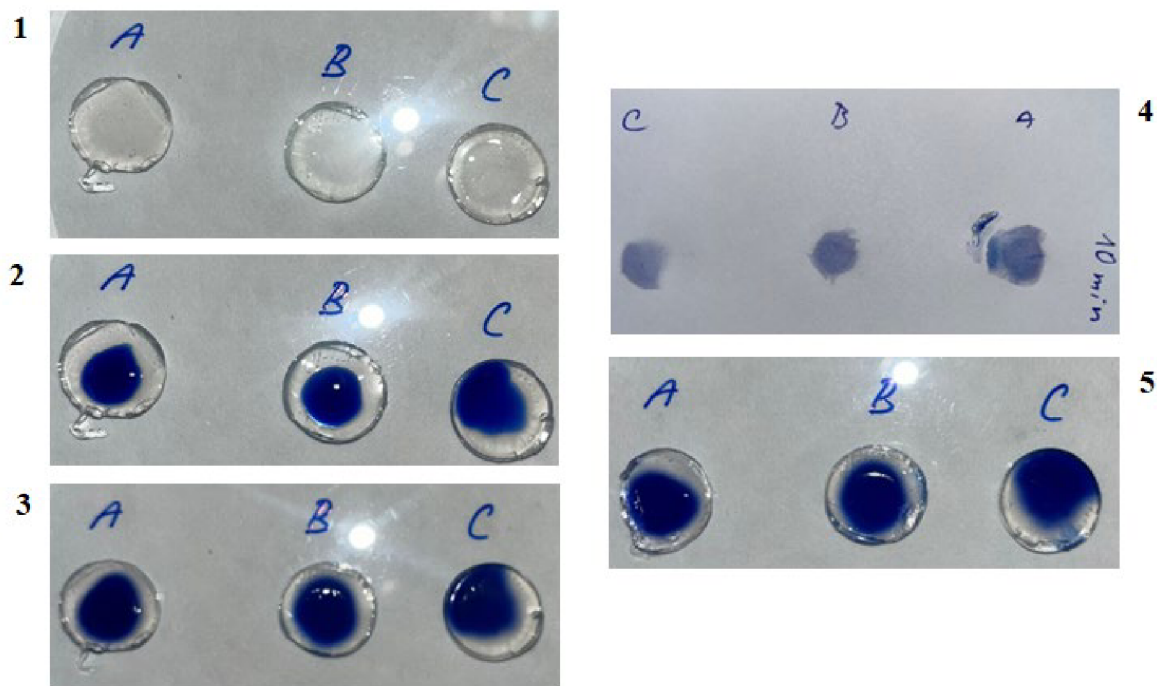
5.4 Testovanie transmitančných vlastností kompozícií

Pre stanovenie optických vlastností hydrogélú bol použitý UV/VIS spektrofotometer s nainštalovaným držiakom pre meranie pevných vzorkov namiesto držiaku kviet. Ako referencia bolo použité podložné sklo, na ktorom bolo pri samotnom meraní umiestnený skúmaný hydrogélúv blok.

Pred vynulovaním a meraním hydrogélú boli podložné skla umyté a odmastnené pomocou izobutanolu a buničiny. Hydrogél bol následne umiestnený na podložné sklo. Tým že hydrogél držal na podložnom sklíčku vďaka adhéznym vlastnostiam, nebolo potrebné hydrogél stabilizovať druhým (krycím) sklíčkom. Nakoniec bolo spustené meranie na UV/VIS spektrofotometri v režime transmitancia.

5.5 Test recovery po odtlačku na poréznom povrchu po nabotnaní pomocou farbiva

To či hydrogél skutočne nabotnal a že po odtlačení hydrogélú na porézny povrch je pozorovateľné recovery, bolo možné jednoducho overiť následujúcim spôsobom. Na povrch čerstvo pripravených hydrogélú (Obr. 8/1) bol nanosený roztok farbiva 2,6-dichlorofenolindofenolu (DCPIP) o koncentrácii $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ g/dm}^3$. Toto farbivo bolo rozpustené v sterilnom roztoku PBS a bolo následne napipetované na hydrogély (Obr. 8/2) vždy v objeme 50 μl .



Obr. 8: Hydrogély: 1) pred nanosením farbiva, 2) po nanosení farbiva, 3) po 10min botnaní, 4) odtlačený filtračný papier, 5) hydrogély po odtlačení. Označenie A, B, C slúži pre rozlíšenie jednotlivých vzorkov o rovnakom zložení kompozície „A“.

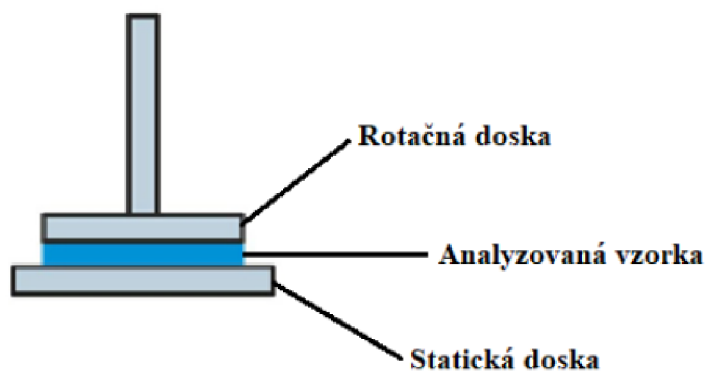
Ďalej boli hydrogély vložené do inkubátora pri 37 °C počas časových intervalov: 0; 5; 10; 15 a 20 minút. Následne, po nabotnaní (Obr. 8/3), boli hydrogély odtlačené na filtračný papier (Obr. 8/4). Nakoniec boli u odtlačených hydrogélom (Obr. 8/5) skúmané transmitančné vlastnosti obdobným postupom aký je uvedený v predchádzajúcej kapitole s tým, že ako referencia slúžil čistý hydrogél, ktorý bol pripravený súčasne s hydrogélmi, na ktoré bolo potom nanášané farbivo.

5.6 Testovanie reologických vlastností amplitúdovým testom

Hydrogély pripravené postupom 5.2.3 boli podrobené reologickému testu. Reologické vlastnosti boli študované len u hydrogélovej kompozície 1:2 (kompozícia A), na základe poznatkov predošlých testov. Meranie prebiehalo pri konštantnej temperačnej teplote 25 °C, konštantnej frekvencii a šírke meracej medzery. Bolo použité geometrické usporiadanie doska-doska (Obr. 9). Hydrogély boli po jednom vložené na statickú temperovanú dosku a spustené meranie. Prvé merania boli prevedené za účelom správneho nastavenia reometru. Konečné nastavenie reometru je uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Tab. 3: Konečné nastavenie oscilačného reometru DHR-2

Teplota	25 °C
Senzor	Šrafovaná doska senzoru 20 mm
Temperácia	25 °C, 180 sekúnd
Meranie	Oscilation, amplitude sweep
Amplitúda deformácie	0,1–1000 %
Frekvencia	1 Hz
Mód	Logaritmic
Body na dekádu	15
Opakovania	2
Šírka meracej medzery	1500 µm



Obr. 9: Usporiadanie geometrie reometru; rotačná doska je šrafovaný senzor 20 mm.

5.7 Statické mikrobiálne testy

Všetky mikrobiálne testy boli prevedené len s hydrogélóvými platformami kompozície A (1:2). Hydrogély boli vždy odlievajú z čerstvých roztokov polymérov v sterilnom PBS. Fotoaparát pre zber dát fluorescence a používané LED fluorescenčné diódy boli nastavené vždy rovnako. Spôsob vyhodnotenia fluorescence bol taktiež vždy rovnaký (pomocou programu ImageJ).

5.7.1 Príprava roztoku resazurínu

Na analytických váhach bolo navažené také množstvo resazurínu, aby 10-krát zriedený roztok mal pri 600 nm absorbanciu 1,5. Presná navážka činila 9,5 mg. Navážka bola analyticky prevedená do 100 ml odmernej banky a po rozpustení v dostatočnom množstve deionizovanej vody, bola odmerná banka doplnená po rysku.

5.7.2 Očkovanie baktérií zo zásoby peliet *E. coli*

Inokulum bolo pripravené tak, že s nažhaveným kovovým drátom sa nabrala jedna peleta *E. coli* a bola rozpustená v sterilnom živnom médiu o objeme 50 ml s 1% peptónom, ktoré bolo predom vyhriate na 37 °C. Inokulum sa následne vložilo do inkubátru po dobu 24 hodín na 37,0 °C.

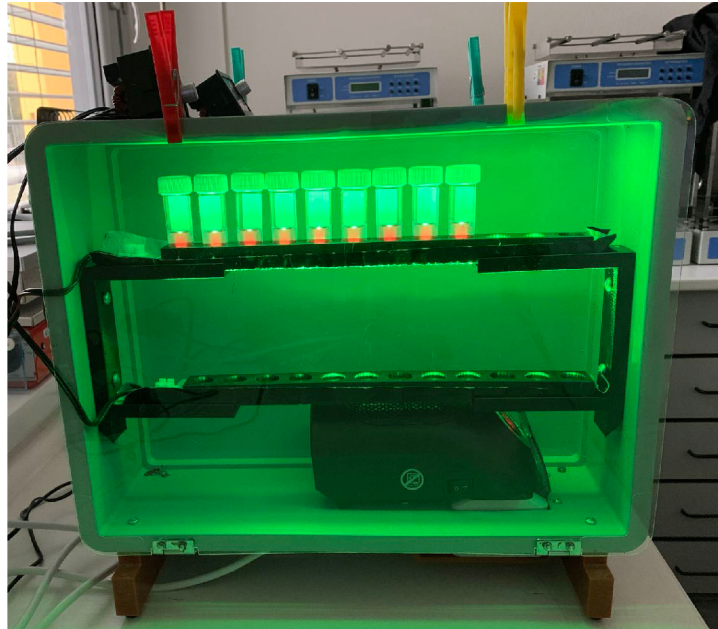
5.7.3 Príprava suspenzie *E. coli*

24 hodín kultivované inokulum bolo rozliate do 4 rovnakých uzatvárateľných skúmaviek, ktoré sa následne odstredili po dobu 10 minút pri 3000 RPM. Následne boli odstredené bakérie zriedené roztokom PBS tak, aby pri 600 nm činila absorbanca suspenzie 0,6 (koncentrácia buniek je $4,8 \cdot 10^8$ CFU/ml). Roztokom PBS sa riedilo z dôvodu zabránenia ďalšieho nekontrolovateľného množenia baktérií.

5.7.4 Kalibračná rada *E. coli* pre vybranú kompozíciu

Pre stanovenie antimikrobiálnych účinkov je potrebné určiť rovnicu kalibračnej krivky, vďaka ktorej je možné vypočítať koncentráciu viabilných MO po vystavení antimikrobiálnemu povrchu. Pripravená suspenzia *E. coli* bola pre vytvorenie kalibračných vzoriek, nariadená dvojkovým riedením pomocou PBS až do koncentrácie 1/1024 ($4,8 \cdot 10^5$ CFU/ml). Takto pripravená kalibračná rada roztokov bola pipetovaná na pripravené hydrogély v objeme 50 μ l. Hydrogély boli následne umiestnené do inkubátoru po dobu 10 minút pri 37,0 °C pre zaistenie absorpcie bakteriálnej suspenzie. Potom boli hydrogély prevedené do vialiek a následne sa k nim pridalo po 2 ml živného média s 1% peptónom a 200 μ l roztoku resazurínu. Takto pripravené vialky boli uzavreté a umiestnené do držiaka s fluorescenčnými LED diódami (s nastavením 2,54 V, 0,122 A a 0,30 W). Držiak s vialkami a LED diódami bol následne umiestnený do vyhrievacieho boxu (viď Obr. 10) s priehľadnou prednou stenou.

Následne bolo spustené fotografovanie pomocou digitálneho fotoaparátu (vid' Obr. 11 **Chyba! Nenašiel sa žiaden zdroj odkazov.**), ktorý automaticky zaznamenával snímky každé 2 minúty. Pomocou programu ImageJ bolo možné vygenerovať časové zmeny sfarbenia resazurínu a následne z dát bolo možné vytvoriť krivky intenzity fluorescence v závislosti na čase. Z týchto kriviek boli následne stanovené fluorescenčné maximá.



Obr. 10: Vyhrievaný box s umiestnenými vialkami v 3D vytlačenom držiaku opatreného LED diódami.



Obr. 11: Aparatúra pre zaznamenávanie fotografických snímok experimentu.

5.7.5 Statické testy na vybraných fotokatalytických povrchoch

Pre vyhodnotenie funkčnosti hydrogélových platforiem ako nosičov bakteriálnej suspenzie bola vybraná bližšie nešpecifikovaná fólia s označením D200 a bakteriálna suspenzia *E. coli* (pripravená podľa postupu uvedeného v kapitole 5.7.3) bola nariadená na stotinovú koncentráciu ($c_0/100$), čo odpovedá koncentrácií $4,8 \cdot 10^6$ CFU/ml. Táto nariadená suspenzia bola nanosená v objeme 50 μ l na čerstvo pripravené hydrogély, ktoré boli následne umiestnené po dobu 10 minút pri 37 °C do inkubátoru. Potom boli 3 hydrogély vložené do vialiek a následne bolo k hydrogélom pridané: živné médium s 1% peptónom v objeme 2 ml a 200 μ l roztoku resazurínu a uzavreté vialky sa dali ihneď merať do vyhrievaných boxov podľa obdobného postupu uvedeného v predchádzajúcej kapitole (5.7.4). Týmto získavame informáciu o pôvodnej, skutočne nanášanéj koncentrácii bakteriálnej suspenzie na hydrogélové bločky. Súčasne boli taktiež prevedené recovery testy na skúmaných fóliach. Postup recovery testu je uvedený v nasledujúcej kapitole (5.7.6).

Následne boli pripravené petriho misky, do ktorých boli vložené fotokatalytické a referenčné fólie (čistá fólia bez fotokatalyzátoru). Na každú fóliu boli nanosené vždy 3 nabotnané hydrogély s bakteriálnou suspenziou, tak aby kontakt fólie a hydrogélu tvorila strana hydrogél, na ktorú bola nanosená bakteriálna suspenzia. Následne bola jedna fotokatalytická a jedna referenčná fólia umiestnená do inkubátora ktorý bol osvetlený (žiarenie aktivujúce fotokatalyzátor) a druhý identický pár bol vložený do identického inkubátora, ktorý bol bez prístupu svetla. Hydrogély boli v kontakte s fóliami po dobu štyroch hodín pri 37 °C. Po uplynutí tejto doby boli hydrogély odstránené z fólií a boli vložené do vialiek a k nim bolo pridané: 2 ml živného média s 1% peptónom a 200 μ l resazurínu. Vialky boli uzavreté, umiestnené do držiaku s LED diódami vo vyhrievanom boxe a bolo spustené meranie.

5.7.6 Recovery testy na vybraných poréznych a hladkých materiáloch.

Recovery vyjadruje pomer medzi skutočne stanovenými baktériami po odtlačení nosiča MO na skúmaný materiál; proti množstvu baktérií nanesených, v tomto prípade, na hydrogélóvu platformu. Pri testovaní recovery, bola na čerstvo pripravené hydrogély nanosená zriedená bakteriálna suspenzia $c_0/100$. Bakteriálna suspenzia bola opäť pripravená podľa postupu uvedeného v kapitole 5.7.3. Následne boli hydrogély botnané pri 37 °C po dobu 10 minút.

Potom boli po jednom prikladané (rovnakou stranou, na ktorú sa nanášala bakteriálna suspenzia) na daný povrch. Ihneď po nanosení hydrogélom na skúmaný materiál, boli hydrogély z povrchu odstránené a umiestnené do vialiek, do ktorých bolo pridané 2 ml živného média s 1% peptónom a 200 µl resazurínu. Vialky boli uzatvorené a umiestnené na držiak s LED diódami vo vyhrievanom boxe a bolo spustené meranie.

Recovery testy boli vykonané na: použitých fóliach (v predchádzajúcej kapitole 5.7.5) dvoch druhoch textílií (bavlna, polyester (PES)), dvoch druhoch skla (podložné mikroskopické sklíčko, TiO₂).

6 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pomocou pilotných experimentov Ing. M. Královej Ph.D., sa používal ako nosič mikrobiálneho kmeňa *E. coli* hydrogél na báze 1% agarózy. Tento materiál má síce dostačujúce mechanické vlastnosti (pri manipulácii drží pokope) a spôsob jeho prípravy a odlievania je jednoduchý, avšak pre danú aplikáciu nebol dostatočne. Takže pri nanášaní bakteriálnej suspenzie pri statických antimikrobiálnych testoch, bolo potrebné suspenziu zasušovať teplým vzduchom, čomu je snaha sa vyvarovať.

Bolo potrebné pripraviť hydrogély s obsahom PBS, aby na rast adherujúcich baktérií nemal pozitívny vplyv samotný polysacharid, keďže PBS pôsobí na rast *E. coli* tlmivo, pretože neobsahuje žiadny uhlíkový substrát, ale zároveň dané MO nezabíja. Preto na základe literatúry bol vybraný hydrogél na báze karagenanu, ktorý by mal za daných podmienok botnať dostatočne¹²⁴. Na základe vlastných pilotných experimentov sa zistilo, že rozpúšťanie κ -karagenanu v PBS bolo časovo náročné a predĺžená doba expozície vyšším teplotám spôsobovala degradáciu, takže po schladnutí materiál vôbec nesieťoval. Zároveň pri rozpúšťaní nižších koncentrácií nebolo možné odlievať konzistentný objem, pretože roztok po ochladení pod teplotu sol-gel prechodu rýchlo gellovatel, a tým zatuhol už v samotných špičkách mikropipiet. Tejto skutočnosti taktiež napovedá vysoký obsah sulfonovaných skupín v štruktúre, ktorých dôsledkom je rýchla asociácia týchto skupín najmä s Na^+ a K^+ iónmi^{45,48}, ktoré sú v roztoku PBS vo vysokej koncentrácii, a ich obsah pozitívne koreluje s rýchlosťou sol-gel fázového prechodu¹²⁴, ktorý je spôsobený zmenou konformácie reťazcov a interhelikálnou agregáciou⁴⁸. Zároveň tento rýchly sol-gel fázový prechod zabráňoval rozpúšťaniu polysacharidu a to aj pri teplotách vyšších ako 80 °C. Na druhej strane, čistý ι -karagenan nesieťuje vôbec, avšak komerčne dostupný ι -karagenan je schopný gélovať (sieťovať) práve vďaka nízkemu zastúpeniu κ -karagenanu. Z tohoto dôvodu bol ako materiál mikrobiálneho nosiča, vybraný práve ι -karagenan, ktorý sa v roztoku PBS o vysokej iónovej sile rozpúšťal veľmi ľahko aj pri vyšších koncentráciách ako 8 hm.%. Avšak pri hmotnostných koncentráciách vyšších ako 4 hm.% dochádzalo k obdobnému problému ako u pipetovania horúceho roztoku κ -karagenan. V tomto prípade bola problémová i vysoká viskozita, vďaka čomu bolo problematické roztok vytlačiť zo špičiek mikropipiet, a tým v nich zgelovatel. Pri koncentráciách menších ako 2 hm.% dochádzalo pri neopatrnnej manipulácii k rozpadu

hydrogélom. Prehľadné zhrnutie skúmaných kompozícií hydrogélom a ich výhod a nedostatkov je uvedené v nasledujúcej tabuľke (viď Tab. 4):

Tab. 4: Súhrnná tabuľka kompozícií polysacharidom používaných v pilotných experimentoch a ich výhody a nedostatky.

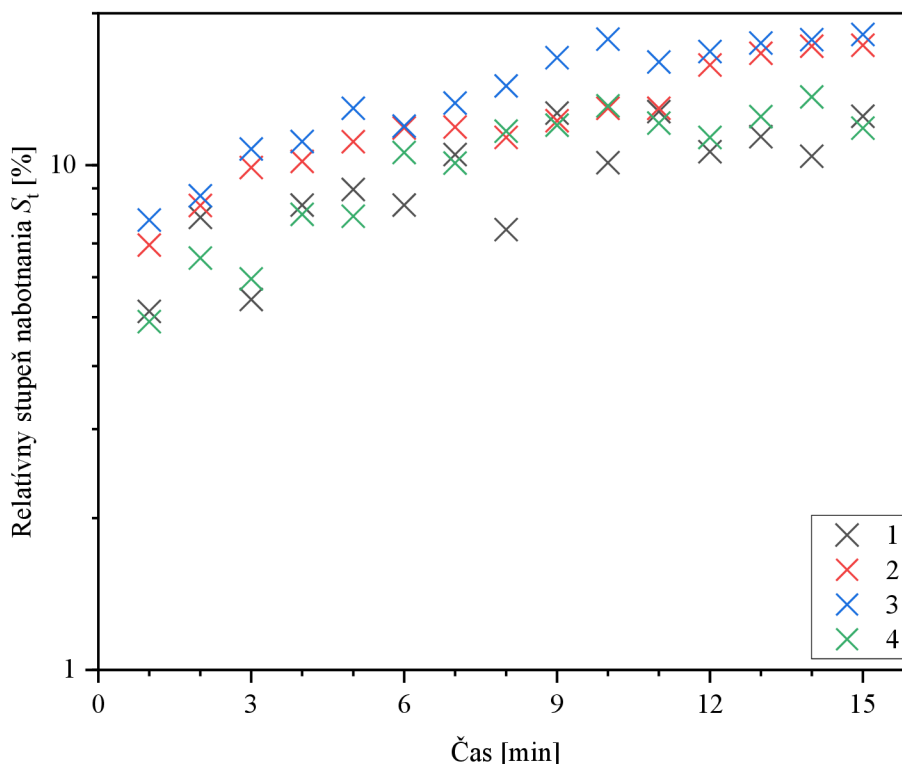
Typ polysacharidu	Hmotnosť koncentrácia (% hm.)	Výhody	Nedostatky
Agaróza	1	Vysoká mechanická pevnosť	Nedostatočné botnanie
κ-karagenan	2	Vysoká mechanická pevnosť	Obtiažne odlievanie
	4		Obtiažne rozpúšťanie
	8		a odlievanie
ι-karagenan	1	Jednoduché odlievanie a rozpúšťanie	Slabá mechanická pevnosť
	2		
	4	Výborné botnacie a mechanické vlastnosti	Obtiažne odlievanie a nízka transmitancia
	8		

Preto bolo rozhodnuté, že sa použije kompozitný vrstvený hydrogél, ktorý pozostával z mechanicky odolnejšieho 1% agarózového hydrogélom, na ktorý bol navrstvený hydrogél ι-karagenanu. Bolo skúmaných viacero objemových pomerom týchto polysacharidom, avšak z dôvodu problematickej prípravy boli vybrané kompozície A a B v objemových pomerom 1:2 a 1:1 (agaróza : ι-karagenan). Hydrogély kompozície B (1:1) boli z dôvodom problematického odlievania ι-karagenanu v objeme menšom ako 400 μl, pripravená táto kompozícia v objeme 800 μl.

Vďaka optimalizovanému spôsobu pipetovania (kapitola 5.2.3) bolo možné pipetovať konzistentné objemy polymérom, čomu nasvedčovali i zaznamenané hmotnosti hydrogélom v čase t_0 .

6.1 Botnacie vlastnosti

Botnacie vlastnosti hydrogélův ako nosičův bakteriálních kultův sů důležitě z hľadiska novo vyvíjanej metodiky, kedy sa na hydrogél nanáša bakteriálna suspenzia. Botnanie by malo zabezpečiť absorpciu roztoku tejto suspenzie, a zároveň dostatočná hustota zosieťovania, a tým i veľkosť pórov. Tieto vlastnosti by mali zabrániť difundovaniu baktérií do objemu. Z hľadiska botnacej kapacity bolo potrebné, aby hydrogély absorbovali 50 μ l bakteriálnej suspenzie. Ako botnací roztok bol použitý roztok PBS, pretože aj nanášaná bakteriálna suspenzia je z väčšiny tvorená práve PBS roztokom. Zároveň boli hydrogély botnané pri 37 °C, pretože je to teplota ideálna pre prežitie *E. coli*¹²⁵. Ako bolo naznačené, vo vrstvených hydrogélůch botná prevážne len vrstva ι -karagenanu, z toho dôvodu boli všetky bakteriálne roztoky taktiež nanášané na karagenanový povrch. Z hľadiska aplikácie je taktiež důležité aby hydrogélůvé nosiče botnali o 6–8 hm.% v čo najkratšom čase, ideálne okolo 10 minút.



Obr. 12: Grafická závislosť botnania hydrogélůvej kompozície A (1:2) v roztoku PBS pri 37 °C. Označenia 1; 2; 3; 4 sů vzorky identických hydrogélův; S_r je voľná absorpčná kapacita. Logaritmicke merítko osi y.

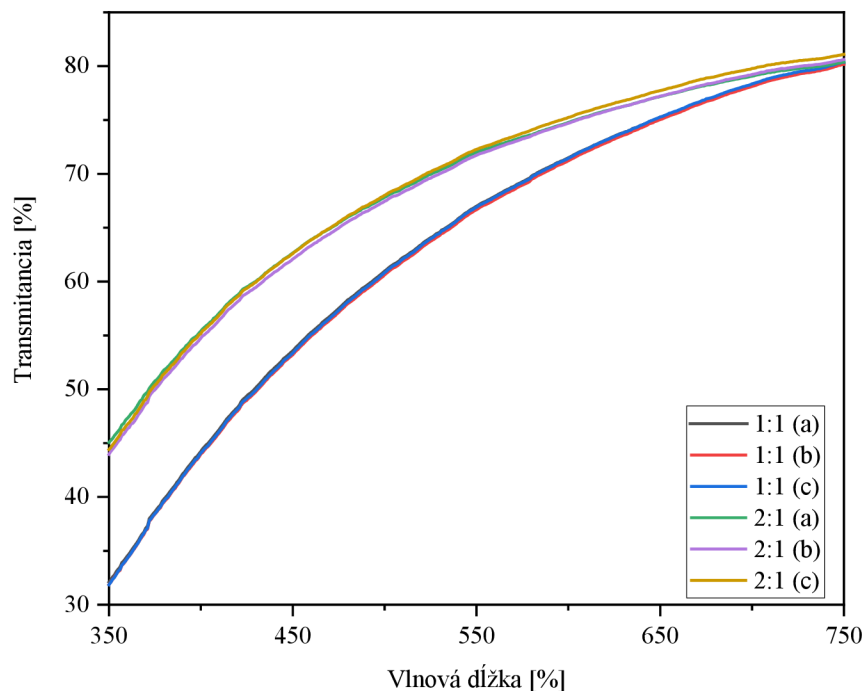
Z grafickej závislosti voľnej absorpčnej kapacity kompozície A (vid' Obr. 12) je zrejmé, že hydrogély botnajú po 10 minútach o viac ako 10 % pôvodnej hmotnosti hydrogélom. Táto miera botnania je pre danú aplikáciu viac než dostačujúca. Hydrogély kompozície B však botnať dlhšie ako 7 minút nebolo možné, pretože hydrogély sa rozpadali. Niektoré už po prvom namočení do botnacieho roztoku PBS. Dochádzalo najmä k oddelení vrstiev, čo spôsobilo oslabenie pevnosti karagenanu, ktorý sa ihneď rozpadal. Agarózová vrstva však ostala bez viditeľného mechanického poškodenia.

6.2 Optické vlastnosti (transmitancia)

Postup pri priložení hydrogélom nabotnaného bakteriálnou suspenziou na fotokatalytický povrch bolo popísané v kapitole 3.4. V kapitole 2.6.2 bol objasnený dôvod nutnosti stanoviť transmitančné vlastnosti. Dôležité je aby hydrogély prepúšťali žiarenie o intenzite viac ako 80 % pôvodného žiarenia pri 600 nm, ktoré dopadá na povrch hydrogélom. V kapitole 2.6.2 UV/VIS spektrofotometrické stanovenie transmitančných vlastností hydrogélom bol taktiež vysvetlený princíp merania s upraveným spektrofotometrom.

6.2.1 Transmitančné vlastnosti

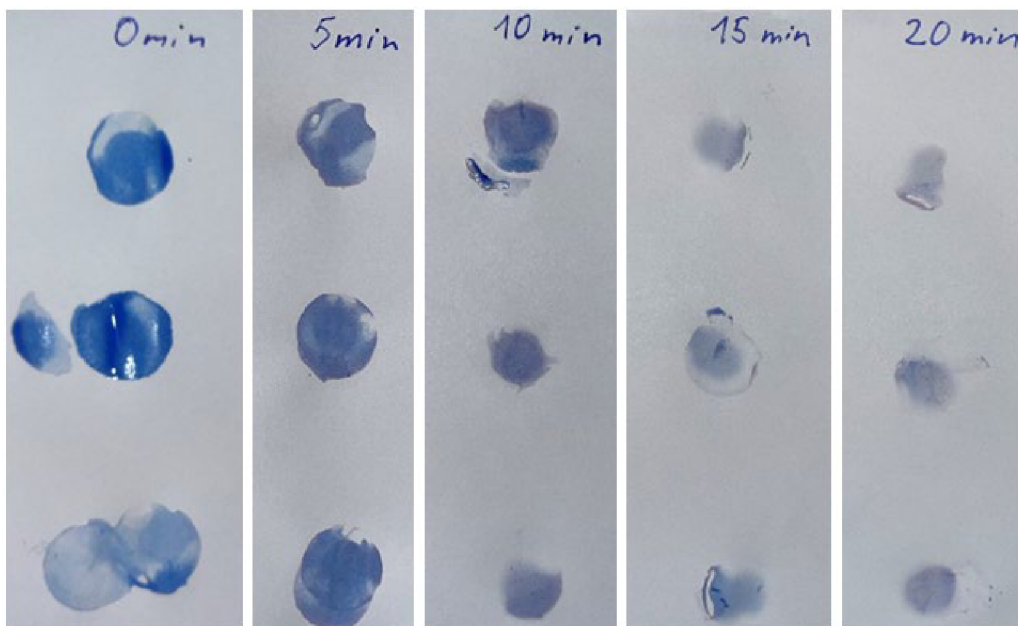
Boli namerané transmitančné spektrá kompozícií A a B. Kedže pri odlievaní sa používala vždy rovnaká plastová formička a hydrogély kompozície B boli odlievane v objeme 800 μl (z dôvodu problematického odlievania menšieho objemu ι -karagenanu), ich hrúbka bola väčšia ako u kompozície A. Väčšia hrúbka znamená dlhšiu optickú dráhu vzorky, a to znamená nižšie hodnoty transmitancie. Očakávalo sa teda, že hydrogély kompozície „A“ budú vykazovať signifikantne vyššiu transmitanciu (vid' Obr. 13). Z tohto dôvodu bola táto kompozícia vybraná pre ďalšie meranie transmitancie v nasledujúcej kapitole (6.2.2).



Obr. 13: Transmittančné spektrá hydrogelových kompozícií A a B (2:1 a 1:1).

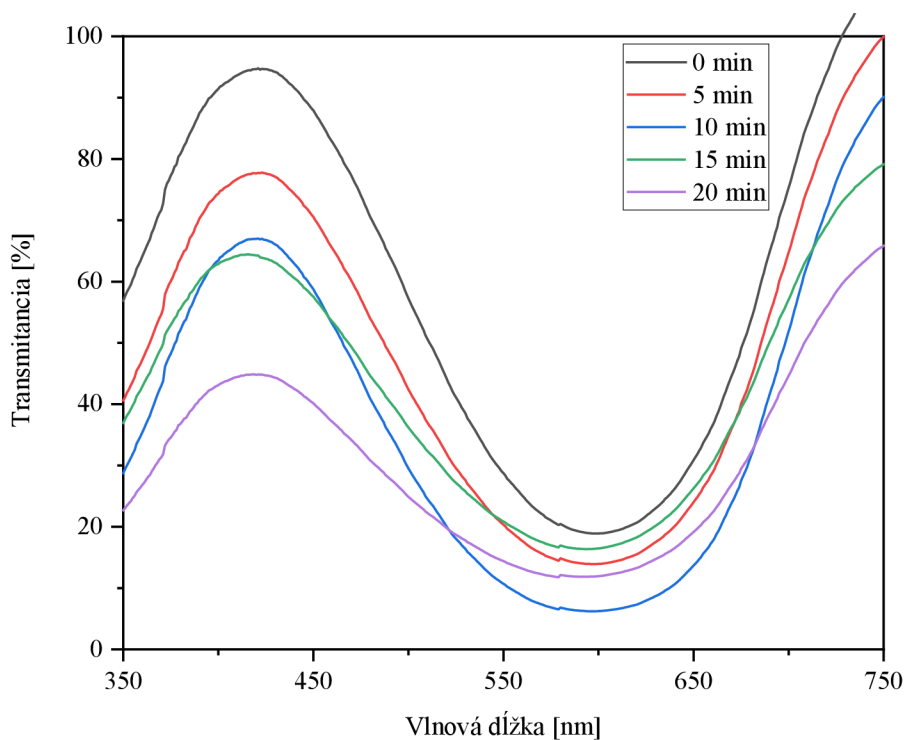
6.2.2 Overenie recovery pomocou farbiva

Účelom merania zmeny transmittancie vplyvom predlžujúcej sa doby botnania hydrogélú s farbivom 2,6-dichlorofenolindofenolu (DCPIP), bolo zistiť recovery schopnosť kompozície „A“ v závislosti na čase (viď kapitolu 5.5) a taktiež bolo možné overiť pomocou klesajúcej transmittancie proces botnania hydrogélú. Závislosť času botnania hydrogélú bolo možné jednoducho vizuálne pozorovať na papieroch, na ktoré boli jednotlivé hydrogély odtlačané. A to z dôvodu, že s predlžujúcou sa dobou sušenia, klesalo i množstvo farbiva, resp. roztoku farbiva, ktoré sa prenieslo odtlačením na papier (viď Obr. 14). Toto vizuálne potvrdenie botnania neslúžilo ako kvantifikovateľný výsledok. Kvantifikovateľné potvrdenie toho, že hydrogél botná a zároveň je schopný po odtlačku zachovať väčšinu nanoseného farbiva, je možné pozorovať na krivkách transmittančného spektra (viď Obr. 15), rôzne dlhú dobu sušených hydrogélú. Na základe transmittančného spektra by bolo možné pomocou rovnice (2) toto spektrum transformovať na spektrum absorpčné a pomocou výpočtu podľa *Lambert-Beerovho zákona* by bolo možné určiť koncentráciu farbiva, ktoré bolo zachované v hydrogély po odtlačení na filtračnom papieri. Tomuto výpočtu sa však táto diplomová práca nevenuje.



Obr. 14: Porovnanie odľachteného papiera hydrogélmi botnanými po rôzne dlhú dobu.

Z grafickej závislosti (Obr. 15) poklesu transmitancie v závislosti na predlžujúcom sa čase botnania je zreteľné, že v oblasti 400–450 nm dochádza k výraznému poklesu. To znamená, že čím dlhšie hydrogély botnali, tým boli schopné absorbovať väčšie množstvo farbiva DCPIP a tým klesala transmitancia.

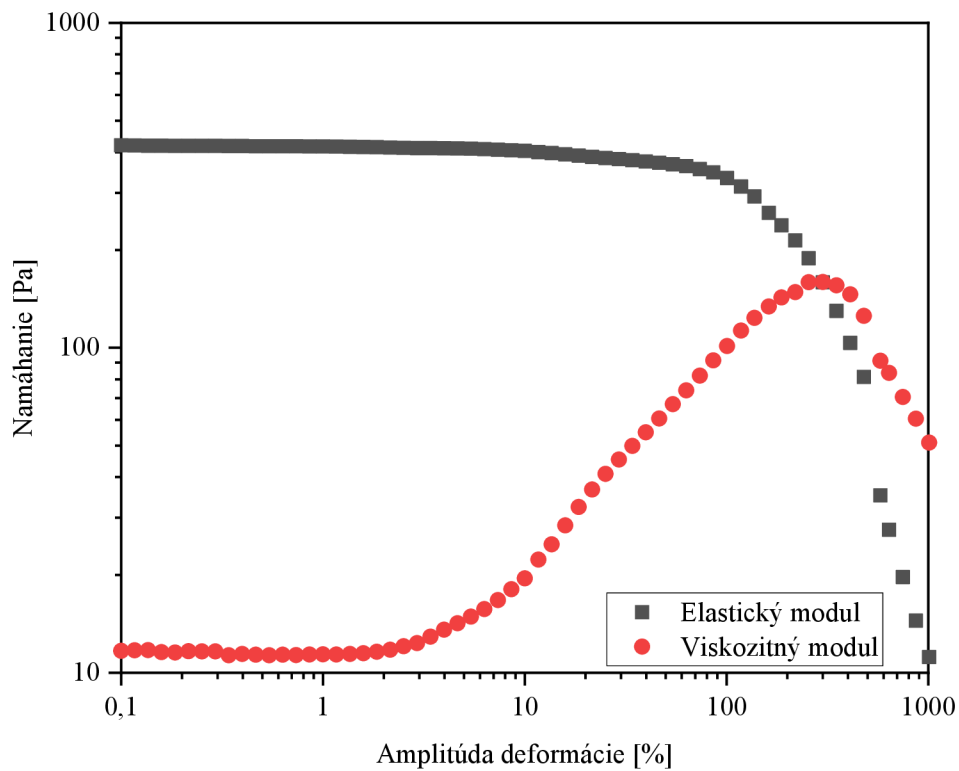


Obr. 15: Transmitančné spektrá hydrogéllov botnaných s roztokom farbiva DCPIP po ich odľatčení na filtračnom papieri.

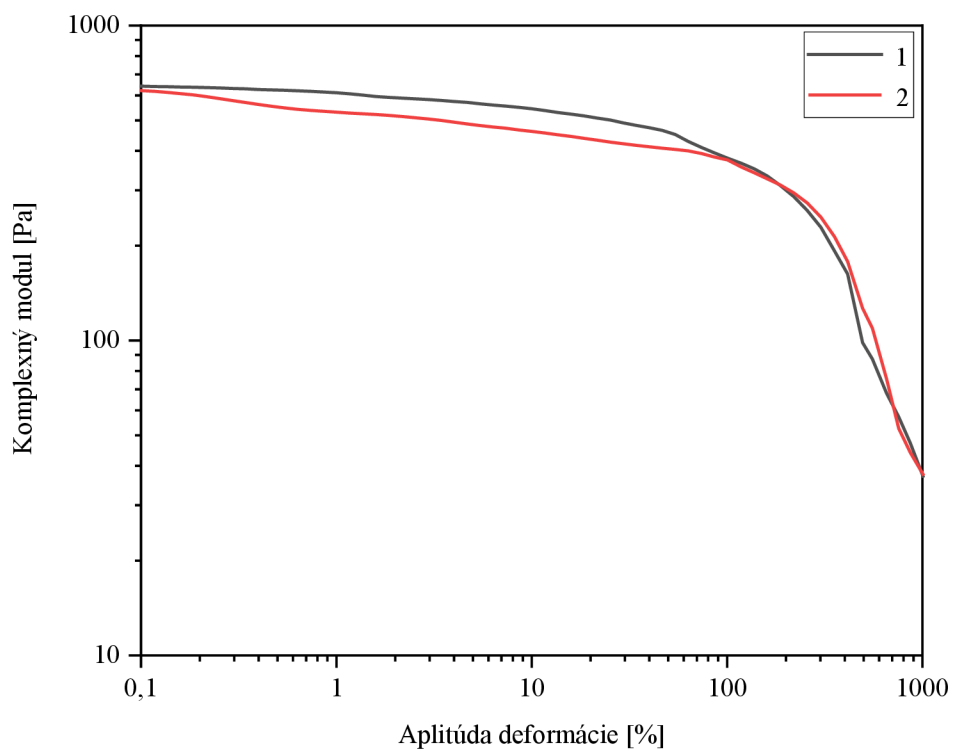
6.3 Reologické vlastnosti

Pomocou oscilačného reometru bolo možné stanoviť maximálnu amplitúdu oscilácie kedy sa hydrogél správal stále ako elastické pevné teleso. Ako bolo uvedené v kapitole 2.6.3 táto oblasť, kedy nedochádza k deformácii pri zvyšujúcom sa napätí sa nazýva LVO. Maximálna amplitúda deformácie v tejto oblasti bola vypočítaná ako priemer posledných 3 hodnôt dosiahnutia 5% odchýlky komplexného modulu. Závislosť komplexných modulov na amplitúde deformácie bola vypočítaná podľa rovnice (4) pomocou hodnôt elastických a viskozitných (Obr. 16: Ukážka grafickej závislosti elastického a viskozitného modulu na amplitúde defromácie, logaritmické merítko.Obr. 16) modulov. Maximálna hodnota amplitúdy deformácie LVO činila $0,8892 \pm 10,57 \cdot 10^{-2} \%$.

Komplexný modul (Obr. 17) oboch hydrogéllov bol vypočítaný ako priemer hodnôt amplitúdy deformácie v LVO u hydrogéllov, ktorého odchýlka komplexného modulu v LVO bola menšia ako 1 %. Táto hodnota činila $634,29 \pm 5,766 \text{ Pa}$. Z tejto hodnoty bola následne vypočítaná hustota zosieťovania pomocou rovnice (5), ktorá činila $25,5887 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$. Ďalej bolo možné pomocou tejto hodnoty a rovnice (7) vypočítať priemernú hodnotu priemeru jedného póru, ktorý činil 23,1409 nm. Veľkosť pórov je menšia ako veľkosť baktérie *E. coli*, takže baktérie by nemali prenikať do objemu hydrogélovej platformy.



Obr. 16: Ukážka grafickej závislosti elastického a viskozitného modulu na amplitúde defromácie, logaritmické meritko.

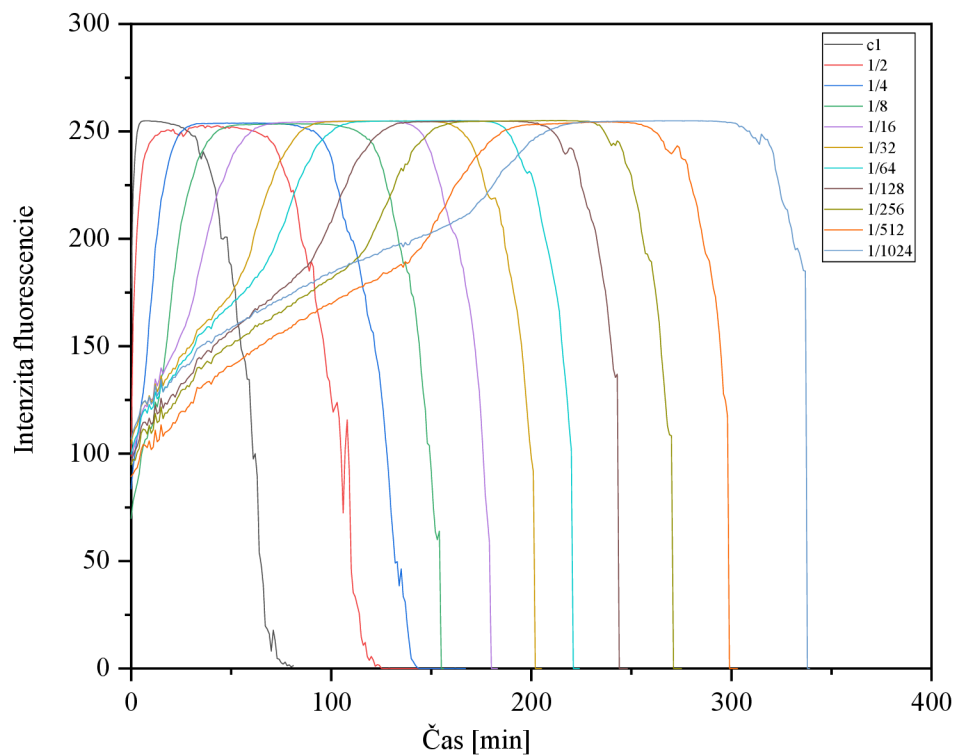


Obr. 17: Ukážka komplexných modulov meraných hydrogélom, logaritmické meritko.

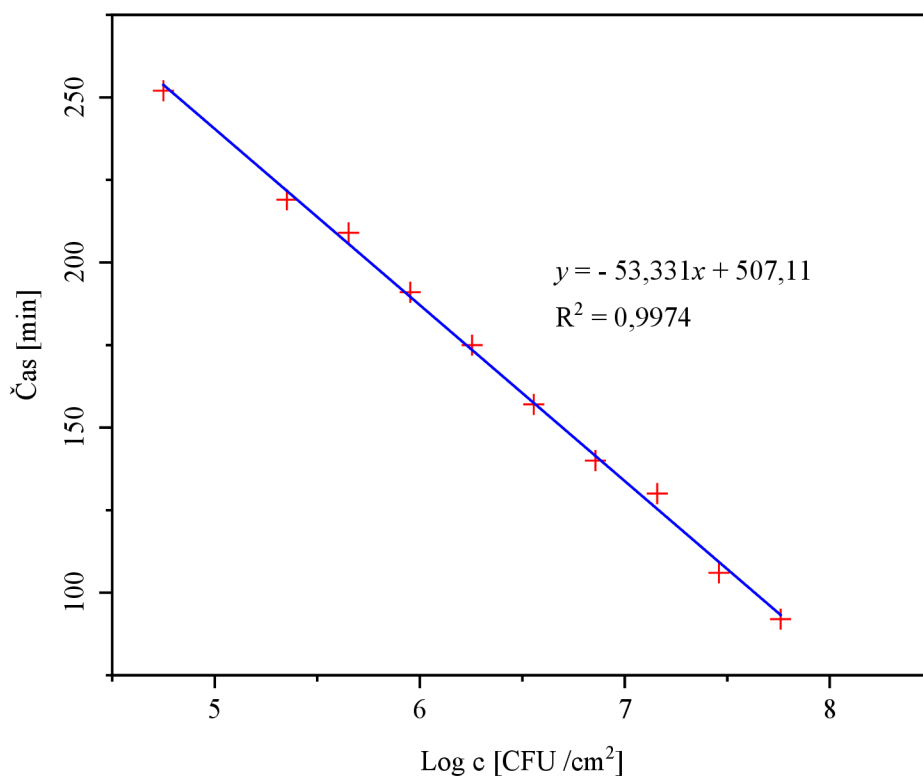
6.4 Statické testovanie antimikrobiálnych vlastností fotokatalyzátoru

6.4.1 Kalibrácia resazurínovej metódy pre hydrogéllovú kompozíciu „A“

Aby bolo možné určiť antimikrobiálne vlastnosti povrchov resazurínovou metódou bolo potrebné určiť rovnicu regresie kalibračnej krivky. Táto regresia slúži pre výpočet presnej koncentrácie živých baktérií v čase. Presný postup merania kalibračnej rady a zostavenia kalibračnej závislosti je uvedený v kapitole 5.7.4. Z fotografického záznamu sa vyhodnotili pomocou programu ImageJ jednotlivé časové závislosti, z ktorých sa následne vyhodnotil čas dosiahnutia maximálnej intenzity fluorescence (Obr. 18). Z maxima fluorescencií boli vybrané jednotlivé časové body pre každú koncentráciu, a bola zostavená kalibračná závislosť (Obr. 19).



Obr. 18: Časové závislosti dosiahnutia maxima pre jednotlivé koncentrácie suspenzií.



Obr. 19: Kalibračná závislosť resazurinovej metódy pre hydrogél kompozície „A“.

6.4.2 Statické testy

V tomto prípade sa postupovalo podľa postupu uvedeného v kapitole 5.7.5. Boli prevedené testy na svetle aj v tme a vždy sa porovnávala skutočná počiatková koncentrácia (zistená z časov dosiahnutia fluorescenčných maxím) s teoreticky vypočítanou. Ďalej sa stanovuje priemerný log CFU/ml pre fotokatalytický povrch na svetle (C_L) i v tme (C_D) a rovnako tak aj pre kontrolné povrchy (B_L a B_D). Z týchto hodnôt sa potom vypočíta výsledná ΔR (viď rovnicu (8), čo je hodnota poskytujúca informáciu o vlastnostiach antimikrobiálnych povrchoch.

$$\Delta R = R_L - \log(B_D / C_D) = \log(B_L / C_L) - \log(B_D / C_D) \quad (8)$$

V nasledujúcej tabuľke (

Tab. 5) sú uvedené výsledky jedného z experimentov.

Tab. 5: Súhrnná tabuľka výsledkov stanovenia antimikrobiálnych vlastností vzorky fólie D200 použitím c0/100.

		Čas	Log CFU/cm ²	CFU/cm ²	Priemer log CFU/cm ²	Chyba		
Vzorka	Výpočtom	-	4,836	6,86E+04	-	-		
Počiatočná	c0/100	206	5,679	4,78E+05	5,68	0,00		
	c0/100	206	5,679	4,78E+05				
	c0/100	206	5,679	4,78E+05				
Recovery C	C (rec.)	210	5,604	4,02E+05	5,60	0,04	99	Recovery (%)
	C (rec.)	212	5,566	3,68E+05				
	C (rec.)	208	5,642	4,38E+05				
Recovery B	B (rec.)	211	5,585	3,85E+05	5,58	0,03	98	Recovery (%)
	B (rec.)	210	5,604	4,02E+05				
	B (rec.)	213	5,547	3,53E+05				
Katalyzátor svetlo	CL	268	4,509	3,23E+04	4,58	0,10	1,43	R _L
	CL	266	4,547	3,53E+04				
	CL	258	4,698	4,99E+04				
Blank svetlo	BL	222	5,377	2,38E+05	6,02	0,61		
	BL	158	6,585	3,85E+06				
	BL	184	6,094	1,24E+06				
Katalyzátor tma	CD	166	6,434	2,72E+06	6,06	0,33	0,19	log (BD/CD)
	CD	194	5,906	8,05E+05				
	CD	198	5,830	6,76E+05				
Blank tma	BD	166	6,434	2,72E+06	6,25	0,29		
	BD	168	6,396	2,49E+06				
	BD	194	5,906	8,05E+05				
							1,25	ΔR

V Tab. 5 môžeme pozorovať, že v prípade vzoriek umiestnených na svetle dochádza k poklesu koncentrácie baktérií na fotokatalytickom povrchu (C_L) zatiaľ čo na čistej fólii (B_L) pozorujeme naopak nárast baktérií. Nárast baktérií je očividný taktiež v prípade vzorkov umiestnených do tmy. V prípade C_D je o niečo menší, čo je spôsobené tým, že vo fotokatalytickej vrstve je prítomná i biocídna látka, ktorá zabíja baktérie i v tme. Z tohto sa dá usudzovať, že baktériam sa v kontakte s karagenanom začína dariť a v priebehu experimentu sa začali sami ďalej množiť a rásť. Veľký pokles v prípade C_L je spôsobený vplyvom fotokatalytického povrchu i vplyvom prítomnosti biocídnej látky.

Porovnaním hodnoty ΔR získané použitím novej metodiky (1,25) a hodnoty ΔR získanej použitím štandardizovaného postupu (0,80) sa dosiahlo trochu vyšších hodnôt. Tento rozdiel sa vysvetľuje rozdielnou koncentráciou nanosených baktérií na cm² v prípade štandardizovanej

metódy ($4,42 \cdot 10^6$ CFU/cm²) a v prípade novej metodiky ($4,75 \cdot 10^5$ CFU/cm²). Naviac rozdiel v hodnotách ΔR do 0,5 sa berú ako porovnateľné výsledky.

6.4.3 Recovery pre vybrané dotatočné povrchy

Boli prevedené recovery testy na hladkých a poréznych povrchoch. V prípade vysoko poréznych povrchov, ako je napríklad sklo s TiO₂ mezoporéznou vrstvou, bolo dosiahnutých hodnôt okolo 50 %, čo stále, v porovnaní so štandardizovanou metódou (20 %), prináša výrazné zlepšenie. V prípade vláknitých materiálov, akými sú bavlna a PES, dochádza pravdepodobne k zachyteniu a prieniku baktérií medzi vlákna tkanín. Tým dochádza k zníženiu výslednej hodnoty recovery.

Z výsledkov recovery testov uvedených v

Tab. 6 je jasné, že bolo dosiahnutých vynikajúcich výsledkov, a to hodnôt recovery nad 95 %, čo v porovnaní so štandardnými postupmi prevedených na týchto materiáloch, vykazuje výrazné zlepšenie. U štandardných postupov boli hodnoty recovery testov pod 80 %.

Tab. 6: Súhrnná tabuľka recovery testov rôznych materiálov.

Vzorka (typ materiálu)	Recovery (%)	
	Nová metodika	Štandardizované postupy
Sklo	78	Do 60
TiO ₂ sklo	53	Do 20
Bavlna	25	-
Polyester (PES)	85	-
Fólie	98	Do 80

7 ZÁVER

Jedným z cieľov diplomovej práce bolo štúdium literatúry zostaviť rešerš, ktorá zhŕňa súčasný stav techník hodnotiacich antimikrobiálne vlastnosti fotokatalytických povrchov a zhrnúť farbiace techniky stanovenia mikrobiálnych kultúr a spôsoboch vzorkovania povrchov. Druhým cieľom bola optimalizácia vhodného zloženia hydrogélovej platformy, ktorá by mala fungovať ako nosič mikrobiálnych kultúr pre testy antimikrobiálnej aktivity fotokatalytických a fotoaktívnych povrchov. Pre tento účel boli hydrogély na báze prírodných gély-tvoriacich polysacharidov agarózy a karagenanu. Ukázalo sa však, že hydrogély na báze agarózy nebotnajú dostatočne. Ďalším problémom, napriek vynikajúcim mechanickým vlastnostiam a manipulovateľnosťou, bolo u κ -karagenanových kompozícií problematické rozpúšťanie, odlievanie hydrogelových bločkov a ich optické vlastnosti. ι -karagenanové kompozície sa rozpúšťali bez väčších problémov a nízke koncentrácie tohto polysacharidu boli odlievané bezproblémovo. Avšak týmto kompozíciám chýbala mechanická pevnosť pre potrebnú manipuláciu s týmito platformami.

Preto vďaka vlastným pilotným experimentom a experimentom Ing. M. Královej Ph.D., bol ako najvhodnejší hydrogél navrhnutý kompozit zložený z 1% hm. agarózy a 2% hm. ι -karagenanu, a to vďaka jeho dobrým optickým vlastnostiam (transmitancia), vynikajúcim botnacím vlastnostiam (relatívny stupeň nabotnania činil viac ako 10 % za 10 minút), dostatočnej mechanickej odolnosti a výborným manipulačným vlastnostiam. Vďaka reologickým oscilačným amplitúdovým testom sa podarilo vypočítať priemernú veľkosť pórov hydrogélovej siete v natívnom stave. Priemerná veľkosť pórov vychádzala menšia ako sú rozmery používaných MO (*E. coli*).

Boli prevedené testy antimikrobiálnej aktivity fotokatalytických povrchov a recovery testy. Nimi bolo zistené, že u recovery testov na poréznych či hladkých povrchoch táto metóda poskytuje omnoho lepšie výsledky (viď

Tab. 6).

Antimikrobiálne účinky stanovené novou metodikou môžu byť v rámci odchýlky (0,5) považované za podobné v porovnaní s postupmi normovanými.

I keď sa podarilo nájsť vhodné zloženie hydrogélovej platformy a optimalizovať jej fyzikálne vlastnosti, výsledky testov antimikrobiálnej aktivity ukázali, že karagenan nebude do budúca vhodnou voľbou pre prípravu týchto nosičov bakteriálnej suspenzie. Bolo zistené, že prítomnosť karagenanu podporuje rast a množenie baktérií. Preto je dôležité pokračovať v hľadaní iných polymérov, ktoré by boli voči bunkám inertné, s porovnateľnými či lepšími fyzikálnymi vlastnosťami. Medzi najdôležitejšie vlastnosti hydrogélového nosiča bakteriálnych kultúr je schopnosť botnania a mechanická odolnosť. Taktiež je dôležité, aby bolo možné tieto platformy pripraviť rýchlym, jednoduchým a hlavne opakovateľným postupom.

8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. Li Y, Sasaki T, Shimizu Y, Koshizaki N. Hexagonal-Close-Packed, Hierarchical Amorphous TiO₂ Nanocolumn Arrays: Transferability, Enhanced Photocatalytic Activity, and Superamphiphilicity Without UV Irradiation. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;doi:10.1021/ja805077q
2. Kumar A, Hasija V, Sudhaik A, et al. The Practicality and Prospects for Disinfection Control by Photocatalysis During and Post-Pandemic: A Critical Review. *Environmental Research*. 2022;doi:10.1016/j.envres.2022.112814
3. Bäumlér W, Eckl D, Holzmann T, Schneider-Brachert W. Antimicrobial coatings for environmental surfaces in hospitals: a potential new pillar for prevention strategies in hygiene. *Crit Rev Microbiol*. Sep 2022;48(5):531-564. doi:10.1080/1040841x.2021.1991271
4. Ren Y, Han Y, Li Z, et al. Ce and Er Co-doped TiO₂ for rapid bacteria-killing using visible light. *Bioactive Materials*. 2020/06/01/ 2020;5(2):201-209. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.02.005>
5. Mao C, Xiang Y, Liu X, et al. Photo-Inspired Antibacterial Activity and Wound Healing Acceleration by Hydrogel Embedded with Ag/Ag@AgCl/ZnO Nanostructures. *ACS Nano*. 2017/09/26 2017;11(9):9010-9021. doi:10.1021/acsnano.7b03513
6. Ding H, Han D, Han Y, et al. Visible light responsive CuS/ protonated g-C₃N₄ heterostructure for rapid sterilization. *Journal of Hazardous Materials*. 2020/07/05/ 2020;393:122423. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122423>
7. Dong F, Zhao Z, Sun Y, Zhang Y, Yan S, Wu Z. An Advanced Semimetal–Organic Bi Spheres–g-C₃N₄ Nanohybrid with SPR-Enhanced Visible-Light Photocatalytic Performance for NO Purification. *Environmental Science & Technology*. 2015/10/20 2015;49(20):12432-12440. doi:10.1021/acs.est.5b03758
8. Xiong K, Li J, Tan L, et al. Ag₂S decorated nanocubes with enhanced near-infrared photothermal and photodynamic properties for rapid sterilization. *Colloid and Interface Science Communications*. 2019/11/01/ 2019;33:100201. doi:<https://doi.org/10.1016/j.colcom.2019.100201>
9. Zhang Y, Shareena Dasari TP, Deng H, Yu H. Antimicrobial Activity of Gold Nanoparticles and Ionic Gold. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. 2015/07/03 2015;33(3):286-327. doi:10.1080/10590501.2015.1055161
10. Shao Z, Hakobyan K, Xu J, et al. Photoinduced Unveiling of Cationic Amine: Toward Smart Photoresponsive Antimicrobial Polymers. *ACS Applied Polymer Materials*. 2023/10/13 2023;5(10):8735-8743. doi:10.1021/acsapm.3c01904
11. Zhou Z, Li B, Liu X, et al. Recent Progress in Photocatalytic Antibacterial. *ACS Applied Bio Materials*. 2021/05/17 2021;4(5):3909-3936. doi:10.1021/acsabm.0c01335
12. Low J, Yu J, Jaroniec M, Wageh S, Al-Ghamdi AA. Heterojunction Photocatalysts. *Advanced Materials*. 2017;doi:10.1002/adma.201601694
13. Hema Singh and Anuja Bokare and Anupam Kumar and Riya Trehen and Ajit Sharma and Deepak K. Chapter 6 - Formation of magnetite-based ceramic materials and their photocatalytic applications. In: Shiv Singh and Pradip Kumar and DPM, ed. *Advanced Ceramics for Versatile Interdisciplinary Applications*. Elsevier; 2022:115-146. vol. Elsevier Series on Advanced Ceramic Materials.
14. Kisand V, Visnapuu M, Rosenberg M, et al. Antimicrobial Activity of Commercial Photocatalytic SaniTise™ Window Glass. *Catalysts*. 2022-02-05 2022;12(2):197. doi:10.3390/catal12020197
15. Machado FVaGMaRAaJCCaMGCaRPaIR. A novel TiO₂/autoclaved cellular concrete composite: From a precast building material to a new floating photocatalyst for degradation of organic water contaminants. *Journal of Water Process Engineering*. 2015;7:27-35. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2015.04.005>
16. Ri Han and Jonathon DCaCORaCGGBaAM. Flexible, disposable photocatalytic plastic films for the destruction of viruses. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2022;235:112551. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112551>

17. Robert Pelton and Xinglian Geng and Michael B. Photocatalytic paper from colloidal TiO₂—fact or fantasy. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2006;127(1):43-53. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.08.002>
18. ISO 22196:(2011), *Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces*.
19. ISO 27447:(2019), *Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) — Test method for antibacterial activity of semiconducting photocatalytic materials*.
20. Mariscal A, López-Gigosos R, Carnero-Varo M, Fernández-Crehuet J. Fluorescent Assay Based on Resazurin for Detection of Activity of Disinfectants Against Bacterial Biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009;doi:10.1007/s00253-009-1879-x
21. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre Plate-Based Antibacterial Assay Incorporating Resazurin as an Indicator of Cell Growth, and Its Application in the in Vitro Antibacterial Screening of Phytochemicals. *Methods*. 2007;doi:10.1016/j.ymeth.2007.01.006
22. ISO 27447:(2019), *Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) — Test method for antibacterial activity of semiconducting photocatalytic materials*.
23. Ruiz N, Silhavy TJ. How Escherichia coli Became the Flagship Bacterium of Molecular Biology. *J Bacteriol*. Sep 20 2022;204(9):e0023022. doi:10.1128/jb.00230-22
24. Conway T, Krogfelt KA, Cohen PS. The Life of Commensal Escherichia coli in the Mammalian Intestine. *EcoSal Plus*. Dec 2004;1(1)doi:10.1128/ecosalplus.8.3.1.2
25. Idalia V-MN, Bernardo F. Escherichia coli as a Model Organism and Its Application in Biotechnology. *Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*. InTech; 2017.
26. Blount ZD. The unexhausted potential of E. coli. *Elife*. Mar 25 2015;4doi:10.7554/eLife.05826
27. Georgellis D, Kwon O, Lin EC. Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science*. Jun 22 2001;292(5525):2314-6. doi:10.1126/science.1059361
28. Palmer C, Bik EM, Digiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biology*. 2007-06-26 2007;5(7):e177. doi:10.1371/journal.pbio.0050177
29. Tuttle AR, Trahan ND, Son MS. Growth and Maintenance of Escherichia coli Laboratory Strains. *Curr Protoc*. Jan 2021;1(1):e20. doi:10.1002/cpz1.20
30. Whitman RL, Nevers MB, Korinek GC, Byappanahalli MN. Solar and temporal effects on Escherichia coli concentration at a Lake Michigan swimming beach. *Appl Environ Microbiol*. Jul 2004;70(7):4276-85. doi:10.1128/aem.70.7.4276-4285.2004
31. Garg SaGA. Hydrogel: Classification, Properties, Preparation and Technical Features. *Asian Journal of Biomaterial Research*. 09 2016;2:163-170.
32. H. Gulrez SK, Al-Assaf S, O G. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*. InTech; 2011.
33. Shandas KDaAFaR. 3 - Characterization of shape-memory polymers for biomedical applications. In: L'Hocine Y, ed. *Shape Memory Polymers for Biomedical Applications*. Woodhead Publishing; 2015:35-63. vol. Woodhead Publishing Series in Biomaterials.
34. Bustamante-Torres M, Romero-Fierro D, Arcentales-Vera B, Palomino K, Magaña H, Bucio E. Hydrogels Classification According to the Physical or Chemical Interactions and as Stimuli-Sensitive Materials. *Gels*. 2021;7(4):182.
35. Muhammad Faheem Akhtar and Muhammad Hanif and Nazar Muhammad R. Methods of synthesis of hydrogels ... A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2016;24(5):554-559. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.022>
36. Kopeček J. Hydrogel biomaterials: A smart future? *Biomaterials*. 2007-12-01 2007;28(34):5185-5192. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.044
37. Marta Ghebremedhin and Sebastian Seiffert and Thomas AV. Physics of agarose fluid gels: Rheological properties and microstructure. *Current Research in Food Science*. 2021;4:436-448. doi:<https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.06.003>
38. Lei L, Bai Y, Qin X, Liu J, Huang W, Lv Q. Current Understanding of Hydrogel for Drug Release and Tissue Engineering. *Gels*. 2022;8(5):301.

39. Nordqvist D, Vilgis TA. Rheological Study of the Gelation Process of Agarose-Based Solutions. *Food Biophysics*. 2011-12-01 2011;6(4):450-460. doi:10.1007/s11483-011-9225-0
40. Jarosz A, Kapusta O, Gugala-Fekner D, Barczak M. Synthesis and Characterization of Agarose Hydrogels for Release of Diclofenac Sodium. *Materials*. 2023;16(17):6042.
41. Lucille Abad and Satoshi Okabe and Mitsuhiro Shibayama and Hisaaki Kudo and Seiichi Saiki and Charito Aranilla and Lorna Relleve and A. Comparative studies on the conformational change and aggregation behavior of irradiated carrageenans and agar by dynamic light scattering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2008;42(1):55-61. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.09.007>
42. Xiong J-YaNJaLX-YaCTKaCSBaCT-S. Topology Evolution and Gelation Mechanism of Agarose Gel. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2005;109(12):5638-5643. doi:10.1021/jp044473u , note = PMID: 16851608
43. James NB. 13 - Carrageenans. In: James NB, ed. *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists (Third Edition)*. Third Edition ed. AACC International Press; 2019:279-291.
44. Takahiro Funami and Mika Hiroe and Sakie Noda and Iwao Asai and Shinya Ikeda and Katsuyoshi N. Influence of molecular structure imaged with atomic force microscopy on the rheological behavior of carrageenan aqueous systems in the presence or absence of cations. *Food Hydrocolloids*. 2007;21(4):617-629. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.07.013>
45. Stephen AMaPGOaWP. *Food Polysaccharides and Their Applications: Second Edition*. 2016:1-733.
46. Rick PMaRCaSaAICMD. The molecular structure of kappa-carrageenan and comparison with iota-carrageenan. *Carbohydrate Research*. 1988;182(1):1-17. doi:[https://doi.org/10.1016/0008-6215\(88\)84087-4](https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)84087-4)
47. Grasdalen HaSO. Cesium-133 NMR in the sol-gel states of aqueous carrageenan. Selective site binding of cesium and potassium ions in .kappa.-carrageenan gels. *Macromolecules*. 1981;14(1):229-231. doi:10.1021/ma50002a055
48. Nilsson SaPL. Helix-coil transitions of ionic polysaccharides analyzed within the Poisson-Boltzmann cell model. 4. Effects of site-specific counterion binding. *Macromolecules*. 1991;24(13):3804-3811. doi:10.1021/ma00013a010
49. Anne-Marie H. Rheological and microstructural evidence for transient states during gelation of kappa-carrageenan in the presence of potassium. *Carbohydrate Polymers*. 1989;10(3):163-181. doi:[https://doi.org/10.1016/0144-8617\(89\)90009-X](https://doi.org/10.1016/0144-8617(89)90009-X)
50. Jordansson AMHaEEaE. Effects of potassium, sodium and calcium on the microstructure and rheological behaviour of kappa-carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers*. 1991;16(3):297-320. doi:[https://doi.org/10.1016/0144-8617\(91\)90115-S](https://doi.org/10.1016/0144-8617(91)90115-S)
51. Gunning APaKARaRMJaBGJaMVJ. Investigation of Gellan Networks and Gels by Atomic Force Microscopy. *Macromolecules*. 1996;29(21):6791-6796. doi:10.1021/ma960700h
52. Morris APGaPCaARKaANRaHJBaVJ. Characterising semi-refined iota-carrageenan networks by atomic force microscopy. *Carbohydrate Polymers*. 1998;36(1):67-72. doi:[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00112-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00112-4)
53. Pacheco-Quito E-M, Ruiz-Caro R, Veiga M-D. Carrageenan: Drug Delivery Systems and Other Biomedical Applications. *Marine Drugs*. 2020-11-23 2020;18(11):583. doi:10.3390/md18110583
54. Dsouza AaCCaATNaHDMaCJaHRA. Multifunctional Composite Hydrogels for Bacterial Capture, Growth/Elimination, and Sensing Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2022;14(42):47323-47344. doi:10.1021/acsami.2c08582 , note = PMID: 36222596
55. Katsikogianni M, Missirlis Y. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*. 2004;8(3):37-57.
56. Armentano I, Arciola CR, Fortunati E, et al. The Interaction of Bacteria with Engineered Nanostructured Polymeric Materials: A Review. *The Scientific World Journal*. 2014-01-01 2014;2014:1-18. doi:10.1155/2014/410423
57. Susarrey-Arce AUaAD-LaDGaAOaNBaJFH-SaA. Strategies applied to modify structured and smooth surfaces: A step closer to reduce bacterial adhesion and biofilm formation. *Colloid and Interface Science Communications*. 2022;46:100560. doi:<https://doi.org/10.1016/j.colcom.2021.100560>

58. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* Sep 2000;267(17):5421-6. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
59. Mariscal A, Lopez-Gigosos RM, Carnero-Varo M, Fernandez-Crehuet J. Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2009-03-01 2009;82(4):773-783. doi:10.1007/s00253-009-1879-x
60. Guerin TF, Mondido M, McClenn B, Peasley B. Application of resazurin for estimating abundance of contaminant-degrading micro-organisms. *Lett Appl Microbiol.* May 2001;32(5):340-5. doi:10.1046/j.1472-765x.2001.00916.x
61. Shiloh MU, Ruan J, Nathan C. Evaluation of bacterial survival and phagocyte function with a fluorescence-based microplate assay. *Infect Immun.* Aug 1997;65(8):3193-8. doi:10.1128/iai.65.8.3193-3198.1997
62. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* Aug 2007;42(4):321-4. doi:10.1016/j.ymeth.2007.01.006
63. Chen JL, Steele TWJ, Stuckey DC. Metabolic reduction of resazurin; location within the cell for cytotoxicity assays. *Biotechnology and Bioengineering.* 2018-02-01 2018;115(2):351-358. doi:10.1002/bit.26475
64. Katherine Zhang and Wuxiang Feng and Congrui J. Protocol efficiently measuring the swelling rate of hydrogels. *MethodsX.* 2020;7:100779. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.100779>
65. De Caro CaCH. *UV/VIS Spectrophotometry - Fundamentals and Applications.* 2015.
66. Limited ALS. Spectrophotometer. Accessed 15. 04., 2024. <https://antiteck.com/spectrophotometer-2/>
67. Vitthal SKaCS. Chapter 9 - Rheological Studies. In: Vitthal SKaCS, ed. *Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages.* Academic Press; 2016:145-182.
68. Bui BaSaAMJaOEaMSaYM. Viscoelastic properties of oil-based drilling fluids. *Annu Trans Nord Rheol Soc.* 01 2012;20:33-47.
69. Stieger M. The Rheology Handbook - For users of rotational and oscillatory rheometers. *Applied Rheology.* 10 2002;12:232-232. doi:10.1515/arh-2002-0029
70. Llyza Mendoza and Warren Batchelor and Rico FTaGG. Gelation mechanism of cellulose nanofibre gels: A colloids and interfacial perspective. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2018;509:39-46. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.08.101>
71. Sundaram Gunasekaran and MMA. Dynamic oscillatory shear testing of foods— selected applications. *Trends in Food Science & Technology.* 2000;11(3):115-127. doi:[https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00058-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00058-3)
72. Pescosolido L, Feruglio L, Farra R, et al. Mesh size distribution determination of interpenetrating polymer network hydrogels. *Soft Matter.* 2012-01-01 2012;8(29):7708. doi:10.1039/c2sm25677k
73. Kadlec M, Smilek J, Pekař M. Dynamic mechanical analysis of agarose hydrogels and its relationship to shear oscillation. *AIP Conference Proceedings.* 2023;2997(1):040005. doi:10.1063/5.0159663
74. Gérard H. Model networks based on 'endlinking' processes: synthesis, structure and properties. *Progress in Polymer Science.* 1998;23(6):1019-1149. doi:[https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(97\)00055-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(97)00055-5)
75. Terzieva S, Donnelly J, Ulevicius V, et al. Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement. *Applied and Environmental Microbiology.* 1996-07-01 1996;62(7):2264-2272. doi:10.1128/aem.62.7.2264-2272.1996
76. Bruggisser R, Daeniken Kv, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H. Interference of Plant Extracts, Phytoestrogens and Antioxidants With the MTT Tetrazolium Assay. *Planta Medica.* 2002;doi:10.1055/s-2002-32073
77. Lin J, Della-Fera MA, Baile CA. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin Gallate Inhibits Adipogenesis and Induces Apoptosis in 3T3-L1 Adipocytes. *Obesity Research.* 2005;doi:10.1038/oby.2005.115
78. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005;11:127-52. doi:10.1016/s1387-2656(05)11004-7

79. Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Egli T. Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination With Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;doi:10.1128/aem.02750-06
80. Tawakoli PN, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C. Comparison of Different Live/Dead Stainings for Detection and Quantification of Adherent Microorganisms in the Initial Oral Biofilm. *Clinical Oral Investigations*. 2012;doi:10.1007/s00784-012-0792-3
81. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry*. 1997;doi:10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x
82. Robertson J, McGoverin C, Vanholsbeeck F, Swift S. Optimisation of the Protocol for the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit for Rapid Determination of Bacterial Load. *Frontiers in Microbiology*. 2019;doi:10.3389/fmicb.2019.00801
83. Asadishad B, Ghoshal S, Tufenkji N. Method for the Direct Observation and Quantification of Survival of Bacteria Attached to Negatively or Positively Charged Surfaces in an Aqueous Medium. *Environmental Science & Technology*. 2011;doi:10.1021/es201496q
84. Regan JJ, Oldenburg PS, Park HD, Harrington GW, Noguera DR. Simultaneous Determination of Bacterial Viability and Identity in Biofilms Using Ethidium Monoazide and Fluorescent in Situ Hybridization. *Water Science & Technology*. 2003;doi:10.2166/wst.2003.0297
85. Babich H, Borenfreund E. Cytotoxicity of T-2 Toxin and Its Metabolites Determined With the Neutral Red Cell Viability Assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991;doi:10.1128/aem.57.7.2101-2103.1991
86. Baker CN, Banerjee SN, Tenover FC. Evaluation of Alamar colorimetric MIC method for antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol*. May 1994;32(5):1261-7. doi:10.1128/jcm.32.5.1261-1267.1994
87. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance In *Mycobacterium Tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;doi:10.1128/aac.46.8.2720-2722.2002
88. Trávníčková E, Mikula P, Opršal J, et al. Resazurin Assay for Assessment of Antimicrobial Properties of Electrospun Nanofiber Filtration Membranes. *Amb Express*. 2019;doi:10.1186/s13568-019-0909-z
89. Tonder Av, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-2h-Tetrazolium Bromide (MTT) Assay When Compared to Three Commonly Used Cell Enumeration Assays. *BMC Research Notes*. 2015;doi:10.1186/s13104-015-1000-8
90. Ayub MA, Hanif MA, Sarfraz RA, Shahid M. Biological Activity of *Boswellia Serrata* Roxb. Oleo Gum Resin Essential Oil: Effects of Extraction by Supercritical Carbon Dioxide and Traditional Methods. *International Journal of Food Properties*. 2018;doi:10.1080/10942912.2018.1439957
91. Teh CH, Nazni WA, Nurulhusna AH, Ahmad N, Lee H. Determination of Antibacterial Activity and Minimum Inhibitory Concentration of Larval Extract of Fly via Resazurin-Based Turbidometric Assay. *BMC Microbiology*. 2017;doi:10.1186/s12866-017-0936-3
92. Walzl A, Unger C, Kramer N, et al. The Resazurin Reduction Assay Can Distinguish Cytotoxic From Cytostatic Compounds in Spheroid Screening Assays. *Slas Discovery*. 2014;doi:10.1177/1087057114532352
93. Xiao J, Zhang Y, Wang J, Wu Y, Wang W, Ma X. Monitoring of Cell Viability and Proliferation in Hydrogel-Encapsulated System by Resazurin Assay. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010;doi:10.1007/s12010-010-8975-3
94. Zhang QQ, Ye KP, Xu X, Zhou GH, Cao JX. Comparison of Excision, Swabbing and Rinsing Sampling Methods to Determine the Microbiological Quality of Broiler Carcasses. *Journal of Food Safety*. 2011;doi:10.1111/j.1745-4565.2011.00360.x
95. Li L, Chen F, Wang D, et al. Comparison of Two Sampling Methods of Detection of Bacterial Contamination in the Hospital Environment: Moistened Swabs Versus RODAC Agar Plate. 2022;doi:10.21203/rs.3.rs-2187540/v1

96. Iversen AKS, Fritz BG, Hansen MJ, et al. Novel Sampling Technique Maintaining the Two-dimensional Organization of Microbes During Cultivation From Chronic Wounds: The Imprint Method. *Apmis*. 2024;doi:10.1111/apm.13372
97. Zheng S, Bawazir M, Dhall A, et al. Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021-02-12 2021;9doi:10.3389/fbioe.2021.643722
98. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016/04/01/ 2016;6(2):71-79. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
99. Cooke JV. A SIMPLE CLINICAL METHOD FOR THE ASSAY OF PENICILLIN IN BODY FLUIDS: AND FOR THE TESTING OF PENICILLIN SENSITIVITY OF BACTERIA. *Journal of the American Medical Association*. 1945;127(8):445-449. doi:10.1001/jama.1945.02860080017005
100. Salo S, Laine A, Alanko T, Sjöberg AM, Wirtanen G. Validation of the microbiological methods hygicult dipslide, contact plate, and swabbing in surface hygiene control: a Nordic collaborative study. *JAOAC Int*. Nov-Dec 2000;83(6):1357-65.
101. Bodenberger N, Kubiczek D, Halbgebauer D, et al. Lectin-Functionalized Composite Hydrogels for “Capture-and-Killing” of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomacromolecules*. 2018/07/09 2018;19(7):2472-2482. doi:10.1021/acs.biomac.8b00089
102. Li D, Feng Y, Zhou L, et al. Label-free capacitive immunosensor based on quartz crystal Au electrode for rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Analytica Chimica Acta*. 2011/02/14/ 2011;687(1):89-96. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.12.018>
103. Massad-Ivanir N, Shtenberg G, Raz N, et al. Porous Silicon-Based Biosensors: Towards Real-Time Optical Detection of Target Bacteria in the Food Industry. *Scientific Reports*. 2016/11/30 2016;6(1):38099. doi:10.1038/srep38099
104. Xiang C, Li R, Adhikari B, She Z, Li Y, Kraatz H-B. Sensitive electrochemical detection of *Salmonella* with chitosan-gold nanoparticles composite film. *Talanta*. 2015/08/01/ 2015;140:122-127. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.033>
105. Wan Y, Lin Z, Zhang D, Wang Y, Hou B. Impedimetric immunosensor doped with reduced graphene sheets fabricated by controllable electrodeposition for the non-labelled detection of bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011/01/15/ 2011;26(5):1959-1964. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.08.008>
106. Sunada K, Watanabe T, Hashimoto K. Bactericidal activity of copper-deposited TiO₂ thin film under weak UV light illumination. *Environ Sci Technol*. Oct 15 2003;37(20):4785-9. doi:10.1021/es034106g
107. Sunada KaWTaHK. Studies on Photokilling of Bacteria on TiO₂ Thin Film. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 03 2003;156:227-233. doi:10.1016/S1010-6030(02)00434-3
108. Sang Y, Li W, Liu H, et al. Construction of Nanozyme-Hydrogel for Enhanced Capture and Elimination of Bacteria. *Advanced Functional Materials*. 2019/05/01 2019;29(22):1900518. doi:<https://doi.org/10.1002/adfm.201900518>
109. Han D, Li Y, Liu X, et al. Rapid bacteria trapping and killing of metal-organic frameworks strengthened photo-responsive hydrogel for rapid tissue repair of bacterial infected wounds. *Chemical Engineering Journal*. 2020/09/15/ 2020;396:125194. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125194>
110. Kolewe KW, Peyton SR, Schiffman JD. Fewer Bacteria Adhere to Softer Hydrogels. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2015/09/09 2015;7(35):19562-19569. doi:10.1021/acsami.5b04269
111. Kolewe KW, Zhu J, Mako NR, Nonnenmann SS, Schiffman JD. Bacterial Adhesion Is Affected by the Thickness and Stiffness of Poly(ethylene glycol) Hydrogels. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2018/01/24 2018;10(3):2275-2281. doi:10.1021/acsami.7b12145
112. Wang Y, Guan A, Isayeva I, et al. Interactions of *Staphylococcus aureus* with ultrasoft hydrogel biomaterials. *Biomaterials*. 2016/07/01/ 2016;95:74-85. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.04.005>
113. Ana Morro and Concepción Abrusci and Jesús LPaIMaFCGaJMG. Inherent antibacterial activity and in vitro biocompatibility of hydrophilic polymer film containing chemically anchored

- sulfadiazine moieties. *European Polymer Journal*. 2017;91:274-282. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.04.012>
114. Posadowska U, Brzywczy-Wloch M, Drożdż A, et al. Injectable hybrid delivery system composed of gellan gum, nanoparticles and gentamicin for the localized treatment of bone infections. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13(5):613-20. doi:10.1517/17425247.2016.1146673
115. Das D, Ghosh P, Dhara S, Panda AB, Pal S. Dextrin and Poly(acrylic acid)-Based Biodegradable, Non-Cytotoxic, Chemically Cross-Linked Hydrogel for Sustained Release of Ornidazole and Ciprofloxacin. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2015/03/04 2015;7(8):4791-4803. doi:10.1021/am508712e
116. Varaprasad K, Mohan YM, Ravindra S, et al. Hydrogel–silver nanoparticle composites: A new generation of antimicrobials. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010-01-15 2010;115(2):1199-1207. doi:10.1002/app.31249
117. Wang J, Zhang C, Yang Y, et al. Poly (vinyl alcohol) (PVA) hydrogel incorporated with Ag/TiO₂ for rapid sterilization by photoinspired radical oxygen species and promotion of wound healing. *Applied Surface Science*. 2019/11/15/ 2019;494:708-720. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.07.224>
118. Marta Ribeiro and Maria P FaFJMaMHFaMMBaDMaHS. Antibacterial silk fibroin/nanohydroxyapatite hydrogels with silver and gold nanoparticles for bone regeneration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2017;13(1):231-239. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.08.026>
119. Cleetus CM, Alvarez Primo F, Fregoso G, et al. Alginate Hydrogels with Embedded ZnO Nanoparticles for Wound Healing Therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2020/07/15 2020;15(null):5097-5111. doi:10.2147/IJN.S255937
120. Li S, Dong S, Xu W, et al. Antibacterial Hydrogels. *Advanced Science*. 2018-05-01 2018;5(5):1700527. doi:10.1002/advs.201700527
121. Vartoukian SR. Cultivation strategies for growth of uncultivated bacteria. *J Oral Biosci*. Nov 2016;58(4):142-149. doi:10.1016/j.job.2016.08.001
122. ISO 22196:(2011), *Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces*.
123. Patakyová S. *Stanovení antimikrobiální aktivity povrchů s biocidním účinkem pomocí resazurinového testu*. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická.; 2023. <http://hdl.handle.net/11012/209628>
124. Kara S, Tamerler C, Pekcan O. Cation effects on swelling of kappa-carrageenan: a photon transmission study. *Biopolymers*. Oct 2003;70(2):240-51. doi:10.1002/bip.10467
125. Basavaraju M, Gunashree BS. Escherichia Coli: An Overview of Main Characteristics. 2023;doi:10.5772/intechopen.105508

9 ZOZNAM SKRATIEK A SYMBOLOV

Skratka	Význam
ABS	Akrylonitrilbutadiénstyren
CFU	Colony-forming unit
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
DMA	Dynamic mechanical analysis
GMA	Glycidylmetakrylát
GTAC	Glycidyltrimetylamónium chlorid
ISO	International Organization for Standardization
LVO	Lineárne viskoelastická oblasť
MIC	Minimal inhibitory concentration
MO	Mikroorganismus
MTS	3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetoxifenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazólium
MTT	3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium bromid
NBT	Nitrotetrazoliová modrá
NIR	Nearinfra-red
PAAm	Polyakrylamid
PBS	Phosphate-buffered saline
PEG	Poly(etylén glykol)
PEGDMA	Poly(etylénglykol dimetakrylát)
PES	Polyester
ROS	Reactive oxygen species
UV	Ultrafialové elektromagnetické žiarenie
VIS	Viditeľné elektromagnetické žiarenie