



# 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

# STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY POVRCHŮ S BIOCIDNÍM ÚČINKEM POMOCÍ RESAZURINOVÉHO TESTU

ANTIMICROBIAL ACTIVITY EVALUATION OF BIOCIDAL SURFACES WITH RESAZURIN ASSAY

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

**Bc. Sylvia Patakyová**

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

**Ing. Marcela Králová, Ph.D.**

**BRNO 2023**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1849/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Sylvia Patakyová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Procesy a materiály medicínských aplikací  
Vedoucí práce: **Ing. Marcela Králová, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Stanovení antimikrobiální aktivity povrchů s biocidním účinkem pomocí resazurinového testu

### Zadání diplomové práce:

1. Prostudujte relevantní literární zdroje a sestavte rešerši shrnující současný stav poznání o testech viability pomocí barvicích postupů. Soustředte se na využití těchto technik pro kvantifikaci mikrobiálních populací.
2. Optimalizujte metodu vyhodnocení fluorescence resazurinu pomocí fotografického záznamu a následné obrazové analýzy a prostudujte kinetiku konverze resazurinu v závislosti na koncentraci mikroorganismů.
3. Na základě získaných poznatků proveďte vyhodnocení antimikrobiální aktivity modelových materiálů.
4. Proveďte kritické zhodnocení studovaného postupu se zavedenými normovanými postupy.

### Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

-----  
Bc. Sylvia Patakyová  
studentka

-----  
Ing. Marcela Králová, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Táto diplomová práca sa zaoberá stanovením antimikrobiálnej aktivity povrchov s biocídnym účinkom pomocou rezazurínového testu. Resazurínová metóda stanovenia je neinvazívna kolorimetrická metóda s veľkým potencióm pre široké využitie. Jej doterajšie použitie je však obmedzené, keďže nie je zaradená medzi normované metódy. V predloženej práci je táto metóda využívaná ako spôsob zhodnotenia účinnosti imerzných experimentov s využitím antimikrobiálnych fólií a bakteriálneho kmeňa *Escherichia coli*. Intenzita fluorescencie farbiva v suspenziách, na ktoré pôsobili jednotlivé fólie, bola zachytená fotografickým záznamom a následne sa vyhodnotila pomocou obrazovej analýzy. Namerané a vypočítané hodnoty antimikrobiálneho účinku troch vzoriek aktívnych fólií s rozdielnou koncentráciou biocídnej látky sa porovnávali s výsledkami získanými v podmienkach s menšou chybovosťou (plate-reader) aj s výsledkami získanými prostredníctvom normovanej metódy na preukázanie relevancie rezazurínovej metódy a posúdenie antimikrobiálnej aktivity študovaných povrchov.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

resazurin, imerzné experimenty, antimikrobiálna aktivita, kolorimetrická metóda, E.coli

## **ABSTRACT**

This diploma thesis deals with the determination of antimicrobial activity of surfaces with biocidal effect using the resazurin test. The resazurin method of determination is a non-invasive colorimetric method with great potential for widespread use. However, its use so far has been limited as it is not included among standardized methods. The colorimetric method was used as a way to evaluate the effectiveness of immersion experiments using antimicrobial films and the bacterial strain *Escherichia coli*. The fluorescence intensity of the dye in the suspensions, which were affected by the individual foils, was captured by photographic recording and subsequently evaluated using image analysis. The measured and calculated values of the antimicrobial effect of three samples of active foils with different concentrations of the biocidal substance were compared with the results obtained in conditions with a smaller error rate (using plate-reader) and with the results obtained through a standardized method to demonstrate the relevance of the resazurin method and to assess the antimicrobial activity of studied surfaces.

## **KEYWORDS**

resazurin, immersion experiments, antimicrobial activity, colorimetric method, E.coli

## BIBLIOFRAGICKÁ CITÁCIA

PATAKYOVÁ, Sylvia. *Stanovení antimikrobiální aktivity povrchů s biocidním účinkem pomocí resazurinového testu* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149814>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Marcela Králová.

## PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a všetky použité literárne zdroje som správne a úplne odcitovala. 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

Na tomto mieste by som chcela poďakovať hlavne svojej vedúcej diplomovej práce, pani Ing. Marcela Královej, Ph.D., za jej ochotu, rady a pomoc pri meraní a písaní práce. Pánovi doc. Ing. Petrovi Dzikovi, Ph.D. za jeho trpezlivosť, ústretovosť a rady pri riešení problémov. Pani doc. Ing. Jitke Viktorovej, Ph.D. a pani RNDr. Márii Veselej, Ph.D. za možnosť pôsobiť v ich laboratóriách, rady a ochotu. Poďakovať by som chcela tiež pánovi prof. Ing. Michalovi Veselému, CSc. ako vedúcemu laboratória, kde som svoju prácu z veľkej miery merala. V neposlednom rade veľmi ďakujem kolektívu laboratória 3078 za ich povzbudzovanie a skvelú atmosféru pri práci. Veľké poďakovanie si zaslúži aj moja rodina a priatelia, ktorí ma počas štúdia neustále podporovali a boli mi oporou.



## OBSAH

1	ÚVOD .....	6
2	TEORETICKÁ ČASŤ .....	7
	2.1 Antimikrobiálne látky .....	7
	2.1.1 Typy účinku antimikrobiálnych látok .....	7
	2.1.2 Mechanizmus účinku antimikrobiálnych látok .....	8
	2.2 Zaužívané metódy stanovenia antimikrobiálnosti povrchov .....	8
	2.2.1 M26-A: Metódy pre určovanie baktericídnej aktivity antimikrobiálnych zástupcov ..	8
	2.2.2 ISO 22196 Meranie antimikrobiálnej aktivity na plastových a iných neporéznych povrchoch .....	9
	2.2.3 ISO 27447:2019 Metóda testovania antimikrobiálnej aktivity polovodičových fotokatalytických materiálov .....	10
	2.3 Resazurinová metóda stanovenia antimikrobiálnej aktivity .....	10
	2.4 Rast a množenie baktérií .....	12
	2.4.1 Rastový výťažok a rýchlosť rastu .....	13
	2.4.2 Nutričné požiadavky mikroorganizmov .....	13
	2.4.3 Metódy stanovenia počtu buniek v kultúrach mikroorganizmov .....	18
	2.5 Metódy testovania rezistencie mikroorganizmov voči antibakteriálnym látkam .....	18
	2.6 Modelový bakteriálny kmeň: <i>Escherichia coli</i> .....	20
	2.7 Použité analytické metódy .....	21
	2.7.1 UV-VIS spektroskopia .....	21
	2.7.2 Fluorescenčná spektroskopia .....	25
3	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY .....	26
4	CIEĽ PRÁCE .....	30
5	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	31
	5.1 Použité prístroje a chemikálie .....	31
	5.2 Príprava a prevedenie experimentov .....	32
	5.2.1 Príprava živného média .....	32
	5.2.2 Príprava roztoku PBS .....	32
	5.2.3 Príprava roztoku resazurínu .....	32
	5.2.4 Kalibrácia resazurinovej metódy .....	32
	5.2.5 Priebeh imerzného experimentu .....	33
	5.2.6 Test antimikrobiálnych vlastností podľa ISO 27447:2019 .....	35
	5.2.7 Resazurinová metóda pomocou mikrodilučného stanovenia .....	36
6	VÝSLEDKY A DISKUSIA .....	38
	6.1 Kalibračná krivka .....	38
	6.2 Overenie kalibračnej krivky mikrodilučnou metódou .....	39
	6.3 Imerzné experimenty .....	40
	6.4 Porovnanie resazurinovej metódy so zaužívanými metódami stanovenia CFU/ml pre porovnanie zistených antimikrobiálnych aktivít modelových povrchov .....	46
	6.4.1 Porovnanie resazurinovej metódy s mikrodilučným stanovením .....	47
	6.4.2 Porovnanie resazurinovej metódy so stanovením agarovou dilučnou metódou podľa ISO normy .....	48
7	ZÁVER .....	50
8	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....	52
9	ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK .....	54

# 1 ÚVOD

V súčasnosti je vo viacerých biologických aj enviromentálnych systémoch potrebné posudzovanie účinnosti antimikrobiálnych látok a povrchov proti bakteriálnym kmeňom. Jedná sa zväčša o povrchy a materiály, ktoré sa využívajú v odvetviach ako zdravotníctvo, stavebníctvo, potravinárstvo a domácnosti. Na posúdenie účinnosti antimikrobiálnych látok je nutné poznať ich viabilitu a koncentráciu prežívšich bakteriálnych buniek. Na to sa štandardne využívajú normované postupy, ktoré ponúkajú spoľahlivé výsledky a sú aplikovateľné na širokú škálu materiálov. Pre potreby dnešného využitia si však vyžadujú veľkú časovú náročnosť.

Alternatívou k štandardným stanoveniam sú metabolicko-kolorimetrické testy, ktoré poskytujú časovo efektívnejšie výsledky o koncentráciách baktérií in vitro. Kolorimetrický test na báze resazurínu bol vyvinutý ako časovo kinetický test, práve na tieto účely. Toto farbivo je do určitej miery netoxické a nedeštruktívne pre mikroorganizmy. Práve preto, je využívaný na kvantifikáciu mikrobiálnych populácií a stanovenie účinnosti systémov. Na to aby bolo jeho využitie možné vo viacerých odvetviach je nutná optimalizácia tejto metódy na zvýšenie jej relevancie voči štandardizovaným postupom. Vďaka tomu, že je technologicky nenáročná a nie je potrebná predúprava analyzovaných vzoriek má veľký potenciál pre rôzne využitia a nielen na prvotné skríninky baktérií.

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Antimikrobiálne látky

Látky spadajúce do tejto kategórie slúžia ako prevencia a využívajú sa taktiež k liečbe infekčných chorôb. Ak sú tieto látky mikrobiálneho pôvodu poznáme ich pod názvom antibiotiká. Tým, ktoré sú vyrobené chemickou cestou hovoríme chemoterapeutiká. Vzhľadom na to, že v súčasnosti patrí medzi antibiotiká väčšina látok s antimikrobiálnym účinkom, je pojem antibiotiká používaný na všetky látky bez rozdielu pôvodu účinkujúce na baktérie.

Na to, aby sa antimikrobiálne látky dali využiť aj ako liečivý prostriedok musia zabíjať alebo aspoň inhibovať mikróby v dávkach, ktoré nie sú pre makroorganizmus škodlivé. Z tohto dôvodu musia byť antimikrobiálne liečivá selektívne toxické pre rôzne druhy mikrobov. Toxicitu vyjadruje chemoterapeutický index, ktorý je daný pomerom dávky toxickej pre hostiteľa a dávkou účinnou na mikróby. Čím je index vyšší, tým je látka pre makroorganizmus menej škodlivá.<sup>1</sup>

#### 2.1.1 Typy účinku antimikrobiálnych látok

Pri použití je dobré vedieť aký typ účinku jednotlivé antimikrobiálne látky majú. Primárne ich delíme medzi baktericídne a bakteriostatické látky. Do skupiny baktericídnych látok sa zaraďujú také, ktoré usmrcujú mikrobiálnu bunku. Pôsobia ireverzibilne a rýchlo (klinický účinok sa dostavuje do 48 hodín). Využívajú sa pri závažných ochoreniach alebo pri zníženej obranyschopnosti pacienta.

Na druhú stranu, bakteriostatické látky reverzibilne zastavujú rast a množenie mikrobov. Ich efekt je možné pozorovať až v rámci 3 – 4 dní. Keď sa látky prestanú podávať mikróby sú schopné sa opäť začať množiť. Rozdiely medzi účinkami antibakteriálnych látok nie sú pevne stanovené a závisia na viacerých faktoroch. Sú to napríklad druh látky, koncentrácia alebo druh mikroorganizmu. Predstavu o účinkoch na jednotlivé mikróby nám dávajú hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) a minimálnej baktericídnej koncentrácie (MBC). MIC sa rozumie najnižšia koncentrácia antimikrobiálnej látky, ktorá zabraňuje nárastu konkrétneho mikroorganizmu.<sup>1</sup> MBC je definovaná ako najnižšia koncentrácia liečiva, ktorá v štandardných podmienkach (24 h) usmrtí minimálne 99,9 % populácie testovaných baktérií.<sup>2</sup> Baktericídne látky majú hodnoty MBC len niekoľkokrát vyššie ako MIC. Naproti tomu bakteriostatické by museli mať mnohonásobne vyššiu koncentráciu ako MIC aby nimi bolo možné mikroorganizmy zabíjať a to sa obvykle nedá docieľiť. Pri výbere správneho liečiva sa berie do úvahy viac faktorov ako len MIC. Z pohľadu farmakokinetických a farmakodynamických vzťahov sa antimikrobiálne látky delia na látky s účinkami závislými na čase a na látky s účinkami závislými na koncentrácii.<sup>1</sup>

### **2.1.2 Mechanizmus účinku antimikrobiálnych látok**

Antimikrobiálne látky môžu pôsobiť rôznymi spôsobmi a na rozličných miestach buniek mikroorganizmov. Hlavnými cieľmi účinku sú:

- Inhibícia syntézy bunkovej steny - baktericídne látky ako napr. netoxické beta-laktamové antibiotiká, niektoré glykopeptidy a niektoré antituberkulitiká
- Inhibícia syntézy nukleových kyselín - baktericídne ale toxické látky, napr. nitroimidazoly (rozrušujú DNA), chinolóny (ovplyvňujú DNA-gyrázu u baktérií), ansamycíny (interferáza syntézy mRNA) atď.
- Poškodenie funkcie bunkovej membrány- toxické baktericídne polypeptické antibiotiká
- Inhibícia proteosyntézy (syntéza bielkovín) - baktericídne pôsobia aminoglykozidy
- Antimetabolity - bakteriostatické, pôsobia na základe kompetitívnej inhibície, napr. sulfonamidy.<sup>1</sup>

## **2.2 Zaužívané metódy stanovenia antimikrobiálnosti povrchov**

### **2.2.1 M26-A: Metódy pre určovanie baktericídnej aktivity antimikrobiálnych zástupcov**

Norma M26-A je vydaná organizáciou Clinical and Laboratory Standards institute (CLSI) a poskytuje pokyny pre stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) antimikrobiálnych látok. Táto metóda sa používa na posúdenie účinnosti antimikrobiálnych látok proti bakteriálnym kmeňom. Stručný súhrn postupu normy:

- Výber testovaných kmeňov: testovacie kmene sa musia vybrať tak, aby zahŕňali rôzne typy baktérií, ktoré sa často vyskytujú v klinickej praxi. Vhodné kmene sa musia uchovávať pri nízkych teplotách a to by ich malo uchovávať čerstvé.
- Príprava inokulovanej kultúry: Kmeň sa musí kultivovať v živnom médiu až do fázy, keď má dostatočnú koncentráciu buniek na testovanie. Následne sa musí odmerať optická hustota kultúry a vyrovnáva sa na požadovanú hodnotu.
- Príprava riedení antimikrobiálnej látky: Antimikrobiálna látka sa musí rozpustiť v živnom médiu a potom sa pripraví sériové riedenia.
- Príprava a inkubácia testovacích plôch: Na testovanie sa používajú živné médiá obsahujúce rôzne koncentrácie antimikrobiálnej látky. Na každú doštičku sa aplikuje 0,1 ml inokulovanej kultúry.
- Inkubácia: Pláty sa inkubujú pri optimálnych podmienkach, ktoré zabezpečujú rast baktérií. Po inkubácii sa pozoruje, ktoré riedenie antimikrobiálnej látky inhibovalo rast baktérií. Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) sa určí ako najnižšia koncentrácia antimikrobiálnej látky, ktorá inhibuje rast baktérií.
- Interpretácia výsledkov: Výsledky sa interpretujú na základe hodnoty MIC.

Látka sa považuje za účinnú proti testovaciemu kmeňu, ak jej MIC je nižšia ako prahová hodnota. Prahová hodnota sa líši pre rôzne typy baktérií a antimikrobiálnych látok. Táto metóda sa používa v klinických laboratóriách na posúdenie účinnosti antimikrobiálnych látok a pomáha pri výbere správnej liečby pre pacientov s infekciami. Vzhľadom na to, že baktérie neustále mutujú je dôležité monitorovať a aktualizovať informácie o MIC pre rôzne kmene a antimikrobiálne látky. Okrem toho sa metóda MIC používa aj na stanovenie minimálnej baktericídnej koncentrácie (MBC), ktorá zisťuje najnižšiu koncentráciu antimikrobiálnej látky, ktorá baktérie zabíja. Táto norma zahŕňa aj pokyny pre kontrolu kvality, ktoré sa týkajú sterilitného postupu, kvality živného média, prípravy riedení antimikrobiálnych látok a sledovania stability MIC. Tieto kontroly kvality pomáhajú zabezpečiť presné a spoľahlivé výsledky testovania.<sup>3</sup>

### **2.2.2 ISO 22196 Meranie antimikrobiálnej aktivity na plastových a iných neporéznych povrchoch**

ISO 22196 je medzinárodná norma, ktorá poskytuje postup pre testovanie antibakteriálnej účinnosti netextilných povrchov a materiálov. Norma sa zameriava na povrchy a materiály, ktoré sa používajú v odvetviach ako zdravotníctvo, stavebníctvo, potravinárstvo a domácnosti. Cieľom normy je poskytnúť jednotnú testovaciu metódu na posúdenie schopnosti týchto povrchov a materiálov zničiť baktérie a zabráňovať ich rastu.

Testovanie antimikrobiálnej účinnosti podľa tejto normy sa vykonáva na základe dvoch bakteriálnych kmeňov. Konkrétne *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Tieto konkrétne baktérie sú používané ako modelové organizmy, pretože sú bežne prítomné v prostrediach a môžu spôsobovať zdravotné problémy. Vybraný materiál sa pripravuje a sterilizuje podľa stanovených postupov. Po sterilizácii sa vzorky umiestnia do Petriho misky s naneseným kmeňom baktérie a umiestnia sa do inkubačnej komory na 24 hodín. Po uplynutí časového intervalu sa stanovuje počet životaschopných baktérií metódou kultivácie na platni, ktorá sa musí inkubovať ďalších 40 až 48 hodín. Následne sa počíta koľko baktérií zostáva na povrchu a z tejto hodnoty sa vypočíta miera redukcie baktérií. Testovanie sa vykonáva pri kontaktných časoch 24 až 48 hodín niekoľkokrát.

Výsledky testov môžu byť použité na hodnotenie účinnosti antimikrobiálnych vlastností netextilných povrchov a materiálov a ich vzájomné porovnanie. Norma poskytuje aj pokyny na hodnotenie vplyvu faktorov prostredia ako sú teplota či vlhkosť.

ISO 22196 je vhodným nástrojom pre výrobcov a spotrebiteľov povrchov a materiálov na posudzovanie ich antibakteriálnych vlastností a ich vhodnosť pre použitie v prostrediach, kde je nevyhnutná vysoká úroveň hygieny.<sup>4</sup>

### **2.2.3 ISO 27447:2019 Metóda testovania antimikrobiálnej aktivity polovodičových fotokatalytických materiálov**

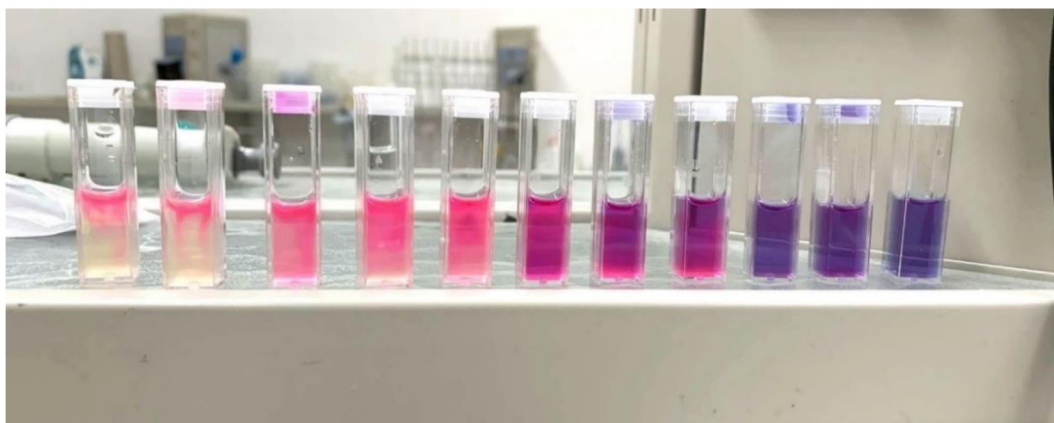
Táto norma sa zaoberá testovaním antibakteriálnej aktivity polovodičových fotokatalytických materiálov a ponúka štandardizovaný postup na meranie antimikrobiálnej aktivity aplikovateľný na akékoľvek fotokatalytické materiály.

Testovanie v tejto norme zohráva veľkú úlohu pri hodnotení účinnosti materiálov pri inhibícii rastu baktérií a ich následné porovnanie, charakterizáciu a modifikáciu ich vývoja k lepšej spoľahlivosti. Metóda testovania zahŕňa prípravu vzoriek materiálov, ich kontakt s baktériami a ich expozíciu svetlu aby bolo možné testovať ich vlastnosti voči bakteriálnym kmeňom. Vzorka materiálu sa umiestni do Petriho misky a následne sa na ňu naniesie bakteriálna suspenzia, ktorá sa prekryje krycím sklíčkom prípadne fóliou v závislosti od skúmaného materiálu. Petriho miska sa uzavrie skleneným vrchnákom aby sa predišlo kontaminácii a zmenám fyzikálnych faktorov prostredia. Zároveň s týmito vzorkami sa pripravujú rovnakým spôsobom aj modelové bez použitia fotokatalytického materiálu. Jedna séria vzoriek sa vystavuje svetlu a druhá sa nechá pôsobiť v tmavom prostredí. Po expozícii sa suspenzie vymyjú z povrchov a následne sa počet životoschopných baktérií určuje pomocou agarovej dilučnej metódy. Výsledky sa navzájom porovnávajú a na základe porovnania modelového materiálu s fotokatalytickým povrchom sa určuje percento účinnosti záujmového povrchu.<sup>5</sup>

### **2.3 Resazurinová metóda stanovenia antimikrobiálnej aktivity**

Alternatívou k štandardným stanoveniam sú metabolicko-kolorimetrické testy, ktoré poskytujú časovo efektívnejšie výsledky o koncentráciách baktérií in vitro. Kolorimetrický test na báze resazurínu bol vyvinutý ako časovo kinetický test, práve na tieto účely. Poskytuje vhodnú alternatívu porovnateľnú s metódou počítania jednotiek tvoriacich kolónie alebo meraniam absorpcie.<sup>6</sup> Táto metóda umožňuje analýzu mikrobiálnych biofilmov bez nutnosti sonifikácie alebo akejkoľvek inej zložitej predúpravy.<sup>7</sup>

Princípom tejto metódy je redukcia resazurínu pri metabolickej reakcii mikrobiálnych buniek. Resazurín je netoxickým, oxidačno-redukčným farbivom, nedeštruktívnym pre mikroorganizmy.<sup>8</sup> Toto farbivo je veľmi stabilné v kultivačnom médiu bez buniek ale v prítomnosti živých buniek sa rýchlo redukuje. Počas reakcie mení farbu z modrej na ružovú až po číru, pretože kyslík sa stáva limitujúcim v rámci média (viď Obr. 1).



Obr. 1: Postupná redukcia resazurínu. Vpravo je ešte nezredukované farbivo v suspenzii a smerom doľava je postupný prechod z rezorufínu až na číry dihydrorezorufín.

Prvá etapa tejto redukcie je spôsobená stratou atómu kyslíka voľne viazaným na dusík fenoxazínového jadra (vid' Obr. 2). Táto zmena na ružový rezorufín je ireverzibilná atmosférou kyslíka. Druhá etapa redukcie na bezfarebný hydrorezorufín je reverzibilná vzdušným kyslíkom.<sup>9</sup>



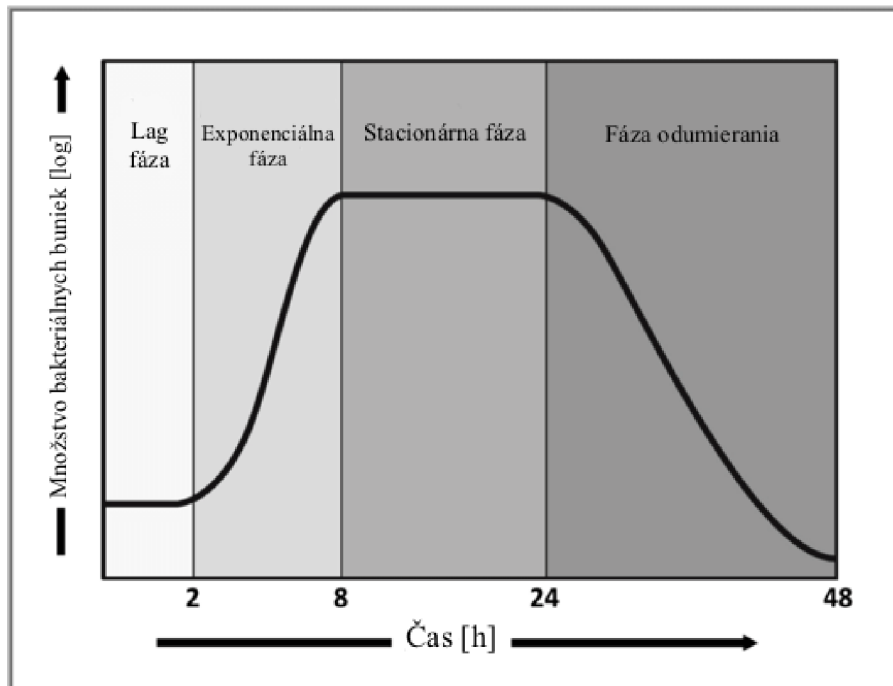
Obr. 2: Princíp resazurinového testu viability.<sup>10</sup>

Prepočet výsledných fluorescenčných jednotiek na množstvo životoschopných baktérií vyjadrených ako CFU/ml sa uskutočňuje pomocou kalibračných kriviek. Tie musia byť zostavené pre každý bakteriálny kmeň osobitne, čo je jedinou veľkou nevýhodou tohoto testu oproti štandardným, kde sa kalibračné krivky nerobia. Kalibračná krivka opisuje vzťah medzi koncentráciou baktérií (CFU/ml) a príslušným mikrobiálne generovaným rezorufinom (RFU).<sup>7</sup> Tým, že sa resazurín zmieša s baktériami v kvapalnom médiu je možná ich kvantifikácia vďaka systematickému odfarbovaniu resazurínu na rezorufín, ktorého fluorescenčná emisia je úmerná bakteriálnym koncentráciám.<sup>6</sup> Resazurinový test je robustná a spoľahlivá metóda na zistenie cytotoxicity, skrining antibiotík a hodnotenie bakteriálnej kontaminácie.

## 2.4 Rast a množenie baktérií

Rast baktérií znamená zvyšovanie počtu buniek. Počas rastu baktérie zväčšujú svoju veľkosť až kým sa približne zdvojnásobi a potom nastáva proces delenia. Čas, potrebný na rast a delenie bunky, sa nazýva generačná doba. Táto doba závisí od vonkajších podmienok, predovšetkým od dostupnosti živín a teploty prostredia. Pri optimálnych podmienkach je generačná doba *E. coli* približne 20 minút.<sup>2</sup>

Na to aby bolo možné analyzovať rast bakteriálnej populácie je základným parametrom rast čistej kultúry v uzavretom, umelo pripravenom tekutom homogénnom prostredí s nadbytkom živín.<sup>11</sup> Vzniká tzv. stacionárna kultúra. Je to klasické pestovanie baktérií, kde sa do nádoby s kultivačným médiom vnesie inokulum buniek a po určitej dobe vzniká bakteriálna kultúra. Populácia bakteriálnych buniek prechádza rastovým cyklom s viacerými fázami.<sup>1</sup> Semilogaritmicným znázornením nameraných hodnôt počtu živých buniek dostávame rastovú krivku a podľa jej priebehu sa rozdeľuje rastový cyklus do viacerých fáz (vid' Obr. 3).<sup>12</sup>



Obr. 3: Štandardná rastová krivka.<sup>13</sup>

Počiatočnou fázou rastovej krivky je lag-fáza. V nej baktérie nepribúdajú, pretože sa prispôbujú novým životným podmienkam. Dĺžka tejto fázy je závislá od aktuálneho fyzického stavu buniek, kultivačných podmienok a typu média, ktoré bolo použité. Organizmy sa po prenesení do rovnakého kultivačného média zo stresových podmienok spamätávajú rýchlejšie a tým je lag-fáza kratšia. Po prenesení organizmov z iných podmienok môžu často zahynúť a spomaľuje sa syntéza enzýmov potrebných na rast, prispôbenie metabolizmu a aj delenie buniek.<sup>2</sup> Lag-fáza končí krátkym obdobím, kde sa bunky začínajú deliť, nie však konštantnou rýchlosťou (tzv. fáza zrýchleného rastu).<sup>1</sup> V niektorých prípadoch môže lag-fáza chýbať úplne, a to najmä v prípade veľkého inokula



exponenciálne rastúcej kultúry vloženého do bohatého média s rovnakým zložením ako predošlé.<sup>14</sup>

Nasleduje fáza exponencionálneho rastu. Začína vtedy, keď rýchlosť rastu buniek nadobúda maximálnu a konštantnú hodnotu. Väčšina buniek je v tejto fázy živá a baktérie sa rovnomerne delia. Ich počet sa zdvojnásobuje počas generačnej doby. To aká je rýchlostná konštanta rastu závisí od genetických faktorov organizmu ale aj od podmienok prostredia (teplota, zloženie kultivačného média).<sup>2</sup> Exponenciálna fáza končí keď sa zloženie kultivačného média postupne zhoršuje. Koncentrácia živín klesá a pH je ovplyvňované vylúčenými metabolitmi, čo vedie k spomaľovaniu rýchlosti delenia buniek (fáza spomaleného rastu).<sup>1</sup>

Po nej sa rastový cyklus posúva do stacionárnej fáze. Táto fáza obsahuje pomaly sa deliace bunky, kde počet pribúdajúcich je kompenzovaný počtom odumierajúcich. Za týchto podmienok v konštantnej stacionárnej fázy hovoríme o maximálnej populácii buniek. Doterajší nárast počtu buniek spôsobil zníženie koncentrácie živín a akumuláciu toxických metabolických produktov. S tým súvisí aj pokles pH, ktorý býva častou príčinou zastavenia rastu. Po určitej dobe sa rovnováha medzi vznikajúcimi a odumierajúcimi bunkami posúva a nastáva fáza odumierania.

Vo fáze odumierania sa počet buniek exponencionálne znižuje. Strata viability je pri bunkách pomalý proces. Dokonca sa celkový počet buniek môže zdať nezmenený a začne sa zmenšovať až po samotnej lýze buniek.<sup>12</sup>

V prirodzenom prostredí sa baktérie množia pomalšie ako keď sa nachádzajú v laboratórnych podmienkach. Príčinou je nestálosť prostredia (hlavne teploty), obmedzený zdroj živín alebo aj pôsobenie iných mikróbov. V prirodzenom prostredí sa baktérie správajú v niektorých prípadoch odlišne, napr. rozmnožujú sa odlišným spôsobom a vytvárajú biofilmy.<sup>1</sup>

#### **2.4.1 Rastový výťažok a rýchlosť rastu**

Celkový výťažok je definovaný ako rozdiel medzi pôvodným počtom buniek a výsledným počtom buniek, ktorý je dosiahnutý v stacionárnej fáze. Rýchlosť rastu populácie je závislá na viacerých faktoroch:

- Druh mikroorganizmu a jeho genetická výbava
- Zloženie živného média
- Koncentrácia limitujúcej živiny
- Fyzikálno-chemické a fyzikálne faktory prostredia.<sup>15</sup>

#### **2.4.2 Nutričné požiadavky mikroorganizmov**

Na to aby bola možná tvorba bunkovej hmoty, musí mať mikroorganizmus živiny z prostredia, ktoré pokrývajú energiu a stavebné kamene na jej tvorbu. Keďže prostredie ovplyvňuje baktériu a baktéria následne mení prostredie je potrebné vždy zvoliť vhodné prostredie pre vývoj bakteriálnej bunky. Musí obsahovať dostatok vody na priebeh reakcií v živých mikroorganizmoch a okrem zdrojov energie aj biogénne prvky, ktoré sú súčasťou bunkovej hmoty.<sup>14</sup>

Je nevyhnutné zachovávať aj správnu koncentráciu iónov aby nedošlo k inhibícii enzýmov, ktorých nadbytok by mohol viesť k zastaveniu rozmnožovania. Vhodné prostredie pre rast a rozmnožovanie mikroorganizmov musí obsahovať:

- Zdroj uhlíka
- Zdroj dusíka
- Biogénne prvky
- Rastové faktory
- Zdroj energie - slúži na biosyntézu molekúl potrebných na tvorbu štruktúry bunky

Uhlík slúži na syntézu aminokyselín, sacharidov, lipidov, organických báz a iných nízkomolekulárných látok, ktoré sú potrebné na tvorbu kostry makromolekúl.<sup>15</sup> V laboratórných podmienkach obsahuje kultivačné médium ako zdroj uhlíka jednoduché cukry alebo polysacharidy, ktorý sa nerozkladá ani nereaguje s ostatnými komponentami. Zdrojom môžu byť aj prídavky, ktoré obsahujú aj rastové faktory ako napríklad peptón, kaseínový izolát alebo mäsový extrakt. Jedným zo zdrojov je aj samotný oxid uhličitý, ktorý si vyžadujú hlavne autotrofné organizmy, ktoré ho využívajú aj ako zdroj energie.<sup>16</sup>

Dusík má úlohu pri tvorbe amino- a iminoskupín, ktoré sú súčasťou aminokyselín a organických báz.<sup>15</sup> Mikroorganizmy ho môžu získavať v podobe vzdušného dusíku, dusitanov, dusičnanov a amónnych solí (vo forme fosfátov a síranov). Organicky viazaný je dostupný v aminokyselinách, peptidoch, natívnych bielkovinách a peptónoch. Pre heterotrofné organizmy sú najvhodnejšími zdrojmi amónne soli v podobe močoviny. Koncentrácia by sa mala upravovať tak aby v jednom litri média bolo približne 0,1 g dusíka.<sup>16</sup>

Hlavné biogénne prvky, ktoré musia byť v živných médiách obsiahnuté sú fosfor a horčík, ktoré pomocou reakcií prenášajú energiu. Fosfor je súčasťou nukleových kyselín, viacerých koenzýmov a fosfolipidov. Jeho zlúčeniny kumulujú energiu do makroergických väzieb a tým energeticky zaistuje procesy biosyntézy. Pri nedostatku fosforu je rast spomalený a kvasné procesy tiež. Jeho zdrojom sú pre mikroorganizmy anorganické fosfáty a do živných médií sa pridávajú amónne soli.<sup>15</sup> Ďalšie biogénne prvky, ktoré sú pridávané vo formách solí sú draslík, železo, chlór, molybdén, zinok, meď, kobalt, nikel či bór.<sup>16</sup> Väčšina týchto prvkov je obsahom metaloenzýmov alebo sú aktivátormi enzymatických reakcií.

Rastové faktory vyžadujú len organizmy, ktoré nie sú schopné si ich nasyntetizovať samé prípadne sa v ich prirodzenom prostredí nenachádzajú. Sú to napríklad auxotrofné mikroorganizmy, patogénne alebo mliečne baktérie (vyžadujú až 6 vitamínov). Rastovými faktormy môžu byť: aminokyseliny, purínové a pyrimidinové zásady, vitamíny, vyššie mastné kyseliny či amíny.<sup>11</sup> Napríklad *E.coli* rastie dobre v úplne anorganickom médiu s glukózou, keďže je prototrof a vyrába si stavebné molekuly tela zo živín a rastové faktory nepotrebuje na rozdiel od auxotrofných baktérií, ktoré to nevedia.<sup>14</sup>

## Faktory prostredia ovplyvňujúce rast

### Teplota prostredia

Teplota vonkajšieho prostredia je jedným z hlavných faktorov, ktoré ovplyvňujú rýchlosť rozmnožovania a rast mikroorganizmov. Rozmedzie teplôt, v ktorom je organizmus schopný prežitia sa pre každý druh líši. Teplota ovplyvňuje prežitie dvoma navzájom opačnými spôsobmi. Rast sa zrýchľuje, pri zvyšovaní teploty. Vzťahuje sa na to zvýšená rýchlosť enzýmových reakcií. Ak však teplota dosiahne vyššiu hodnotu ako je horná hranica prežitia daného druhu, dochádza k nevratnej denaturácii proteínov a bunkových štruktúr. Tento proces zastaví rast buniek a vedie k smrti bunky.

Každý mikroorganizmus má určité medze prežitia v rámci teplotných podmienok. Pri minimálnej teplote rastu, sa bunky rozmnožujú ešte stále zistiteľnou rýchlosťou. Pod touto hranicou rast nie je možný, pretože dochádza k stuhnutiu pohyblivosti lipidických membrán a zastavuje sa transport molekúl. Stanovenie tejto teploty je ale pomerne zložitá, pretože s klesajúcou teplotou, klesá aj rýchlosť rozmnožovania. Pri optimálnej teplote je populácia schopná množiť sa najväčšou rýchlosťou. Pri zvýšení teploty nad optimálnu dochádza k poklesu rýchlosti rozmnožovania a po prekročení maximálnej teploty sa rast zastavuje. Maximálna teplota zodpovedá hodnote, pri ktorej dochádza k denaturácii bunkových štruktúr. Optimálna teplota je hodnotami bližšia k maximálnej ako k minimálnej hranici rastu a prežitia.<sup>2</sup> Podľa vzťahu mikroorganizmov k teplu sa rozdeľujú do skupín:

- Psychrofilné - majú nízke teplotné optimum (0 – 0 °C), chladiarenské výrobky
- Mezofilné - stredné teplotné optimum (20 – 45 °C), patria sem prevažne patogény<sup>15</sup>
- Termofilné - vysoké teplotné optimum (45 - 60° C), kompost, zisk termorezistentných enzýmov (potravinárstvo, pracie prášky)
- Hypertermofilné - extrémne vysoké teplotné optimum (60 – 100 °C), podmorské sopečné oblasti.<sup>1</sup>

Najrozšírenejšie v bežnej prírode sú mezofilné baktérie. *Escherichia coli* je typickým zástupcom tohto druhu baktérií. Optimálna teplota rastu väčšiny jej kmeňov je 37 °C. Maximálna teplota je až 48 °C a minimálna je 8 °C.<sup>2</sup>

### Voda

Tým, že voda je základnou zložkou živej hmoty, je zodpovedná aj za veľké percento váhy bakteriálnej bunky. Slúži aj ako rozpúšťadlo molekulám pre transport cez cytoplazmatickú membránu a zúčastňuje sa aj na metabolických reakciách vo vnútri mikroorganizmu. Väčšina baktérií pre svoj život vodu nevyhnutne vo svojom prostredí potrebuje. Patria medzi hydrofilné organizmy. Znížením množstva dostupnej vody pod potrebnú hranicu sa predlžuje generačná doba prípadne nastáva smrť bunky. Výnimkou je lyofilizácia (sušenie mrazom), ktorou sa baktérie dlhodobo uchovávajú. Ku skupine citlivej na nedostatok vody patria najmä gramnegatívne baktérie. Protí vyschnutiu sú odolnejšie grampozitívne a acidorezistentné baktérie. S vodou, ktorá je naviazaná iba na častice prostredia vedia prežiť xerofilné baktérie a plesne.<sup>1</sup>

### **Hydrostatický tlak**

Väčšina mikróbov sa rozmnožuje za normálneho atmosférického tlaku. Zvyšovaním sa obyčajne rozmnožovanie spomaľuje a pri tlaku nad 30 – 40 MPa sa rozmnožovanie zväčša zastavuje.<sup>15</sup> Na to, aby mikroorganizmy mali aj pri vysokých teplotách dostupnú vodu v kvapalnom skupenstve je potrebný zvýšený hydrostatický tlak. Tie kmene, ktoré rastú lepšie za zvýšeného hydrostatického tlaku a vyskytujú sa v extrémnych hĺbkach sa nazývajú barofily. Hydrostatický tlak narastá každých 10 m hĺbky o jednu atmosféru. Barotolerantné mikroorganizmy prevládajú do hĺbky 2000 metrov.<sup>1</sup>

### **Osmotický tlak**

Väčšinu mikroorganizmov nachádzame na miestach, kde je koncentrácia rozpustených látok nižšia ako v ich bunkovej cytoplazme. Toto prostredie sa nazýva hypotonické. Prostredie, v ktorom bunky podliehajú plazmolýze (strácajú vodu a prestávajú sa množiť) voláme vysoko hypertonické. Mikroby, ktoré sa v tomto prostredí s vyšším obsahom solí množia spadajú pod halofily. Tie vieme prerozdeliť do ďalších troch podskupín. Halotolerantné organizmy vyššiu koncentráciu solí nevyžadujú. Obligátne halofily sa vyskytujú v moriach a extrémne halofily pri bežných koncentráciách soli ani nevyrastú. Tieto a bežné halofilné organizmy majú mimoriadnu schopnosť odbúravať toxické látky.<sup>1</sup>

### **pH**

Koncentrácia vodíkových iónov v prostredí má poznateľný vplyv na rast a množenie mikroorganizmov. Pre optimálny rast je vyhovujúce rozmedzie veľmi úzke a pre jednotlivé kmene sa vzájomne odlišujú. Neutrálne prostredie vyžaduje väčšina mikroorganizmov vrátane patogénov. *Escherichia coli* má minimálne pH 4,3. Optimálne 6,0 - 8,0 a maximálne 9,5. Acidofilné baktérie rastú priaznivo v kyslom prostredí. V takýchto podmienkach prežívajú predovšetkým črevné baktérie, ktoré produkujú aj rôzne kyseliny. Extrémom pri črevných baktériách je, že znášajú aj alkalické pH žlče. Najtypickejšími alkalifilnými baktériami sú napríklad denitrifikačné alebo urobaktérie.<sup>12</sup>

pH prostredia nemá veľký vplyv na pH vo vnútri bakteriálnej bunky. Tie majú vo väčšine v cytoplazme neutrálne pH, ktoré zabezpečuje stabilitu v bunke.<sup>2</sup> Aj napriek tomu koncentrácia vodíkových iónov prostredia ovplyvňuje metabolické aktivity. Pri pestovaní mikroorganizmov v laboratórnom prostredí v uzavretých systémoch sú do média vylučované produkty metabolizmu kyslej povahy. Keď sa vyčerpajú funkcie média (vyživovacia) kultúry prestanú rásť pretože pH klesne.<sup>1</sup> Pre udržanie reakcií prostredia na potrebnej úrovni sa využívajú tlmiace roztoky, najčastejšie soli slabých kyselín, fosfáty, octany a uhličitaný. Hodnoty pH majú vplyv aj na odolnosť buniek voči teplotám. Čím väčšia je odchýlka od optimálneho pH, tým sú mikroorganizmy citlivejšie na maximálne teplotné hodnoty.<sup>15</sup>

## **Svetlo**

Väčšina mikroorganizmov, ktoré nevykonávajú fotosyntézu k svojmu rastu svetlo nepotrebnú alebo na ne môže mať letálny účinok.<sup>12</sup> Baktérie najlepšie rastú zvyčajne bez prístupu svetla. Molekuly DNA v bunkových štruktúrach sú dokonca poškodzované ultrafialovým žiarením, ktoré je obsiahnuté v slnečnom svetle.<sup>2</sup> Pre fototrofné organizmy je naopak infračervené žiarenie a viditeľné svetlo zdrojom energie a pre niektoré baktérie stimuluje tvorbu farbív.<sup>15</sup>

## **Prítomnosť kyslíka**

Vzhľadom na obsah kyslíka potrebný na rast baktérií sa organizmy delia na dve hlavné skupiny a to aeróbne, ktoré sú schopné rásť v prítomnosti kyslíka a anaeróbne, ktoré rastú bez jeho prítomnosti. Obligátne aeróbne organizmy vyžadujú kyslík ako podmienku pre svoj rast, sú to napríklad gramnegatívne nefermentujúce baktérie. Fakultatívne anaeróbne mikroorganizmy najlepšie rastú v aeróbných podmienkach ale dokážu prežiť aj bez kyslíka. Ďalšou skupinou sú mikroaerofilné baktérie, ktoré rastú len pri nízkej koncentrácii kyslíka, približne 5 - 10 %. Na rozdiel od nich, striktné anaeróbne organizmy sú v prítomnosti kyslíka inaktivované a aj v stopových množstvách je pre ne kyslík toxický. Do tejto skupiny patria napríklad extrémofilné baktérie. Špeciálnym prípadom sú aerotolerantné baktérie, ktoré sa dokážu množiť aj za prítomnosti kyslíka ale v anaeróbných kultivačných médiách. Túto skupinu zastupujú baktérie anaeróbne, ktoré sa nachádzajú v slizniciach človeka.<sup>2</sup>

## **Oxidačnoredukčný potenciál**

Ak je potenciál pozitívny, prevládajú v prostredí oxidujúce podmienky. Kultivačné pôdy, ktoré sú vystavené kyslíku sú zreteľne oxidované a to vyhovuje hlavne aeróbnym mikroorganizmom. Rozpustnosť kyslíka je však v kvapalinách stále pomere nízka a narastajúcou teplotou klesá. Preto sa privádza vzduch do kultivačných nádob. Mikróby pri svojich metabolických aktivitách znižujú redoxný potenciál (niekedy k takým nízkym hodnotám, až sú anaeróbne mikróby schopné sa množiť). Prostredie je výrazne redukované keď má oxidačnoredukčný potenciál zápornú hodnotu. Takýto potenciál vyžadujú práve anaeróby.<sup>1</sup> Redukované prostredie sa dá dosiahnuť odstránením kyslíka alebo pridaním redukčných látok ako napr. cysteín alebo kyselina askorbová. Mechanizmus pôsobenia redox potenciálu spočíva vo funkciách enzýmov a ich regulácie.<sup>15</sup>

### 2.4.3 Metódy stanovenia počtu buniek v kultúrach mikroorganizmov

Na to aby bolo možné monitorovať rast mikroorganizmov je známych viacero metód na kvantifikáciu bunkových kultúr. Jednou z nich je pomocou mikroskopických techník. Pri tejto technike sa počet buniek počíta priamo pomocou mikroskopu vďaka mriežke na podložnom sklíčku, na ktorom je vytvorený preparát z kultúry.

Významnou metódou je tiež kultivačná. Pri nej sa pripraví z kultúr séria geometrických riedení, ktorá sa v určitom objeme naniesie na tuhé médium. Po kultivácii sa spočíta počet kolónií. Tie sa prepočítajú na 1 ml nezriedenej suspenzie baktérií. Každá bunka z kultúry by mala na médiu vytvoriť kolóniu a práve preto sa počet baktérií v kultúre vyjadruje ako kolónie tvoriace jednotky (CFU).

Na stanovenie počtu buniek sa využívajú aj spektrofotometrické metódy. V tekutých médiách bunky rozptyľujú svetlo a počas rastu ich zakaľujú. Práve vďaka tomu sa spektrofotometricky meria turbidita kultúry (zníženie priehľadnosti). Turbidita sa vyhodnocuje pomocou McFarlandovej zákalovej stupnice. Konkrétnym stupňom na tejto škále je prostredníctvom zákalu príslušnej intenzity priradená hodnota počtu baktérií. Pre štandardizované laboratórne testy sa vyžaduje obsah  $1 - 3 \cdot 10^8$  baktérií v 1 ml suspenzie, čomu odpovedá zákal stupňa 0,5 na McFarlandovej škále.<sup>2</sup>

### 2.5 Metódy testovania rezistencie mikroorganizmov voči antibakteriálnym látkam

Testovanie mikroorganizmov na ich citlivosť voči látkam, ktoré sú antimikrobiálne bežne prebieha fenotypovými alebo genotypovými metódami. Rastové (kultivačné) metódy spadajú pod fenotypové a tie sa ďalej delia medzi kvantitatívne a kvalitatívne (viď. Tab. 1).

Tab. 1: Metódy stanovenia citlivosti mikroorganizmov voči antimikrobiálnym látkam.<sup>2</sup>

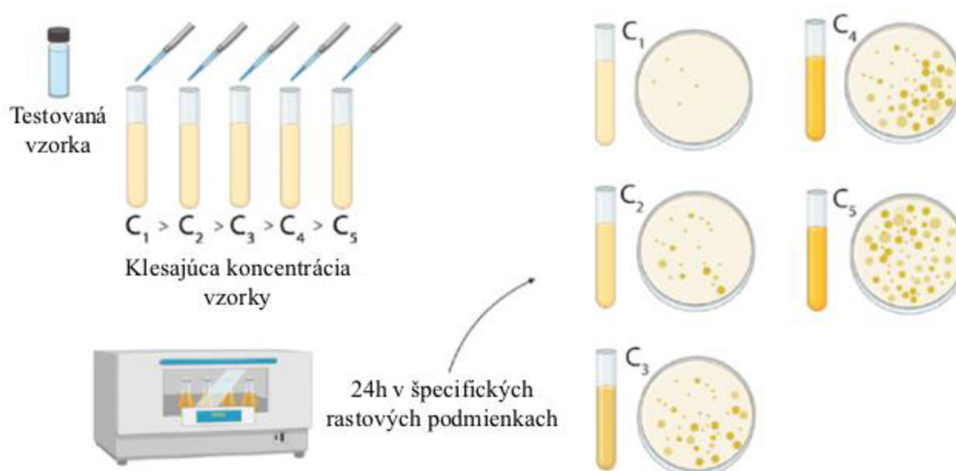
Kultivačné metódy testovania citlivosti/rezistencie	
Fenotypové metódy	
<b>Kvalitatívne</b> (C, I, R)	<b>Kvantitatívne</b>
	Stanovenie MIC/MBC (mg/l)
Diskový difúzny test	Agarová dilučná metóda
Breakpointové testy	Bujónová dilučná metóda
	Bujónová mikrodilučná metóda
	Gradientový test ( $\epsilon$ test)
	Kolorimetrické a automatizované metódy

Metódy na základe fenotypu sa zakladajú na stanovení mikrobiálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) vyjadrenej v mg/l. MIC je definovaná ako najnižšia koncentrácia antimikrobiálnej látky, ktorá v štandardných podmienkach inhibuje voľným okom pozorovaný rast testovaného mikroorganizmu v tekutom alebo na povrchu pevného média.

Jedná sa o kvantitatívny parameter, potrebný pri výpočtoch farmakologických prediktívnych parametrov- Pk/Pd na individuálne prispôsobenie dávkovania liečiv a slúži aj na kontrolu pri šíreniach infekcií a epidemiológiu (trendy rezistencie).

### Agarová dilučná metóda

Metóda využíva pevnú formu média s rôznymi koncentraciami antimikrobiálnej látky v jednotlivých agarových médiách. Do týchto vzoriek sa očkujú bakteriálne kmene a po časovom intervale inkubácie sa vyhodnocuje ich prítomnosť. V tomto prípade je MIC najnižšia koncentrácia antimikrobiálnej zložky, na ktorej nenastal rast bakteriálneho kmeňa. Na obrázku (viď Obr. 4) je znázornená schéma priebehu tejto metódy v praxi.



Obr. 4: Schéma agarovej dilučnej metódy.<sup>17</sup>

### Bujónová dilučná metóda, mikrodilučné metódy

Častejšie ako pevná forma média sa využíva médium v tekutom stave. Antimikrobiálna látka sa riedi v skúmavkách (dilučná metóda) alebo na mikrotitračnej platničke (mikrodilučná metóda). Do média s antimikrobiálnou látkou sa pridáva konkrétne množstvo baktérií. Po inkubácii sa hodnotí prítomnosť baktérií viacerými spôsobmi ako napr. voľným okom, kolorimetricky alebo fotometricky. Okometricky sa hodnotí nárast kmeňov baktérií na základe tvorby sedimentu, povlaku alebo zákalu. Fotometricky sa vyhodnocuje meraním zákalu a kolorimetricky pomocou farebného indikátoru rastu baktérií. MIC je najnižšia koncentrácia antimikrobiálnej zložky na ktorej nenastal rast bakteriálneho kmeňa.

### Kolorimetrické a automatizované metódy

Modifikácia bujónovej mikrodilučnej metódy. Využíva na indikáciu rastu baktérií tetrazoliové soli. Pri tejto metóde sa využíva plastová platnička s reakčnými terčikmi, ktoré obsahujú vzostupné riedenia testovaných antimikrobiálnych látok. Na jednu platničku sa využíva len jeden bakteriálny

kmeň čo umožňuje testovanie rezistencie viacerých antimikrobiálnych látok. Čas inkubácie inokula v platničke pri týchto testoch je približne 18 až 24 hodín. Po uplynutí tohto času sa pridáva rastový indikátor a nastáva inkubácia ďalšiu pol hodinu. Rast baktérií sa prejaví zmenou farby indikátora. MIC je najnižšia koncentrácia antimikrobiálnej látky inhibujúcej rast baktérií, kde sa neprejaví farebná zmena indikátora. Vyhodnocovanie je automatizované pomocou počítačového softvéru.

### **Gradientový test**

ε test je kombináciou difúzie antimikrobiálnej látky do média a stanovenia MIC. Komerčne je dostupný ako plastový pásik, na ktorý je nanosená koncentračná rada testovanej antimikrobiálnej látky. Pásik sa umiestni na kultivačné médium bakteriálneho kmeňa a po inkubácii vzniká elipsovité zóna inhibície rastu. MIC je hodnota antimikrobiálnej látky na mieste, kde okraj elipsovitého tvaru inhibičnej zóny pretne stupnicu na plastovom prúžku. Metóda je vhodná na testovanie málo komerčných antibiotík alebo na testovanie rastovo náročných baktérií prípadne pomaly rastúcich mikroorganizmov vrátane anaeróbných baktérií a kvasiniek.<sup>2</sup>

## **2.6 Modelový bakteriálny kmeň: *Escherichia coli***

Patrí medzi fakultatívne anaeróbne gramnegatívne baktérie. Bunky tejto baktérie majú tvar tyčínok s dĺžkou približne 2 μm, hrúbkou 0,5 μm a objemom 0,6 - 0,7 μm. Vyskytujú sa pohyblivé aj nepohyblivé kmene buď jednotlivito alebo v pároch (viď. Obr. 5).<sup>18</sup> Tým, že patria ku gramnegatívnym baktériám je ich bunková stena tenšia (10 nm) ale zložitejšia na rozdiel od grampozitívnych. Pri gramovom farbení (základné diagnostické farbenie v bakteriológii) sa vytvára medzi farbivom a bunkami komplex vďaka tomu, že majú v bunkovej stene viac lipidov, ktoré sa etanolom alebo acetónom rozpúšťajú.

*E.coli* je najpreskúmanejším mikrobiálnym druhom, slúži ako modelový organizmus pre rôzne štúdie ako napr. biochemické, genetické či fyziologické. Je to spôsobené predovšetkým vďaka ich vysokej tolerancii k vyššej teplote, pričom ich optimálna rastová teplota je 37 °C. Je typickým predstaviteľom črevnej mikroflóry stavovcov, kde sa komenzálne žije.<sup>15</sup> Väčšina kmeňov *Escherichia* je nielen neškodná ale pre svojho hostiteľa tiež prospešná vďaka dodávaniu vitamínu K<sub>2</sub> a ochranou zažívacieho traktu pred patogénnymi baktériami. Rastie dobre na množstve substrátov. Skvasuje cukry za intenzívnej tvorby kyselín a plynu. Tvorí predovšetkým kyselinu mliečnu, octovú, pyrohroznovú a mravčiu. Pretože pri fermentačných mechanizmoch sa vytvára aj plyný vodík, vyžadujú metabolické dráhy malú počiatočnú koncentráciu vodíku a z tohoto dôvodu *E. coli* často žije v zmesi s organizmami, ktoré vodík spotrebúvajú. Sú to napríklad metanogénne alebo sulfát redukujúce baktérie.<sup>18</sup>



Za určitých okolností môže byť tento druh aj nebezpečným patogénom, a vtedy vyvoláva 2 typy ochorení:

- Extraintestinálne (močové cesty, infekcie rán, septické ochorenie, hnisavé procesy)
- Intenstinálne (infekcie intestinálneho traktu sprevádzané hnačkami).<sup>14</sup>



Obr. 5: Štruktúra baktérie *E.coli*.<sup>19</sup>

Výskyt *E.coli* nie je obmedzovaný iba na črevá a zvláda prežívať aj v okolitom prostredí mimo tela. Pretože veľmi dobre rastie *in vitro*, a pretože jej genetika je pomerne jednoduchá, môže byť ľahko manipulovaná a jej genóm ľahko duplikovateľný, je jedným z najlepšie preštudovaných a najčastejšie používaných modelových organizmov, ako pri laboratórnych výskumoch, tak aj pri mikrobiologických biotechnológiách. Priemyselne sa jej činnosťou získava aminokyselina treonín.<sup>18</sup>

## 2.7 Použité analytické metódy

### 2.7.1 UV-VIS spektroskopia

Ultrafialová – viditeľná spektroskopia alebo spektrofotometria je inštrumentálna technika využívaná na chemickú analýzu. Táto metóda je široko využívaná hlavne pre svoju cenovú dostupnosť, flexibilitu a nedeštruktívnosť vzoriek. Študuje interakcie medzi svetlom a pozorovanou hmotou meranou ako absorbanciu alebo priepustnosť svetla prechádzajúceho cez hmotu ako funkciu vlnovej dĺžky.<sup>20</sup> Pohybuje sa od ultrafialovej oblasti na úrovni vákua (180 nm) po viditeľnú oblasť (780 nm) pričom UV spektrum je v rozmedzí od 180 nm do 400 nm, zatiaľ čo viditeľná oblasť sa pohybuje od 400 do 780 nm.<sup>21</sup> Využíva sa na kvantitatívnu aj kvalitatívnu analýzu. Navyše pokrýva širokú škálu štúdiá organických zlúčenín a niektorých anorganických látok.<sup>22</sup>

## Princíp:

Spektrofotometer pracuje na princípe merania intenzity elektromagnetického žiarenia vzhľadom na špecifickú vlnovú dĺžku. Vzorka, ktorá sa analyzuje spektrofotometrom je najčastejšie vo forme roztoku a rozpúšťadlo, ktoré analyt obsahuje musí byť opticky transparentné v určitej oblasti vlnovej dĺžky.<sup>23</sup> Prítomnosť analytu ovplyvní množstvo preneseného žiarenia cez roztok a relatívnu priepustnosť alebo absorbanciu roztoku je možné využiť ako index koncentrácie analytu. Analyzovaná vzorka sa umiestňuje do absorpčnej cely, ktorá je v dráhe žiarenia vybranej vlnovej dĺžky. Množstvo žiarenia, ktoré prechádza vzorkou je porovnávané s referenčnou vzorkou. Tá sa presne zhoduje s meranou vzorkou akurát s tým rozdielom, že neobsahuje žiadny analyt. Referenčné vzorky sú často len vodným roztokom, v prípade že aj rozpúšťadlom analytu je voda. Referencia je umiestnená v dráhe svetelného lúča a meria sa tiež sila žiarenia prechádzajúceho cez referenčný článok. Výsledok sa berie ako sila žiarenia dopadajúca na meranú vzorku. Relatívne množstvo svetla, ktoré cez vzorku prechádza sa použije ako odhad koncentrácie analytu. Žiarenie dopadajúce na absorpčnú celú má výrazne väčšiu intenzitu žiarenia ako žiarenie vychádzajúce zo vzorky. Zníženie žiarenia prechádzajúceho cez roztok je spôsobené dôsledkom zachytenia fotónov absorbujúcimi časticami. Vzťah medzi silou dopadajúceho a prepusteného žiarenia je vyjadrený buď absorbanciou alebo transmitanciou. Transmitancia je pomer prechádzajúceho k dopadajúcemu žiareniu. Výsledná transmitancia však nie je priamo úmerná koncentrácii analytu v roztoku vzorky. Na to slúži absorbanca, ktorej hodnota je záporným logaritmom transmitancie.<sup>24</sup> Priamu úmeru medzi absorbanciou a koncentráciou vzorky preukazuje aj Lambert-Beerov zákon (viď Obr. 6).

$$A = \varepsilon L c = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right) = \log_{10} \left( \frac{1}{T} \right) = -\log_{10}(T)$$

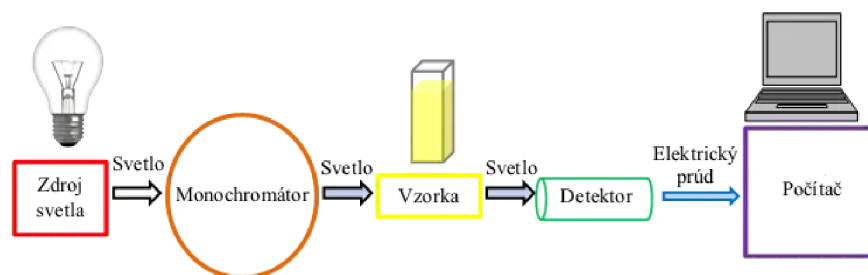
Obr. 6: Formulácia Lambert-Beerovho zákona.<sup>25</sup>

Kde A je absorbanca,  $\varepsilon$  je molárny absorpčný koeficient, c je koncentrácia vzorky, l je dĺžka dráhy vzorky,  $I_0$  je prechádzajúce žiarenie, I je žiarenie dopadajúce a T je transmitancia.<sup>26</sup>

Použitie zákona je však obmedzené podmienkami, za ktorých platí a tie sú: použitý svetelný zdroj musí byť monochromatický, analyzovaný roztok musí byť zriedený, so zvyšujúcim sa zriedením dochádza k disociácii slabých kyselín a tým dosiahnu rovnováhu so svojou konjugovanou zásadou, tiež však nemôžu mať rovnakú absorbanciu a preto zákon nie je použiteľný pre roztoky slabých kyselín.<sup>21</sup>

## Komponenty UV-VIS spektrometra

Základný spektrofotometer sa skladá z viacerých komponentov (viď Obr. 7) : zdroj svetla, monochromátor, držiak vzorky/referenčnej vzorky, detektor žiarenia a počítač.



Obr. 7: Zjednodušená schéma hlavných komponentov v UV-VIS spektrofotometri.<sup>26</sup>

### Svetelný zdroj

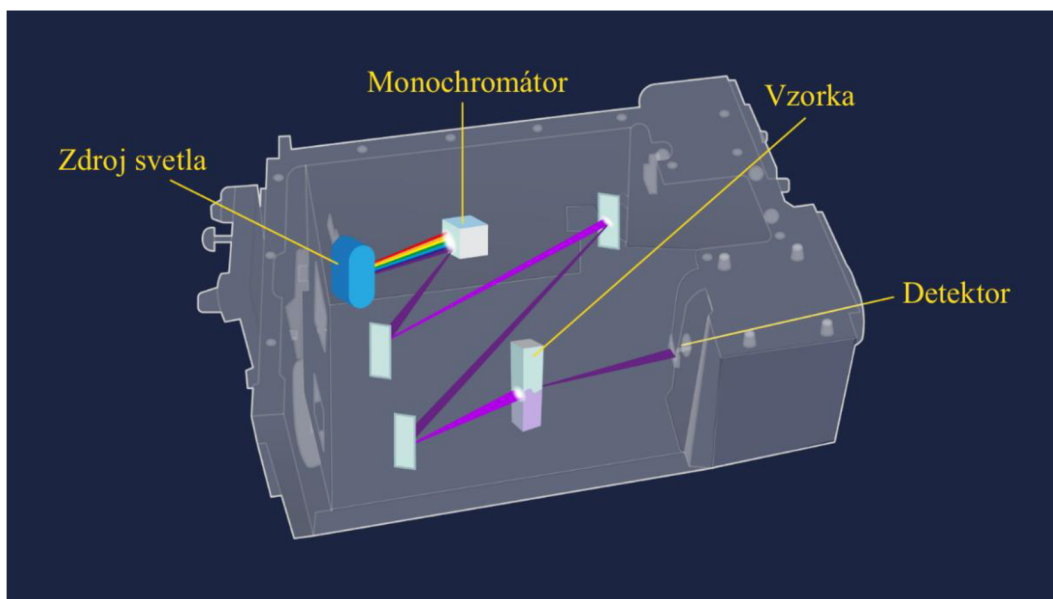
Je potrebné aby bol zdroj schopný generovať svetlo v širokom spektre vlnových dĺžok a je polychromatického charakteru. V UV-VIS sa používajú dva typy svetelných zdrojov. Na vytváranie UV žiarenia sa využívajú deutériové, vodíkové, volfrámové, ortuťové a xenónové výbojky. Zatiaľ čo, na zdroje VIS sa využívajú volfrámové, ortuťové a uhlíkové výbojky.<sup>25</sup> V praxi sa pre UV oblasť používajú najčastejšie deutériové elektrické výbojky a pre VIS oblasť volfrámová žiarovka.<sup>26</sup>

### Monochromátor

Je zariadením, ktoré sa používa na výber úzkeho pásma vlnovej dĺžky svetla. Prijíma polychromatické žiarenie zo zdroja žiarenia a vystupuje z neho monochromatické svetlo.<sup>21</sup> Na to aby bolo možné vytvoriť monochromatické svetlo musí sa skladať z viacerých komponent a tými sú vstupná štrbina, kolimačná šošovka, dispergačné zariadenie (hranol/ mriežka), zaoštrovací šošovka a výstupná štrbina.<sup>27</sup> Vstupná štrbina definuje prichádzajúci lúč svetla a prenáša ho kolimovaný na rozptylový prvok. Dispergačné zariadenie je najčastejšie v podobe hranola alebo difrakčnej mriežky. Rozptyľuje polychromatické svetlo (biele) prichádzajúce zo vstupnej štrbiny do jednotlivých vlnových dĺžok. Hranol alebo mriežka sú zvyčajne vyrobené z kremeňa, taveného oxidu kremičitého alebo skla. Výstupná štrbina zaisťuje aby sa získavalo žiarenie požadovanej vlnovej dĺžky.<sup>23</sup> Pri výbere vlnovej dĺžky merania je najlepšie si vybrať tú, pri ktorej analyt vykazuje maximum absorpcie a kde absorpcia rýchlo nekolíše so zmenami vo vlnovej dĺžke.<sup>24</sup>

### Držiak na kyvety a kyvety

Zaisťuje vhodné umiestnenie kyvety na meranie. Materiál z ktorého sa skladá kyveta na meranie vzorky by mala byť z materiálu, ktorý neabsorbuje žiarenie v používanej spektrálnej oblasti. Na meranie v UV oblasti sa využívajú kyvety z kremeňa alebo z taveného oxidu kremičitého. Kyvety pre meranie vo VIS oblasti sú vhodné použiť zo silikátového skla alebo lacnejšie z plastu.<sup>23</sup> Plastové kyvety sa nepoužívajú pri organických rozpúšťadlách. Rozmery kyvety sú podstatné pre dodržanie podmienok Lambert-Beerovho zákona a na množstvo roztoku, ktorý je potrebné použiť.<sup>21</sup>



Obr. 8: Schéma UV-VIS spektroskopického systému na báze kvety.<sup>25</sup>

### Detektor

Prevádza svetelný signál na signál elektrický. Vytvára odozvu v širokom rozsahu, vysokej citlivosti a nízkeho šumu. Najčastejšie sú fotonásobič a fotodiódový detektor.<sup>27</sup> Fotodiódy sú polovodičové zariadenia, ktoré premieňajú svetlo na elektrický prúd za rýchly časový úsek s vysokou spoľahlivosťou a nízkymi nákladmi.<sup>26</sup> Lineárne fotodiódové pole sa skladá z viacerých malých kremíkových fotodiód vytvorených na kremíkový čip. Tento typ detektora umožňuje súčasne merať viacero vlnových dĺžok, čo umožňuje rýchle vytvorenie celého absorpčného spektra.<sup>27</sup> Zatiaľ čo fotonásobič sa skladá z vákuovo utesnených trubíc, ktoré využívajú viacero diód na zosilnenie elektrického prúdu generovaného absorpciou svetla. Sú vysoko citlivé a vedia rozpoznať aj nízku úroveň osvetlenia.<sup>26</sup> Obsahuje fotoemisnú katódu, početné dynódy (vysielajú viac elektrónov v reakcii na každý elektrón, ktorý ich zasiahne) a anódu. Fotón naráža na katódu, čo spôsobuje emisiu elektrónov, ktoré sa znásobujú a zrýchľujú po dopade na dynódy. Uvoľnené elektróny sa zhromažďujú na anódach. Výsledkom tohto procesu je vytvorenie merateľného prúdu.<sup>23</sup>

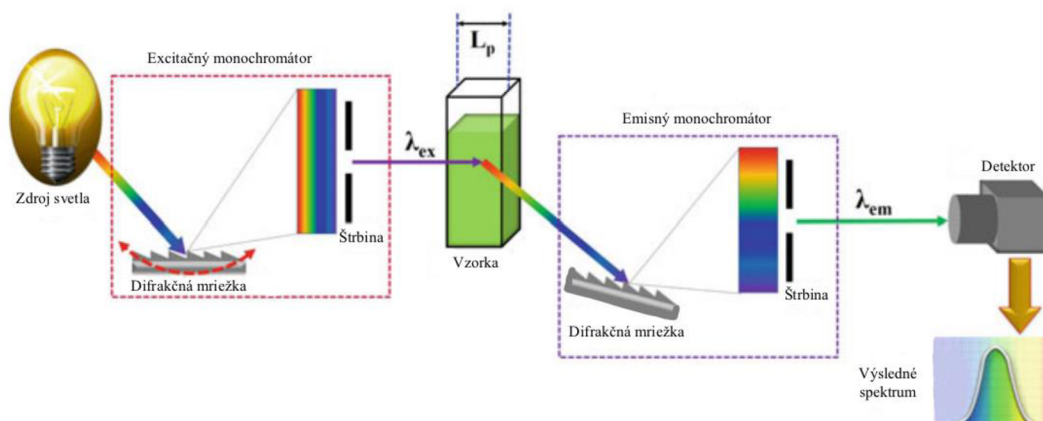
### Nevýhody a obmedzenia UV-VIS:

- Potencionálne zdroje chýb: nevhodné techniky prípravy vzoriek, nevhodné ovládanie, merací šum, chyby spojené s nevhodnými podmienkami na meranie absorbancie. Z toho konkrétne vyplývajú:
- Rozptýlené svetlo: časti prístroja na výber iba jednej vlnovej dĺžky sú nedokonalé a to môže spôsobiť prenos svetla aj zo širokého rozsahu vlnových dĺžok
- Rozptyl svetla: K chybám merania môže viesť rozptyl svetla spôsobený suspendovanými časticami v analyte alebo obsahom bublín

- Rušenie z viacerých absorbujúcich zložiek: napríklad pri meraní farbiva chlorofyl, ktoré má viacero druhov v jednej vzorke
- Geometrické hľadiská: nevhodné nastavenie prístroja
- Interferencia: ovplyvnený výsledok merania vďaka fluorescencii alebo rozptýlenému svetlu
- Obmedzenia na špecifické funkčné skupiny.<sup>25,26</sup>

## 2.7.2 Fluorescenčná spektroskopia

Vo všeobecnosti je táto metóda rádovo 1 až 3-krát citlivejšia ako absorpčná spektroskopia. Táto metóda meria signál v podobe elektromagnetického žiarenia, ktoré je emitované z analytu pri návrate z excitovaného stavu do stavu základného. Analyt je totiž najprv aktivovaný na vyššiu energetickú hladinu absorpciou žiarenia v UV-VIS rozsahu. Tieto procesy prebiehajú už počas fluorescenčného merania. Pre každý systém existuje optimálna vlnová dĺžka žiarenia pre excitovanú vzorku a ďalšia, dlhšia vlnová dĺžka na meranie fluorescenčnej emisie. Prístrojové vybavenie je vo fluorescenčnej spektroskopii vo všeobecnosti totožné ako pri UV-VIS spektroskopii až na usporiadanie optických systémov. Fluorimetre potrebujú dva selektory, konkrétne na excitačnú a emisnú vlnovú dĺžku.<sup>24</sup>



Obr. 9: Schéma fluorescenčného spektroskopu.<sup>28</sup>

### 3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Resazurínové testy sú vo veľkej miere využívané na stanovovanie toxicity alebo účinkov dezinfekčných či antimikrobiálnych povrchov. Fai a spol. využili túto metódu už v roku 2009 na stanovenie toxicity fungicídov na významné kmene húb. Metóda inhibície fluorescencie rezorufínu na mikrodoštičkách bola porovnávaná s 24 -hodinovým biologickým testom inhibície rastu kvasiniek s použitím viacerých druhov fungicídov s rôznymi spôsobmi účinku. V konečnom dôsledku sa výsledky resazurínového testu s dostatočnou citlivosťou získali do 2 hodín s dobou inkubácie 30 min. Táto metóda bola dokonca porovnateľná s výsledkami získanými štandardnými metódami NCCLS.<sup>8</sup>

Farbivo sa výzkumnou skupinou Mariscal a spol. použilo na meranie prítomnosti aktívnych biofilmových baktérií po pridaní dezinfekčného prostriedku vo vzťahu k štandardnej krivke vytvorenej z inokula v suspenzii toho istého organizmu. Študovali sa štyri produkty používané ako dezinfekčné prostriedky a rast biofilmu piatich druhov baktérií na nosičoch vyrobených z materiálov bežne sa vyskytujúcich v klinických zariadeniach. Metóda bola porovnávaná s používanými metódami kvantifikácie mikroorganizmov ako je sonifikácia a farbenie kryštálovou violetou. Vďaka bunkovej hustote nosičového biofilmu sa resazurínový test ukázal ako dostatočný na meranie zníženia 5 - log CFU, čo je dostatočné na to, aby bol biocíd považovaný za účinný a test dobre opakovateľný na viacero typov nosičov.<sup>9</sup>

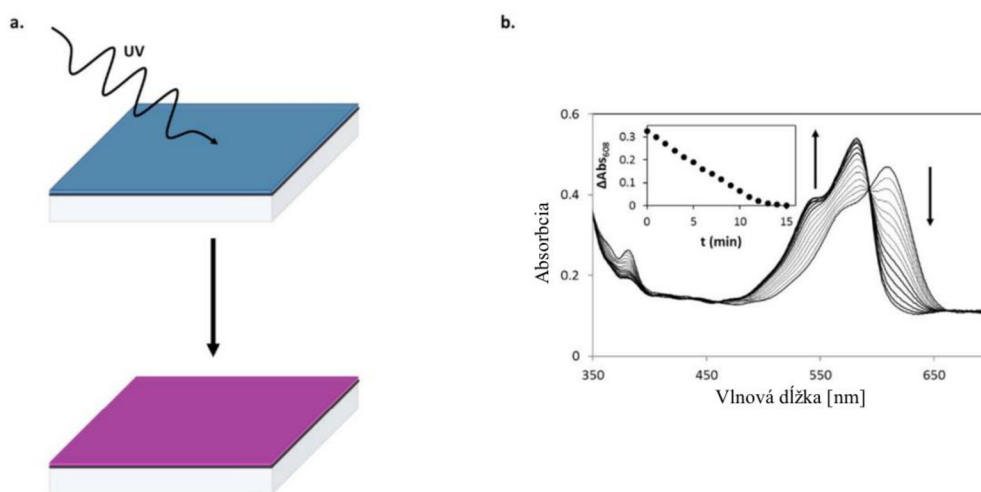
Vzhľadom na časovú dĺžku meraní kvantifikácie bakteriálnych koncentrácií bežnými metódami bola resazurínová metóda už v roku 2012 preskúmaná. Kolorimetrický test založený na resazuríne bol vyvinutý ako časovo kinetický test vhodný na meranie koncentrácie baktérií. Optimalizácia sa uskutočnila nájdením excitačných a emisných vlnových dĺžok pre fluorescenčné meranie. Keďže jednobodové merania fluorescencie je ťažké dosiahnuť na bakteriálnych vzorkách, použil sa časovo kinetický prístup. Vďaka tejto metóde bola spodná hranica dynamického rozsahu testu znížená z  $10^5$  na  $10^4$  a horná hranica bola zvýšená o jeden rád. Presnosť testu sa zvyšuje s nameranou koncentráciou baktérií a keď sa koncentrácie baktérií priblížia k  $10^4$  CFU/ml, 90 % interval spoľahlivosti je blízko jedného rádu. Táto metóda sa môže použiť ako prvá indikácia, ak sú baktérie prítomné v kvapalnom médiu. Ak je však počet nižší ako  $10^4$  a ak sa vyžaduje presné meranie, stále sa naďalej uprednostňuje metodika počítania jednotky tvoriacej kolónie.<sup>6</sup>

Skupina Hudman a spol. využila resazurínovú metódu na skrining veľkého počtu bakteriálnych kmeňov vzhľadom na ich citlivosť na UV a röntgenové žiarenie. Vyvinutý test na báze resazurínu s použitím 96-jamkových mikrotitračných doštičiek, mal za úlohu rýchlo a ekonomicky oddeliť kmene s rôznou citlivosťou na žiarenie, napr. mapovacie alebo transformačné štúdie zahŕňajúce stovky



kmeňov alebo štúdie, v ktorých by sa testoval veľký počet látok a ich koncentrácií na ich vplyv na prežitie po žiarení. Metóda poskytla výsledky, ktoré sa dobre porovnávajú so štandardnými, drahšími a časovo náročnými klonogénnymi testami.<sup>29</sup>

V neustále sa rozširujúcej oblasti fotokatalýzy je nevyhnutné vedieť posúdiť a porovnať aktivity nových a existujúcich komerčných a výskumných fotokatalytických materiálov. O možnom použití resazurínovej technológie na hodnotenie fotokatalytických filmov jednoduchým, rýchlym a nenákladným spôsobom v laboratóriu aj in situ sa zaujímala výskumná skupina Mills a spol. Výsledok výskumu demonštruje lineárnu koreláciu (aspoň pre filmy TiO<sub>2</sub> na skle) medzi pomalou (zvyčajne hodinami) fotokatalyzovanou oxidáciou organických materiálov, ako je metylénová modrá, a rýchla (typicky min) fotokatalyzovaná ireverzibilná redukcia farbiva, ako je resazurin.<sup>30</sup>



Obr. 10: (a.) Schematické znázornenie systému ožarovania resazurinu, v ktorom sa vzorka pokrytá resazurinom po ožiarení UV žiarením zmení z modrej na ružovú a (b.) typický súbor spektrálnych zmien UV/Vis, ktoré vznikli pri teste resazurinu, s vloženým diagramom zobrazujúcim profil rozpadu pri 608 nm.<sup>30</sup>

Väčšina z testov na mieru fotokatalytickej aktivity povrchov je veľmi časovo náročná, tj zvyčajne 3 – 5 hodín. Výsledkom je, že tieto testy sú do značnej miery obmedzené na použitie iba v laboratóriu nie sú lacné na nastavenie a spustenie (UV-VIS spektrometra a analyzátory plynov). Výskumníci Mills a spol. opäť modifikovali resazurínovú metódu pričom fotogenerované elektróny redukujú modro sfarbené farbivo resazurin na ružovo sfarbený rezorufin. Z toho vyplýva, že ak je testovaný materiál fotokatalyticky aktívny, potom UV žiarením nastane zmena farby atramentu z modrej na ružovú rýchlosťou, ktorá súvisí s aktivitou testovaného fotokatalytického filmu a tým metóda poskytuje kvalitatívny aj kvantitatívny test celkovej fotokatalytickej aktivity.<sup>31</sup>

V roku 2016 výskumná skupina Lian a kolektív skúmali využitie resazurínu ako redoxného mediátora na zvýšenie redukcie chloristanu a výroby elektriny v MFC (mikrobiálny palivový článok). MFC sa bežne považujú za účinnú možnosť biologického čistenia pre degradáciu znečisťujúcich látok využívajúcu zmiešanú kultúru mikroorganizmov a následnú výrobu elektriny. Výkony MFC boli hodnotené z hľadiska rýchlosti redukcie chloristanu a výstupného napätia. Mechanizmus prenosu elektrónov resazurínu bol hodnotený pridaním ôsmich respiračných inhibítorov. Mikrobiálne spoločenstvá s a bez prídania resazurínu boli hodnotené prostredníctvom analýzy metabolických génov. Výsledkom výskumu bola predikcia, že resazurín by mohol uľahčiť prenos elektrónov z bakteriálnych buniek do chloristanu a anódy, čo súčasne vedie k zrýchlenej redukcii chloristanu a vysokému výstupnému napätiu. Zároveň prídanie resazurínu stimulovalo rast určitých dominantných druhov mikroorganizmov.<sup>32</sup>

Resazurínové farbivo sa vo výskume Uzarski a spol. využívalo ako indikátor celularity v 3D ECM (medzibunková hmota) scaffoldoch. Farbivo bolo vybrané na presné meranie počtu životaschopných buniek bez narušenia komplexu skúmaného tkaniva. Dôležitým faktorom je, že metóda poskytuje netoxické a lacné spôsoby získavania údajov na porovnanie metód očkovania scaffoldov alebo na meranie účinnosti recelularizácie skeletu alebo zistenie účinkov cytotoxických liekov na bunky na použítom skelete. Zistilo sa, že zatiaľ čo test redukcie resazurínu poskytuje výkonné, neinvazívne odčítanie metrik spočítavajúcich celularitu a rast v rámci ECM skeletov, podmienky testu môžu silne ovplyvniť jeho použiteľnosť na presnú kvantifikáciu počtu buniek. Aby sa dosiahol presný odhad počtu buniek je potrebné aby bola prítomná dostatočná koncentrácia substrátu, resazurínu, počas celého trvania testu, aby rýchlosť, ktorou sa resazurín redukuje na rezorufin, zostala konštantná.<sup>33</sup>

Vzhľadom na to, že resazurín je jednou z najviac uvádzaných látok používaných v štúdiách bunkovej životaschopnosti a cytotoxicity pre biologické a environmentálne systémy bol v roku 2019 predmetom štúdia vedeckej skupiny Ibáñez a spol. Ramanove a fluorescenčné spektroelektrochemické techniky boli použité na in-situ štúdium reakčného mechanizmu systému resazurín/rezorufin/dihydrorezorufin. Charakteristické Ramanove a fluorescenčné pásy spojené s každou molekulou, ako aj ich vývoj s potenciálom umožnili získať informácie o vzájomnej konverzii medzi resazurínom, rezorufínom a dihydrorezorufínom. Ramanove spektrá simultánne zaznamenané cyklickou voltametriou v rezorufinovom roztoku preukázali, že intenzita rezorufinových pásov klesá súčasne so zvyšovaním intenzity dihydrorezorufinových pásov. Okrem toho, ak počiatočný roztok obsahuje iba resazurín, jeho Ramanove pásy počas prvého redukčného procesu úplne nezmiznú, pretože resazurín nie je úplne transformovaný v rezorufin a oba druhy sú spektroelektrochemicky detegované. Okrem toho vysoká koncentrácia rezorufínu môže prekryvať fluorescenčný signál resazurínu.<sup>34</sup>



Na posúdenie toxicity mikroorganizmov v krátkom časovom rámci, napríklad pri čistení odpadových vôd, je k dispozícii len málo metód. A preto Ortiz a spol. vyvinuli na rýchle vyhodnotenie neznámych vodných výtokov mikrofluidné zariadenie vylepšené na detekciu a kvantifikáciu hrubej toxicity v reálnom čase. Na to bol využitý aj test na báze resazurínu vylepšený z tradičných laboratórnych postupov na zníženie objemu vzorky a času odozvy, s výhodami krátkeho vystavenia toxickým látkam (< 30 s), baktérií s vysokou hustotou ( $10^7$  buniek/ml) a nepretržitého miešania v kyslíku. Mikrofluidná verzia testu resazurínu je automatizovaná a pracuje v kontinuálnom režime, čo z nej robí potenciálnu alternatívu ku geneticky upraveným bioreportérom na monitorovanie toxicity vody.<sup>35</sup>

Resazurínový mikrodoštičkový test bol navrhnutý a optimalizovaný na hodnotenie antimikrobiálnych vlastností elektrovlákňovaných nanovlákných filtračných membrán pre technológie úpravy vody. Resazurín bol opäť použitý ako indikátor množstva životaschopných experimentálnych mikroorganizmov a prírodných baktérií z čističky odpadových vôd. Bakteriálne inokulum s koncentráciou  $1 - 3 \times 10^5$  CFU/ml sa v priebehu výskumu pipetovalo na povrch hodnotených funkcionalizovaných aj príslušných kontrolných membrán a inkubovalo sa v 12-jamkových platniach počas 4 hodín pri 37 °C. Kinetika metabolizácie resazurínu, tj jeho redukcia na fluorescentný rezorúín, bola hodnotená fluorimetricky. Množstvo životaschopných baktérií na membránach vyjadrených ako CFU/ml sa vypočítalo z kinetických kriviek pomocou kalibračných kriviek, ktoré boli skonštruované pre oba experimentálne bakteriálne druhy. Antimikrobiálne aktivity membrán boli hodnotené buď resazurínovým testom alebo modifikovaným testom počtu platní podľa ISO 20743. Výsledky oboch testov ukázali významnú antimikrobiálnu aktivitu membrán funkcionalizovaných nanočasticami striebra pre bakteriálne druhy aj pre baktérie z čističky odpadových vôd, zatiaľ čo membrány obsahujúce špecifické kvartérne amóniové soli boli neúčinné.<sup>7</sup>

## 4 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce je dohľadať a preštudovať relevantné zdroje týkajúce sa testov viability za použitia farbiacich metód. Konkrétne v oblasti kvantifikácie mikrobiálnych populácií, kde sa doteraz využívajú predovšetkým zdĺhavé metódy, ktoré z časových dôvodov nie sú dostatočné pre dnešné potreby ich využitia. Na kolorimetrické testy sa využíva farbivo resazurín, ktoré je do určitej miery netoxické oxidačno-redukčné farbivo vo veľkej miere využívané práve na kvantifikáciu mikrobiálnych populácií. Je obľúbenou metódou hlavne z dôvodu, že vzorky nie je potrebné špeciálne predupravovať pred samotným stanovením a výsledky je možné získať v relatívne krátkom čase. Vďaka tomu má veľký potenciál pre široké využitie a nízke finančné náklady na prevedenie.

V tejto práci sa konkrétne zaoberám vyhodnotením fluorescencie resazurínu pomocou fotografického záznamu a následnej obrazovej analýze. Táto metóda je vhodná na štúdium kinetiky konverzie resazurínu v závislosti na koncentrácii mikroorganizmov. Ale v rámci potrieb tejto práce a čo najlepším možným výsledkom porovnateľným so štandardnými metódami kvantifikácie mikrobiálnych populácií je nutné sa pokúsiť túto metódu dostatočne optimalizovať.

Materiál použitý na imerzné experimenty (fólia s aktívnou vrstvou) bol na základe poznatkov získaných o tejto metóde a jej spôsobe vyhodnotenia využitý na určovanie antimikrobiálnej aktivity v závislosti na koncentrácii účinnej látky obsiahnutej v jednotlivých vzorkách. Tieto výsledky sa následne porovnajú s výsledkami nadobudnutými za použitia štandardných metód a kriticky sa zhodnotí relevancia študovaného postupu v porovnaní s normovanými metódami.

## 5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 5.1 Použité prístroje a chemikálie

<b>Prístroj</b>	<b>Model</b>
Inkubátor	IP 100-U
Autokláv	Tuttnauer 2540M
Váhy analytické	PA224C
Sterilizátor	STERILAB BMT
Teplotná skriňa	Venticell 222
Centrifúga	Hettich EBA 30
Spektrofotometer	Helios Alpha 9423 UVA 1002E
Magnetická miešačka s ohrevom	MS-H-S10, DLAB
Inkubátor s orbitálnym šejkrom	ES-20, Biosan
Trepačka	MS 3 basic, IKA
Platereader	SpectraMax i3x, Molecular devices

<b>Chemikálie</b>	<b>Výrobca</b>
Resazurin	Sigma Aldrich
Chlorid sodný p.a.	Penta
Chlorid draselný p.a.	Lach-Ner
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	Penta
Hydrogenfosforečnan disodný (dihydrát) p.a.	Penta
Živné médium s 1% peptónom	Himedia

\*použité mikroorganizmy *Escherichia coli* sa získali z Českej zbierky mikroorganizmov (ccm 3988)

## 5.2 Príprava a prevedenie experimentov

### 5.2.1 Príprava živného média

Navážilo sa živné médium s 1 % peptónom. Hmotnosť 25 g sa suspenzovala v objeme 1000 ml destilovanej vody. Suspenzia sa zahrievala do úplného rozpustenia živného média. To sa rozdelilo do Erlenmeyerových baniek s objemom 50 ml a tie sa po uzatvorení sterilizovali. Autokláv bol nastavený na 120 °C na 15 minútový proces.

### 5.2.2 Príprava roztoku PBS

Do odmernej banky s objemom 1000 ml sa pridala destilovaná voda v objeme 800 ml. Na analytických váhach sa navážili chemikálie, ktoré sa postupne pridávali do destilovanej vody v odmernej banke. Prídavky chemikálií sú:

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0,245 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Následne sa objem v odmernej banke doplnil po rysku destilovanou vodou. Po rozpustení všetkých komponentov sa roztok rozdelil do piatich uzatvárateľných fľaštičiek s objemom 200 ml a takto pripravené roztoky sa následne sterilizovali v autokláve pri 120 °C po dobu dvoch hodín.

### 5.2.3 Príprava roztoku resazurínu

Na analytických váhach sa navážil resazurín, ktorý bol pridaný do 100 ml destilovanej vody. Navážka resazurínového farbiva musela byť taká, aby po rozpustení v destilovanej vode mal výsledný roztok po nariadení 10-krát pri 600 nm absorbančiu približne 1,5.

### 5.2.4 Kalibrácia resazurínovej metódy

Pre stanovovanie antimikrobiálnych vlastností povrchov je nutné určiť rovnicu kalibračnej krivky, ktorá je potrebná na výpočet množstva buniek, ktoré prežili v čase resazurínovou metódou. Spočiatku sa naočkovalo 50 ml živného média bakteriálnou kultúrou *Escherichie coli* a po dobu 24 h prebiehala kultivácia pri teplote 37 °C. Po dosiahnutí časového intervalu kultivácie sa vzorka rozdelila a odstredila. Oddelené zhluky buniek boli doplnené roztokom PBS tak, aby absorbančia pri vlnovej dĺžke 600 nm bola 0,6 (koncentrácia buniek je  $4,8 \cdot 10^8$  CFU/ml). Takto pripravená suspenzia bola nariadená dvojkovým riedením až do koncentrácie 1/1024 (čo odpovedá koncentrácii buniek  $4,7 \cdot 10^5$  CFU/ml). Jednotlivé koncentrácie roztokov boli prevedené do vialiek v objeme 1600 µl, kde sa k nim pridávalo 200 µl koncentrovaného živného média a 200 µl resazurínu. Vialky sa po uzavretí umiestnili na vyhrievaciu dosku do držiaka, ktorý obsahoval fluorescenčné LED diódy (viď Obr. 11).

Meraním fotografického záznamu v určenom intervale sa pomocou programu ImageJ vygeneroval záznam priebehu zmeny sfarbenia resazurínu. Z tohoto výsledku sa vyhodnotil čas dosiahnutia maxima fluorescenčného signálu pri rozličných koncentráciách bakteriálnych suspenzií.



Obr. 11: Aparatúra na fotografický záznam experimentu.

### 5.2.5 Priebeh imerzného experimentu

Spočiatku sa naočkovała bakteriálna kultúra *E. coli* do živného média s 1 % peptónom v objeme 50 ml, ktoré malo teplotu 37 °C. Táto mikrobiálna suspenzia sa inkubovala po dobu 24 h v termostate pri teplote 37 °C. Po tomto časovom úseku sa suspenzia prerozdělila do 6 uzatvárateľných plastových skúmaviek a nechala sa odstrediť na 3000 otáčkach po dobu 10 minút v centrifúge. Vzniknuté prebytočné médium sa uchovávalo v zbernej nádobe na odpad, zatiaľ čo kultúra sa ďalej riedila v kadičke. Riedenie prebiehalo do roztoku PBS. Tento tlmivý roztok bol použitý namiesto živného média z dôvodu zabránenia ďalšieho nekontrolovateľného množenia buniek, ktoré by v prostredí živného média nastávalo. Počas riedenia sa zároveň spektrometrom merala absorbančia suspenzie na blank, ktorým je roztok PBS. Suspenzia je považovaná za správne nariadenú ak je v 1 cm kvete nameraná absorbančia 0,60 pri 600 nm, čo odpovedá koncentrácii bakteriálnych buniek  $4,8 \cdot 10^8$  CFU/ml. Následne sa takto nariadená suspenzia ďalej riedila na koncentráciu 1/100 alebo 1/1000 podľa potrieb experimentu.

Vhodne nariadená suspenzia bola ďalej využívaná v ponornom experimente pre modelový antibakteriálny materiál. V tomto prípade to boli samolepivé fólie s náterom obsahujúcim pyrition zinku v odlišných percentuálnych zastúpeniach. Boli využité fólie s náterom obsahujúcim 200, 50 a 0 mg pyritionu zinku. Tvar fólií bol upravený laserovou rezačkou aby sa dal vhodne umiestniť

na dno malej plastovej Petriho misky s priemerom 5 cm. Po nalepení fólií na dno Petriho misiek bol napipetovaný objem 6 ml suspenzie na aktívnu stranu fólie, pridané malé magnetické miešadlo a miska bola vrchnákom uzavretá aby sa zabránilo vyparovaniu suspenzie alebo kontaminácie z okolia. Časť misiek bola umiestnená na magnetickú miešačku s ohrevom pod LED lampy (nastavených na žiarenie 900 LUX) (viď Obr. 12) a časť sa umiestnila do zatemneného inkubátora s orbitálnym miešaním.

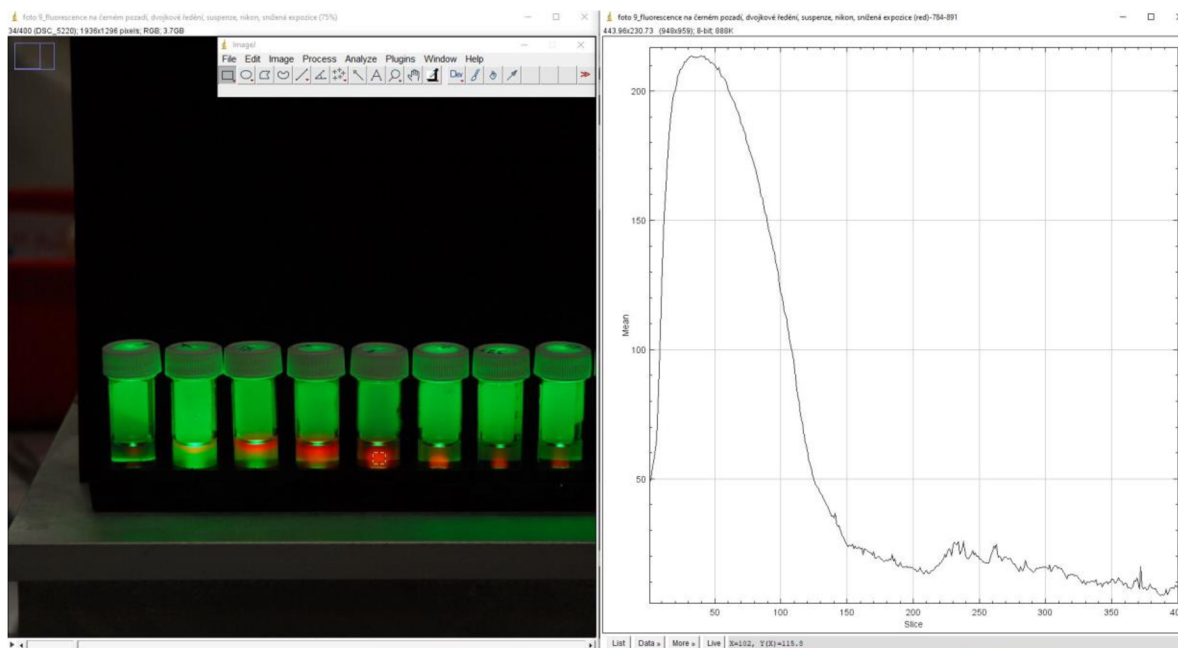


*Obr. 12: Vzorky na magnetickej miešačke s ohrevom pod zdrojom svetla.*

Na suspenzie pôsobila vybraná fólia určitý časový interval vždy pri teplote 37°C a za stáleho miešania. Súčasne s týmito vzorkami sa rovnakým podmienkam vystavili kontrolné vzorky s čistou samolepiacou fóliou bez antimikrobiálnej vrstvy.

Po uplynutí času pôsobenia sa do vialiek napipetovalo 1600  $\mu$ l suspenzie z Petriho misiek, 200  $\mu$ l živného média a 200  $\mu$ l roztoku resazurínu. Vialky boli umiestnené do formy, kde ich podsvecovali diódy s nastavením svietenia: 2,54 V, 0,122 A a 0,30 W aby bolo detekovateľné fluorescenčné žiarenie. Na overenie skutočnej koncentrácie buniek v nariedenej suspenzii, s ktorou sa pracovalo bolo meranie realizované ihneď po nariadení bez pôsobenia fólií.

Pre všetky vzorky vo vialkách boli merané časy dosiahnutia maxima jednotlivých suspenzií na výhrevnej doske s časovým intervalom fotenia podľa koncentrácie počiatočnej suspenzie na určitý počet odfotených fotiek. Po dokončení fotenia sa jednotlivé zábery nahrali do programu ImageJ, kde sa vytvoril záznam celého priebehu odfarbenia resazurínu, z ktorého sa vyhodnotil čas dosiahnutia fluorescenčného maxima (viď Obr. 13).

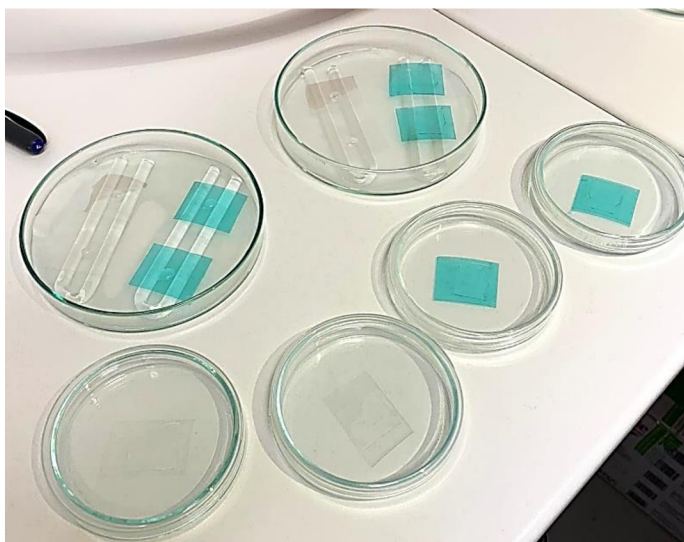


Obr. 13: Ukážka vyhodnotenia imerzného experimentu v programe ImageJ.

### 5.2.6 Test antimikrobiálnych vlastností podľa ISO 27447:2019

Sterilné živné médium v objeme 50 ml bolo naočkované jedným želatínovým diskom kultúry *E.coli* a bolo umiestnené na 24 hodín do termostatu vyhriateho na 37 °C. O deň na to, bola zmeraná absorbancia kultúry pri 600 nm v centimetrovej kyvete a následne bola nariadená živným médiom 1/500 na absorbanciu približne 0,5. To odpovedá koncentrácii buniek  $2 \cdot 10^8$  CFU/ml. Pred nanosením bakteriálnej suspenzie boli všetky vzorky ožiarené na 15 minút pri intenzite  $0,5 \text{ W/cm}^2$ . Počas ich sterilizácie sa pripravili Petriho misky, do ktorých sa vložili tri vrstvy filtračného papiera, ktoré sa zaliali 5 ml sterilnej vody. Na takýto podklad sa umiestnili zahnuté sklenené tyčinky. Na ne sa neskôr ukladali vzorky čistých aj antimikrobiálnych fólií, na ktoré sa napipetovalo 24  $\mu\text{l}$  suspenzie. Tá bola prekrytá krycím sklíčkom 20 x 20 mm aby sa zabránilo kontaminácii a odliatiu suspenzie zo vzorky. 2 vzorky s aktívnou vrstvou a 2 vzorky s čistou fóliou boli exponované po dobu 4 hodín pod UV-A lampou pri intenzite žiarenia  $0,5 \text{ mW/cm}^2$ . Rovnaké zastúpenie vzoriek bolo v uzavretých Petriho miskách umiestnené do tmy. Recovery test pozostával z dvoch vzoriek každej fólie v samostatných Petriho miskách, na ktoré sa nanieslo 24  $\mu\text{l}$  suspenzie a boli prikryté krycím sklíčkom (viď Obr. 14). Následne boli vzorky okamžite ponorené do 15 ml fyziologického roztoku aby bola bakteriálna suspenzia opláchnutá. To spôsobilo hlavne trepanie na trepačke po dobu dvoch minút. Následne sa vzniknutá bakteriálna suspenzia 2-krát riedila desiatkovým riedením na 1/100. Zo zriedených suspenzií sa odpipetovalo 2-krát 0,5 ml do troch prázdnych a sterilných Petriho misiek. Kvapky boli zaliate živným médiom a premiešané. Po stuhnutí nasledovala ďalšia vrstva prelivu.





Obr. 14: Petriho misky s pripravenými vzorkami na experiment a recovery testy.

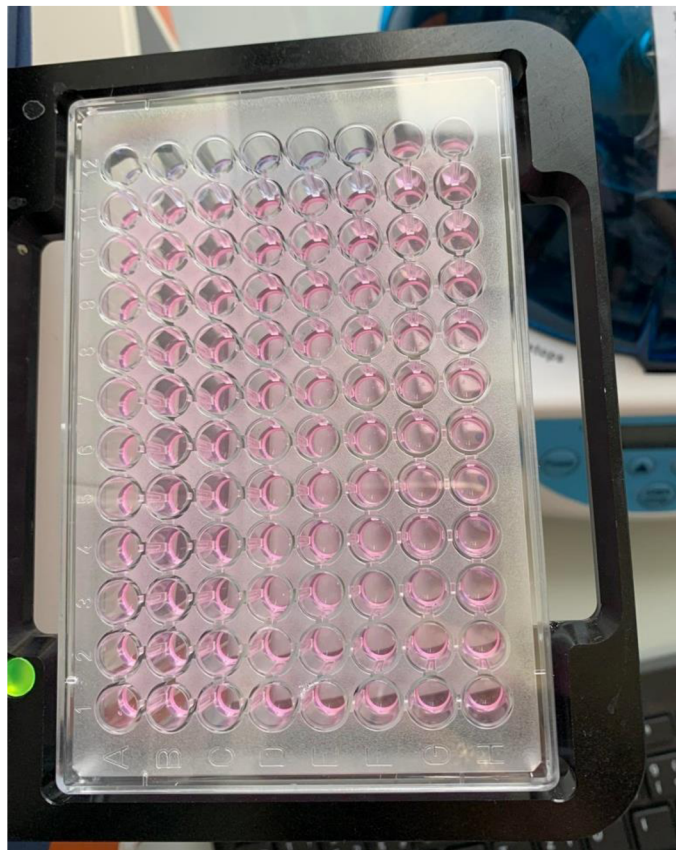
Po skončení ožarovania bola každá vzorka fólie vložená do prázdnej sterilnej nádoby a zaliata 15 ml fyziologického roztoku. Tak ako pri recovery testoch aj tieto nádoby sa miešali približne 2 minúty na premiešanie suspenzie s fyziologickým roztokom. Vzniknuté suspenzie z týchto vzoriek boli zriedené 10-krát. Z nariadených vzoriek bolo odpipetovaných po 2 x 0,5 ml do 3 sterilných Petriho misiek a následne sa kvapky zaliati živným médiom. Po premiešaní a stuhnutí nasledoval ďalší preliv rovnakým druhom média. Vzorky analyzované v tme sa spracovávali rovnakým spôsobom. Misky so stuhnutým živným médiom boli umiestnené do termostatu, nastaveného na 37 °C. Po 48 hodinách bolo možné spočítať počet kolónií a tak ďalej vypočítavať mieru účinku modelovej vzorky. Maximálny počet kolónií na jednu miskú u všetkých vzoriek však nemohol byť väčší ako 300 a menší ako 30.

### 5.2.7 Resazurínová metóda pomocou mikrodilučného stanovenia

24 hodinová kultúra *E.coli* bola riedená roztokom PBS tak, aby konečná suspenzia mala pri 600 nm absorbanciu 0,6 ( $4,8 \cdot 10^8$  CFU/ml). Takto vzniknutá vzorka sa vo flowboxe ďalej riedila na požadovanú koncentráciu 1/100 až 1/1000 do dvoch 50 ml uzatvárateľných skúmaviek. Bolo využitých 12 Petriho misiek s priemerom 5 cm na nalepenie modelových fólií s aktívnou vrstvou (6 ks) aj bez nej (6 ks), na ktoré bolo napipetovaných 6 ml nariadenej suspenzie. Takto pripravené vzorky boli rozdelené na polovicu z každej varianty použitej fólie. Jedna polovica slúžila na pôsobenie za tmy a druhá podliehala svetelnému ožarovaniu v miestnosti vyhriatej na 37 °C. Na vzorky pod svetlom dopadalo žiarenie približne 900 lux (18,7 V, 0,26 A). Vďaka rotujúcej konštrukcii podložky sa suspenzie vo vnútri Petriho misiek premiešavali počas priameho kontaktu s fóliami. Po skončení časového intervalu pôsobenia fólií bolo z každej Petriho misky odpipetovaných 89  $\mu$ l suspenzie do jamiek v mikrotitračnej doštičke. Do jamky sa pridávali aj zvyšné komponenty v podobe živného média v objeme 10  $\mu$ l a 1  $\mu$ l resazurínu. Súčasne s týmito vzorkami sa do mikrotitračnej doštičky pipetovali aj suspenzie v nami vybraných koncentráciách, ktoré sa ďalej riedili na kalibračnú krivku,



ktorá sa vytvárala s každým meraním. Bol vytvorený roztok v zložení 1 ml živného média, 100  $\mu$ l resazurinu a 8,9 ml PBS, z ktorého sa po dôkladnom premiešaní 100  $\mu$ l pipetovalo do každej jamky, kam sa pridávalo 100  $\mu$ l suspenzie, ktorá sa premiešavala s farebným roztokom a riedila v ďalších jamkách. Na konci každej kalibračnej rady bola slepá vzorka pozostávajúca z farebného roztoku v objeme 100  $\mu$ l. Každá koncentrácia a vzorka mala tri duplikáty. Takto sa pri každom meraní pripravila kalibračná krivka na mieru aktuálneho stavu baktérií a tým sa dala presnejšie určiť antimikrobiálna aktivita povrchov. Dve koncentrácie suspenzií v tmavých aj svetelných podmienkach a ich kalibračné krivky zaplnili celú mikrotitračnú doštičku, ktorá sa zatvorila a vložila do čítačky kalibrovanej na teplotu 37 stupňov na približne 16 hodín (viď Obr. 15). Čítačka jamiek vďaka fluorescencii farbiva presne zaznamenala zmeny v intenzitách a vygenerovala presné hodnoty a krivky, ktoré sa ďalej spracovávali v programe MS Excel.

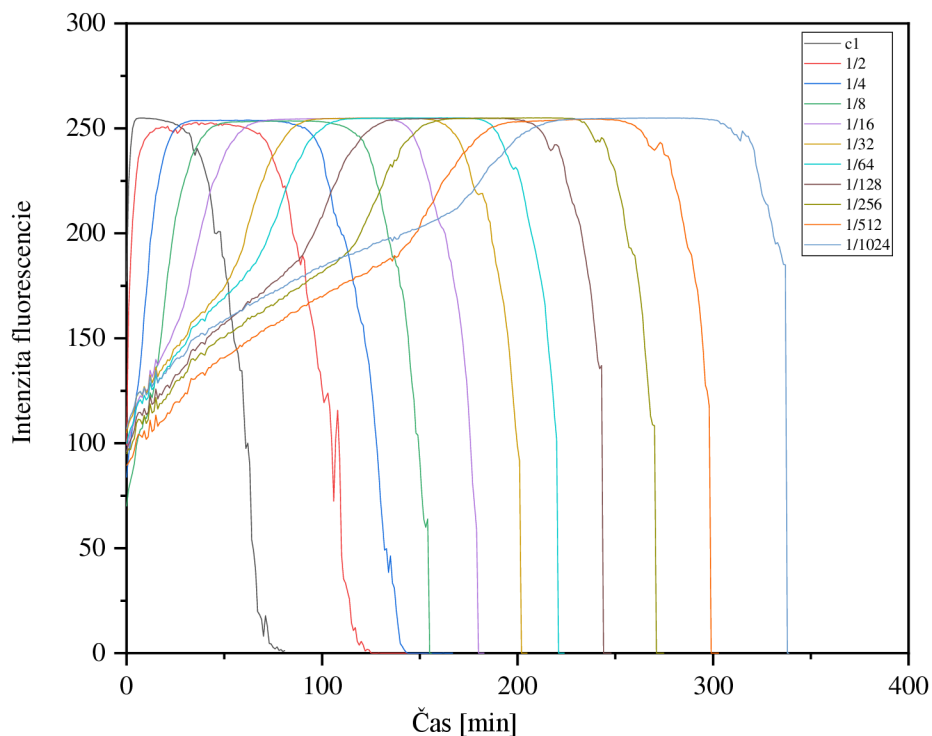


*Obr. 15: Mikrotitračná doštička so vzorkami kalibračnej krivky aj meraného experimentu po uplynutí meraného intervalu a farebnej zmene.*

## 6 VÝSLEDKY A DISKUSIA

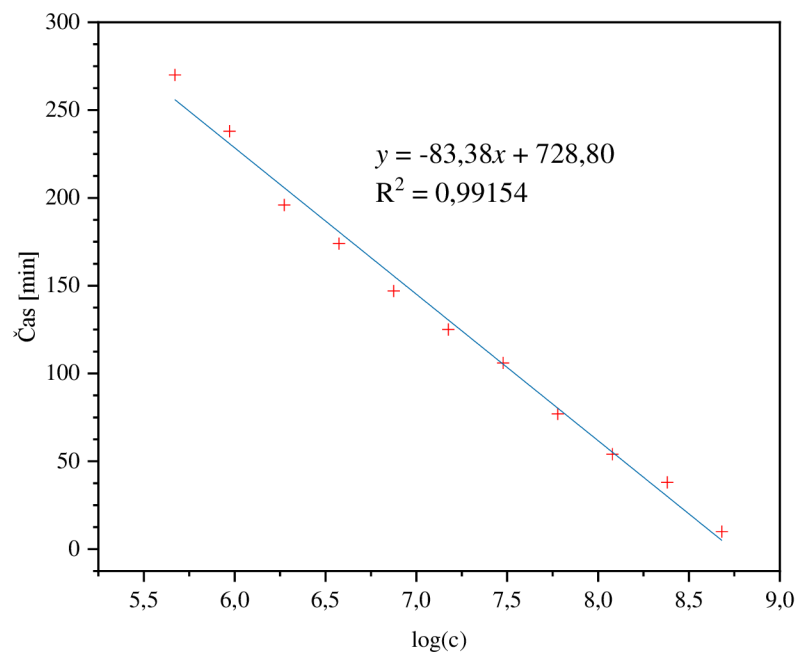
### 6.1 Kalibračná krivka

Aby bolo možné určiť antimikrobiálne vlastnosti skúmaných povrchov resazurínovou metódou bolo nutné určiť rovnicu kalibračnej krivky. Tá neskôr slúži pre výpočet presnej koncentrácie živých buniek v čase. Presný postup experimentu na získanie bodov kalibračnej krivky je opísaný v kapitole 5.2.4. Z fotografického záznamu sa pomocou programu ImageJ vyhodnotili krivky reakcií v závislosti intenzity fluorescence na čase (viď Obr. 16)



Obr. 16: Časy dosiahnutia fluorescenčného maxima pre jednotlivé koncentrácie suspenzií.

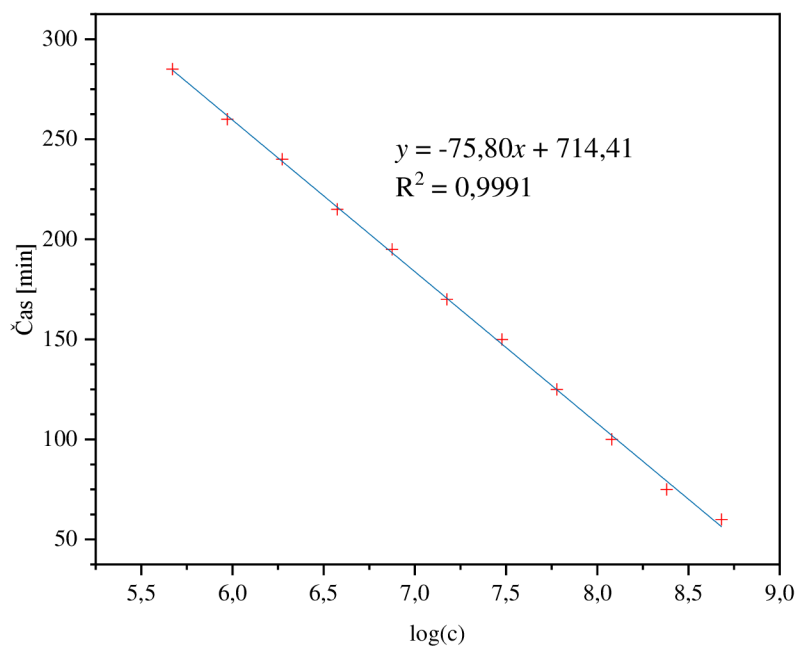
Následne sa vybrali body, pri ktorých jednotlivé koncentrácie dosiahli fluorescenčné maximum a z nich sa vytvorila kalibračná krivka s rovnicou regresie (viď Obr. 17)



Obr. 17: Kalibračná krivka rezazurinovej metódy vyhotovená fotograficky a jej rovnica regresie.

## 6.2 Overenie kalibračnej krivky mikrodilučnou metódou

Na overenie kalibračnej krivky vytvorenej v našom laboratóriu sa pri návšteve VŠCHT a možnosti merania pomocou plate-reader-a vytvorila kalibračná krivka podľa postupu 5.2.7, kde sa použili objemy látok približne v rovnakých pomeroch medzi sebou ako v prípade imerzných experimentov vytvorených na VUT. Kalibračná krivka touto metódou (viď Obr. 18) mala poslúžiť na potvrdenie správnosti krivky vytvorenu fotografickým záznamom.



Obr. 18: Kalibračná krivka s rovnicou regresie vytvorená mikrodilučnou metódou s rezazurinovým farbivom.

Ako je možné si všimnúť, rovnice regresíí nie sú numericky totožné, ale nesú len malé odchýlky, čo je následok podmienok prostredia aj využitia kultúr v inom čase a z iných zdrojov. Je potrebné podotknúť, že kalibračná krivka vytvorená fotografickým záznamom v podmienkach laboratória VUT je presná aj keď ju ovplyvňuje viac faktorov ako hodnoty zaznamenané v plate-readeri. Ďalej sa na vyhodnotenie experimentov použila rovnica regresie vychádzajúca z kalibračnej krivky vytvorenej fotografickým záznamom pre jej totožné podmienky vytvorenia ako pri imerzných experimentoch.

### 6.3 Imerzné experimenty

Podľa postupu v kapitole 5.2.5 sa vytvárali imerzné experimenty pre modelové povrchy. V tomto prípade to boli antimikrobiálne fólie s biocídou zložkou. Ako kontrolná vzorka slúžila samolepiaca fólia bez aktívnej vrstvy. Antibakteriálny účinok sa stanovoval pre fólie s vrstvou, v ktorých bol obsiahnutý pyrition zinku v rôznych koncentráciách (viď Tab. 2)

Tab. 2: Fólie s aktívnou látkou a obsah pyritionu zinku v jednotlivých vzorkách.

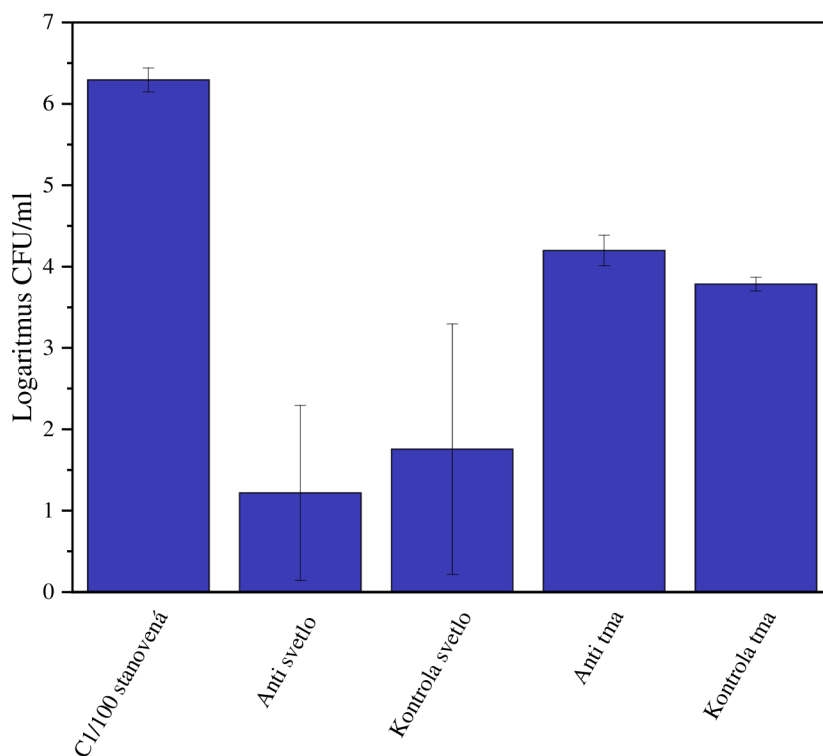
Označenie fólie	Obsah pyritionu zinku [mg]
D0	0
D50	50
D200	200

Po konci experimentu s využitím resazurínovej metódy, nasledovalo vyhodnotenie pomocou programu ImageJ, pomocou ktorého sa zistili časy, v ktorých jednotlivé vzorky dosiahli svoje fluorescenčné maximum (viď Tab. 3).

Tab. 3: Tabuľka časov dosiahnutia fluorescenčného maxima jednotlivých vzoriek.

Vzorka	Čas [min]	Priemer časov [min]	Odchýlka [min]
C1/100 stanovená A	220	206,67	12,22
C1/100 stanovená B	196		
C1/100 stanovená C	204		
Anti svetlo A	564	628,00	89,29
Anti svetlo B	590		
Anti svetlo C	730		
Kontrola svetlo A	728	583,33	127,75
Kontrola svetlo B	486		
Kontrola svetlo C	536		
Anti tma A	398	380,67	15,53
Anti tma B	376		
Anti tma C	368		
Kontrola tma A	420	415,00	7,07
Kontrola tma B	410		

Tieto časy slúžili na výpočet koncentrácií preživších baktérií. Hodnoty času sa dosadili do rovnice regresie ( $y = -83x + 729$ ) a výsledná hodnota sa rovnala logaritmu CFU na 1 ml (viď Obr. 19).



Obr. 19: Priemerný logaritmus preživších buniek obsiahnutých v jednom ml pre jednotlivé prostredia pôsobenia fólie D50 na suspenziu s koncentrácie C1/100.

Následne sa spravili priemery z troch ekvivalentných vzoriek, čím sme dostali priemerný logaritmus koncentrácie preživších buniek na mililiter. Hodnoty pre vzorky, na ktoré pôsobila aktívna vrstva a čistá fólia sa porovnávali medzi sebou v totožných prostrediach (svetlo/tma) a následne sa antibakteriálna aktivita vypočítala porovnaním účinku v rozdielnom prostredí (viď Obr. 20).

$$\Delta R = \log\left(\frac{B_L}{C_L}\right) - \log\left(\frac{B_D}{C_D}\right)$$

Obr. 20: Rovnica výpočtu antimikrobiálnej aktivity povrchu.

Hodnoty v rovnici znamenajú:

B<sub>L</sub>- priemerný počet živých buniek po ožiarení svetlom na vzorke bez aktívnej vrstvy

C<sub>L</sub>- priemerný počet živých buniek po ožiarení svetlom na vzorke s aktívnou vrstvou

B<sub>D</sub>- priemerný počet živých buniek na vzorke bez aktívnej vrstvy v tmavom prostredí na dobu ožarovania vzoriek

C<sub>D</sub>-priemerný počet živých buniek na vzorke s aktívnou vrstvou uložených v tmavom prostredí po dobu ožarovania vzoriek

Výsledky z programu ImageJ ako aj výpočty sa spracovávali v programe MS Excel a každé meranie bolo vyhodnotené výslednou súhrnnou tabuľkou (viď Tab. 4).

Tab. 4: Výsledky experimentu a vypočítaná hodnota antimikrobiálnej aktivity pre suspenziu riedenú na koncentráciu C1/100, na ktorú pôsobila fólia D50 po dobu 4. hodín.

Vzorka	Čas [s]	log CFU/ml	CFU/ml	Priemer log CFU/ml	Chyba	deltaR	
C1/100 výpočtom	-	6,681	4,80E+06	-	-	-	
C1/100 stanovená A	220	6,133	1,36E+06	6,29	0,15	-	
C1/100 stanovená B	196	6,422	2,64E+06			-	
C1/100 stanovená C	204	6,325	2,11E+06			-	
Anti svetlo A	564	1,988	9,73E+01	1,22	1,08	0,54	R <sub>L</sub>
Anti svetlo B	590	1,675	4,73E+01				
Anti svetlo C	730	-0,012	9,73E-01				
Kontrola svetlo A	728	0,012	1,03E+00	1,76	1,54	0,54	R <sub>L</sub>
Kontrola svetlo B	486	2,928	8,47E+02				
Kontrola svetlo C	536	2,325	2,11E+02				
Anti tma A	398	3,988	9,73E+03	4,20	0,19	-0,35	log (B <sub>0</sub> /C <sub>0</sub> )
Anti tma B	376	4,253	1,79E+04				
Anti tma C	368	4,349	2,24E+04				
Kontrola tma A	420	3,723	5,28E+03	3,84	0,09	-0,35	log (B <sub>0</sub> /C <sub>0</sub> )
Kontrola tma B	410	3,843	6,97E+03				
Kontrola tma C	-	-	-				
						<b>0,89</b>	<b>=ΔR</b>

Experimenty prebiehali vo viacerých sériách za sebou. Boli spracované všetky typy aktívnych vrstiev po časové intervaly pôsobenia 4 a 12 hodín, testované na suspenziách koncentrácií C1/100 ( $4,8 \cdot 10^6$  CFU/ml) a C1/1000 ( $4,8 \cdot 10^5$  CFU/ml), čím prebiehala aj optimalizácia tejto kolorimetrickej metódy voči zaužívaným metódam z noriem ISO (viď Tab. 5 a Tab. 6). Z času 12 hodín, ktoré boli bežne využívané na pôsobenie aktívnej vrstvy v normách bola snaha dosiahnuť porovnateľne dobré výsledky aj za kratší čas pôsobenia a na menšie koncentrácie bakteriálnych suspenzií aby bolo vidieť skutočný efekt vzorky bez vplyvu veľkého počtu buniek.

Tab. 5: Tabuľka výsledkov prvej série meraní imerzných experimentov všetkých typov aktívnych fólií s dvoma časovými intervalmi pôsobenia a vypočítanou antimikrobiálnou aktivitou pre jednotlivé experimenty.

Fólia	c	Čas [h]	R <sub>L</sub>	Log (B <sub>D</sub> / C <sub>D</sub> )	ΔR
<b>200 mg</b> (fólia D200)	c/100	4 h	1,38	0,39	1,00
		12 h	2,02	0,42	1,59
	c/1000	4 h	1,41	0,29	1,12
		12 h	2,76	0,65	2,11
<b>50 mg</b> (fólia D50)	c/100	4 h	0,67	-0,40	1,06
		12 h	0,69	-0,54	1,23
	c/1000	4 h	0,79	-0,31	1,09
		12 h	1,52	-0,29	1,81
<b>0 mg</b> (fólia D0)	c/100	4 h	0,55	-0,03	0,59
		12 h	0,43	0,22	0,20
	c/1000	4 h	0,70	-0,52	1,22
		12 h	1,49	-0,24	1,73

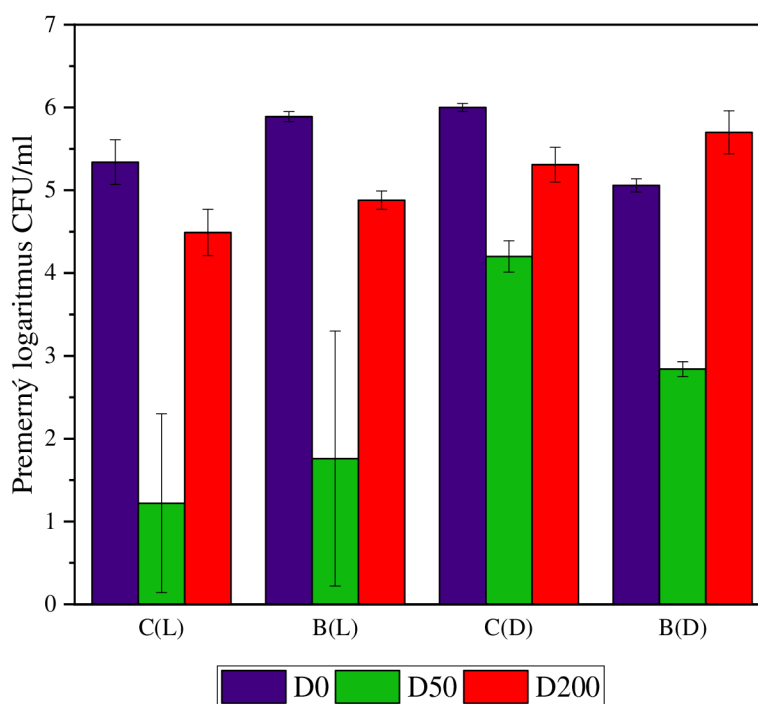
Tab. 6: Tabuľka druhej série meraní imerzných experimentov všetkých typov aktívnych fólií s dvoma časovými intervalmi pôsobenia a vypočítanou antimikrobiálnou aktivitou pre jednotlivé experimenty.

Fólia	c	Čas [h]	R <sub>L</sub>	Log (B <sub>D</sub> / C <sub>D</sub> )	ΔR
<b>200 mg</b> (fólia D200)	c/100	4	2,43	0,33	2,10
		12	4,35	1,12	3,23
	c/1000	4	1,72	0,31	1,41
		12	3,70	2,27	1,44
<b>50 mg</b> (fólia D50)	c/100	4	0,54	-0,35	0,89
		12	1,90	0,10	1,80
	c/1000	4	1,58	-0,46	2,04
		12	2,44	-0,32	2,76
<b>0 mg</b> (fólia D0)	c/100	4	0,63	-0,25	0,88
		12	0,69	-0,19	0,88
	c/1000	4	0,73	-0,21	0,94
		12	0,32	-0,39	0,71

V tabuľkách sú načrtnuté isté trendy, na základe ktorých, je možné predpokladať správnosť imerzných experimentov vyhodnotených resazurinovou metódou. Vzhľadom na cieľ využitia menšej koncentrácie buniek a získaniu relevantných výsledkov boli otestované všetky fólie s aktívnou vrstvou na časové intervaly 4 a 12 hodín. Z výsledkov v tabuľke druhej série meraní (viď Tab. 6) je zrejmé, že pri takto nízkej koncentrácii buniek ( $4,8 \cdot 10^5$  CFU/ml) dlhší časový interval pôsobenia fólií nemá viditeľný vplyv na výsledný antimikrobiálny účinok. Pri ktorejkoľvek koncentrácii aktívnej látky obsiahnutej na fólii sú výsledky takmer totožné s tými, pri ktorých bol čas pôsobenia rovnakej fólie len 4 hodiny. Dalo by sa teda interpretovať, že pri nízkych koncentráciách je dostačujúcim časom pôsobenia aktívnych látok na mikrobiálne suspenzie interval štyroch hodín na získanie relevantných hodnôt antimikrobiálnej aktivity. Pri experimentoch, kde sa využila suspenzia zriedená na C1/100 už čas pôsobenia mal vplyv na antimikrobiálnu aktivitu, avšak len pri vzorkách, v ktorých bola obsiahnutá nenulová koncentrácia pyritionu na aktívnej vrstve. Napriek tomu, však z experimentov s nízkou koncentraciou buniek plynie predpoklad, že 4 hodiny ako čas pôsobenia sú dostatočné na preukázanie antimikrobiálneho efektu aj pri vyšších koncentráciách vďaka resazurinovej metóde stanovenia.



Práve z tohto dôvodu boli vybrané výsledky zo sérií experimentov pre všetky vzorky fólií a použitej suspenzie v koncentrácii C1/100 s časom pôsobenia 4 hodiny na ich vzájomné porovnanie (viď Obr. 21).



Obr. 21: Graf závislosti priemerného logaritmu CFU/ml pre jednotlivé vzorky aktívnej aj čistej fólie vo svetelných a tmavých podmienkach.

Rovnako ako na Obr. 20 aj v tomto grafe boli použité veličiny, z ktorých sa vypočítava antibakteriálna aktivita povrchu. Priemerný logaritmus CFU/ml bol pre suspenzie bez pôsobenia fólií v týchto experimentoch vyčíslený na hodnotu 6,19. Hodnoty  $C_L$ , ktoré znázorňujú výsledky vzoriek fólie s aktívnym povrchom vystavených žiareniu, preukazujú najlepší účinok vzorky s pyritionom a to najmä s obsahom 50 mg (1,2 CFU/ml). Značný pokles nastal aj pri fólii D200 kde priemerný logaritmus CFU/ml bol 4,49, zatiaľ čo pre fóliu D0 bola hodnota priemerného logaritmu CFU/ml vyčíslená len na 5,3. Kontrolné fólie vystavené svetelným podmienkam ( $B_L$ ) taký pokles buniek mikrobiálnej populácie nemajú. Priemerné logaritmy CFU/ml nie sú nižšie ako 5,3, čo je vzhľadom na použitie čistých fólií pochopiteľné. Výnimkou je iba vzorka D50, čo bolo pravdepodobne spôsobené kontamináciou, keďže výsledky vzoriek na svetle boli postihnuté veľkou chybovosťou. Hodnoty získané v tme, či už pre čisté fólie ( $B_D$ ) alebo fólie s aktívnou vrstvou ( $C_D$ ) sú takmer ekvivalentné. Síce fólie s pyritionom zaznamenali poklesy, boli však minimálne oproti tým, nameraným za svetelných podmienok. Najnižšia hodnota priemerného logaritmu CFU/ml v tme bola stanovená u vzorky D50 a to konkrétne 4,2. Vyplýva z toho, že aktívne fólie sú oveľa účinnejšie na svetelných podmienkach ako za tmy. Porovnanie týchto experimentov tiež dokazuje, že použitá resazurínová metóda je vhodná na kvantifikáciu buniek mikrobiálnych populácií aj za takýchto podmienok a prináša prínosné výsledky, na ktorých je možné si všimnúť veľmi detailné rozdiely.

#### 6.4 Porovnanie resazurínovej metódy so zaužívanými metódami stanovenia CFU/ml pre porovnanie zistených antimikrobiálnych aktivít modelových povrchov

Porovnanie výsledkov získaných pomocou resazurínovej metódy s výsledkami získanými pomocou iných metód na stanovenie CFU/ml v antimikrobiálnej analýze modelových povrchov môže poskytnúť informácie o účinnosti a presnosti tejto metódy. Výsledné hodnoty antimikrobiálnych aktivít by sa nemali líšiť o viac ako 0,5 ak majú byť výsledky navzájom relevantné, a ak sú rozdiely medzi nimi menšie až rovné 0,2 považujú sa za totožné. Najprv je potrebné poznamenať, že rozdiely medzi výsledkami sú s veľkou pravdepodobnosťou vzniknuté vďaka rozličnej kondícii použitých bakteriálnych kmeňov, ktorých správanie aj napriek dodržaným fyzikálnym faktorom nie je možné presne ovplyvniť. Spočiatku boli porovnávané výsledky dvoch sérií imerzných experimentov nameraných pomocou resazurínovej metódy a vyhodnotených vďaka fotografickému záznamu (viď Tab. 5 a Tab. 6) Tieto pokusy prebiehali podľa postupu uvedeného v kapitole 5.2.5 s dĺžkou pôsobenia 4 hodiny. Dĺžka pôsobenia fólií bola vybraná na základe predchádzajúcich zhodnotení a následne aj pre lepšie porovnania s inými metódami, pri ktorých sa vybral kratší časový interval z dôvodu obmedzeného času pôsobenia v týchto laboratóriách. Výsledné hodnoty antimikrobiálnych aktivít modelových fólií, ktoré medzi sebou je možné považovať za dôveryhodné sú uvedené v tabuľke (viď Tab. 7)

*Tab. 7: Tabuľka zhrňujúca experimenty, z dvoch sérií meraní, ktoré majú relevantné výsledky pri vzájomnom porovnaní experimentov s časom pôsobenia jednotlivých fólií 4 hodiny na bakteriálne suspenzie.*

Fólia	Séria meraní	C	R <sub>L</sub>	log (BD/CD)	ΔR	Rozdiel v ΔR
D200	1	c/1000	1,41	0,29	1,12	0,29
	2		1,72	0,31	1,41	
D50	1	c/100	0,67	-0,40	1,06	0,17
	2		0,54	-0,35	0,89	
D0	1	c/100	0,55	-0,03	0,59	0,29
	2		0,63	-0,25	0,88	
D0	1	c/1000	0,70	-0,52	1,22	0,28
	2		0,73	-0,21	0,94	

#### 6.4.1 Porovnanie resazurínovej metódy s mikrodilučným stanovením

Práve kvôli porovnaniu a stanovení spoľahlivosti sa realizovali imerzné experimenty v laboratóriu na VŠCHT stanovované resazurínovou metódou, nie však vyhodnocované fotografickým záznamom ale na základe výsledkov z plate-reader-a. Postup vyhotovenia experimentov je popísaný v kapitole 5.2.7. Na experimenty boli využité všetky typy fólií, obe využívané koncentrácie suspenzií, ale s časom pôsobenia iba 4 hodiny. Konečné stanovené výsledky sú vyobrazené v tabuľke (viď Tab. 8)

Tab. 8: Výsledky antibakteriálnych účinkov pre všetky fólie namerané v laboratóriu na VŠCHT.

Fólia	c	Čas [h]	R <sub>L</sub>	Log (B <sub>D</sub> / C <sub>D</sub> )	ΔR
D200	c/100	4	1,0	3,43	-2,43
	c/1000	4	2,09	2,31	-0,22
D50	c/100	4	0,23	0,03	0,20
	c/1000	4	0,83	0,21	0,62
D0	c/100	4	0,68	0,67	0,01
	c/1000	4	1,40	-0,04	1,44

Výsledky pre fóliu D200 síce nekorelujú s ostatnými nameranými pre tento typ fólie, je však pravdepodobné, že došlo k chybe pri vykonávaní pokusu vzhľadom k tomu, že to bol prvý samostatný experiment v nových podmienkach, tým pádom je možné tieto výsledky interpretovať ako chybný ľudský faktor. Na druhú stranu je tiež evidentné, že pre obe stanovované koncentrácie prevažuje aktívny povrch pôsobiaci za tmavých podmienok. Tento výsledok môže byť tiež spôsobený prevážením vlastností aktívnej vrstvy nad vlastnosťami pyritionu zinku vmiešaného do vrstvy na fólii. Každopádne sa porovnali výsledky z týchto experimentov s výsledkami z tabuliek fotografických vyhodnotení (Tab. 5 a Tab. 6) a zistilo sa, že značná časť výsledkov spadala do hranice rozdielu antimikrobiálnych vlastností 0,5 (viď Tab. 9).

Tab. 9: Porovnanie výsledných antimikrobiálnych aktivít modelových fólií z experimentov na báze resazurínu v dvoch rozdielnych inštitúciách a spôsoboch získania nameraných hodnôt.

Fólia	Séria meraní	c	R <sub>L</sub>	log (BD/CD)	ΔR	Rozdiel v ΔR
D50	1	c/1000	0,79	-0,31	1,09	0,47
	VŠCHT		0,83	0,21	0,62	
D0	1	c/1000	0,70	-0,52	1,22	0,22
	VŠCHT		1,40	-0,04	1,44	
D0	2	c/1000	0,73	-0,21	0,94	0,50
	VŠCHT		1,40	-0,04	1,44	

Z výsledkov v tabuľke je poznať trendy, ktoré sa zhodujú u oboch spôsobov merania a vyhodnocovania CFU/ml. V prvom rade, fólie pôsobili na suspenzie dokonca aj s malou koncentráciou baktérií za svetelných podmienok lepšie ako v tme, čo sa potvrdilo aj v predchádzajúcich meraniach. V druhom rade sa porovnateľné výsledky našli hlavne pri fólii D0, pri ktorej je kvôli neznalosti zložiek aktívnej vrstvy a nulovej koncentrácie pyritionu nemožné predpokladať účinky samotnej fólie a tým by sa dali očakávať výsledky, ktoré sú najviac rozdielne. Práve z tohto dôvodu sa domnievam, že naša resazurínová metóda využívajúca vyhodnotenie z fotografických záberov je veľmi spoľahlivou pri stanoveniach množstva mikrobiálnych populácií, vzhľadom na to, že aj pri vzorkách takéhoto typu sú naše výsledky stále porovnateľné s výsledkami získanými z lepších podmienok experimentu, kde výsledky zozbieral platerreader.

#### 6.4.2 Porovnanie resazurínovej metódy so stanovením agarovou dilučnou metódou podľa ISO normy

Na zhodnotenie relevancie resazurínovej metódy sa výsledky z meraní porovnávali aj s metódou použitou v ISO 27447:2019. Postup pri experimentoch podľa normy je opísaný v kapitole 5.2.6. Na to, aby bol tento test platný je nutné aby spĺňal tieto požiadavky:

1. Logaritmus žijúcich baktérií neošetrených vzoriek po naočkovaní je menší alebo rovný hodnote 0,2.
2. Logaritmická hodnota životaschopných baktérií neošetrených vzoriek po naočkovaní je v rozsahu medzi  $1,0 \cdot 10^5$  CFU a  $4,0 \cdot 10^5$  CFU.
3. Počet životaschopných baktérií neošetrených vzoriek po vystavení svetlu by mal byť väčší ako  $1,0 \cdot 10^4$  CFU.
4. Po uchovávaní na tmavom mieste musí byť počet životaschopných baktérií neošetrených vzoriek väčší ako  $1,0 \cdot 10^4$  CFU.

Nižšie v tabuľke sú výsledky, ktoré tieto požiadavky spĺňajú (viď Tab. 10). Opäť sa zvolil čas pôsobenia fólií štyri hodiny a počiatočná koncentrácia buniek v suspenzii, s ktorou sa pracovalo bola c/100.

Tab. 10: Výsledky namerané normovanou metódou.

Fólia	c	Čas [h]	R <sub>L</sub>	log (B <sub>D</sub> /C <sub>D</sub> )	ΔR
D200	c/100	4	-0,03	0,27	-0,3
D50	c/100	4	1,33	0,67	0,67
D0	c/100	4	0,39	0,16	0,23

Z nameraných dát sú zrejmé predchádzajúce trendy a to, že vo svetelných podmienkach majú fólie lepší účinok ako v tme a vzorka s obsahom pyritionu D50 má lepšie hodnotové výsledky ako len fólia s aktívnou vrstvou, ktorá pyrition neobsahuje (D0). Vzorku D200 sa opäť nepodarilo zmerať tak, aby poskytla dobré výsledky, keďže predchádzajúce trendy opäť nepotvrdila. Znova prisudzujem túto chybu ľudskému faktoru, keďže bola meraná ako prvá z tejto série a teda metodika nebola zjavne úplne zvládnutá. Bohužiaľ na ďalšie opakované merania nebolo dostatok času, vzhľadom na to, že namiesto jednej vzorky meranej viackrát sa zvolila varianta merania všetkých modelových fólií aby bolo vytvorená širšia škála, ktorú možno porovnať. Namerané výsledky normovaným spôsobom (viď Tab. 10) sa porovnávali s výsledkami získanými resazurínovou metódou z oboch sérií experimentov (viď Tab. 5 a Tab. 6) a boli vynesené do tabuľky (viď Tab. 11).

Tab. 11: Porovnanie série experimentov podľa štandardizovanej normy a experimentov vyhodnotených vďaka resazurínovej metóde.

Fólia	Séria meraní	c	R <sub>L</sub>	log (B <sub>D</sub> /C <sub>D</sub> )	ΔR	Rozdiel v ΔR
D50	1	c/100	0,67	-0,40	1,06	0,39
	ISO		1,33	0,67	0,67	
D50	2	c/100	0,54	-0,35	0,89	0,22
	ISO		1,33	0,67	0,67	
D0	1	c/100	0,55	-0,03	0,59	0,36
	ISO		0,39	0,16	0,23	

Z tabuľky je zrejmé, že resazurínová metóda je vo veľkej miere účinná pri meraniach podľa ISO normy. Hlavným dôvodom tohto tvrdenia je, že pri fólii D50 boli výsledky resazurínovej metódy porovnateľné s agarovou dilučnou metódou v oboch sériách meraní. Navyše, pri tejto vzorke bola hodnota recovery percentuálne vysoká, takže sa dá predpokladať aj správnosť nameraných výsledkov. V konečnom dôsledku je na základe týchto hodnôt možné predpokladať, že resazurínová metóda je relevantná aj napriek malému počtu pokusov, s ktorými je v tejto práci porovnávaná s agarovou dilučnou metódou. Kvôli časovej náročnosti nebolo možné uskutočniť pokusov viac, ale z predchádzajúcich výsledkov meraných pre projekt bolo tiež zrejmé, že tieto dve metódy prinášajú porovnateľné výsledky s rozdielom kratšej doby vyhodnocovania pri resazurínovej metóde.

## 7 ZÁVER

Jedným z cieľov tejto diplomovej práce bolo po štúdiu relevantných zdrojov zostaviť rešerš, ktorá zhrnie súčasný stav znalostí o testoch viability pomocou farbiacich postupov. Kolorimetrický test založený na resazuríne bol vyvinutý ako časovo kinetický test vhodný na meranie koncentrácie baktérií. Táto technika sa využíva v biologických ale aj enviromentálnych systémoch, kde je nutná kvantifikácia mikrobiálnych populácií na zabezpečenie vysokej hygienickej úrovne alebo na skrining bakteriálnych kmeňov. Najčastejšie využitie má pri určovaní toxicity účinku dezinfekčných a antimikrobiálnych povrchov ale bola využitá aj pri stanovení účinnosti mikrobiálneho palivového článku, filtračných membrán či fotokatalytických povrchov.

Táto metóda však doteraz nebola považovaná za dostatočne relevantnú voči normovaným metódam uznaných ISO alebo inými štandardizačnými inštitúciami. Práve z tohto dôvodu bola v tejto práci snaha optimalizovať túto kolorimetrickú metódu na úroveň výsledkov získaných pri meraniach na základe štandardizovaných postupov. Najmä vzhľadom k tomu, že experimentálna časť a samotné vyhodnocovanie týchto normovaných metód je príliš časovo náročné na potreby ich dnešných využití. Na štúdium kinetiky konverzie resazurínu v závislosti na koncentrácii mikroorganizmov bola vyhodnocovaná fluorescencia farbiva pomocou fotografického záznamu a následne sa pomocou obrazovej analýzy získavala kalibračná krivka, vďaka ktorej bolo možné vypočítavať koncentráciu preživších baktérií pri výpočtoch antimikrobiálnej aktivity modelových materiálov. Na to, aby bolo možné porovnať resazurínovú metódu s normovanými metódami bolo potrebné použiť rovnaké skúmané materiály pre všetky spôsoby vyhodnocovania. V tejto práci sa vyhodnocovala antimikrobiálna aktivita fólií s aktívnou vrstvou, ktorá obsahovala rôzne koncentrácie biocídnej zložky, pyritionu zinku. Konkrétne boli využívané tri vzorky, kde fólia D200 obsahovala 200 mg, 50 mg bolo obsiahnutých na vzorke D50 a fólia D0 mala aktívnu vrstvu bez pyritionu. Účinky týchto fólií boli stanovované resazurínovou metódou pomocou imerzných experimentov pre viaceré koncentrácie suspenzií obsahujúce bakteriálny kmeň *E. coli*. Využívali sa suspenzie riedené na koncentráciu 1/100 a 1/1000 aby bolo možné preukázať funkčnosť metódy aj pre nižšie koncentrácie baktérií ako sú uvádzané v štandardizovaných normách, a aby sa preukázal skutočný efekt vzorky nezatienej prebytkom bakteriálnych buniek. V rámci optimalizácie boli tiež vybrané časy pôsobenia fólií na 12 a 4 hodiny, čo tiež skraca časové potreby niektorých normovaných metód.

V rámci vyhodnotenia antibakteriálnej aktivity skúmaných fólií je nutné poznamenať, že jednotlivé výsledky mohli byť značne odlišné vplyvom fyzikálnych podmienok alebo samotnej kondície bakteriálneho kmeňa. V konečnom dôsledku sa vďaka optimalizácii resazurínovej metódy opakovali v sériách meraní trendy, ktoré poukazovali na účinok pôsobenia antibakteriálnych fólií. Pri koncentrácii bakteriálnej suspenzie 1/1000 nemal čas pôsobenia fólií výrazný vplyv na výsledný antibakteriálny účinok. Pretože pri ktorejkoľvek koncentrácii aktívnej látky obsiahnutej na fólii boli výsledky takmer totožné s tými, pri ktorých bol čas pôsobenia rovnakej fólie len 4 hodiny.

Dalo by sa teda interpretovať, že pri nízkych koncentráciách je dostačujúcim časom pôsobenia aktívnych látok na mikrobiálne suspenzie interval štyroch hodín na získanie relevantných hodnôt antimikrobiálnej aktivity. Tento trend sa síce nedal s úplnou určitosťou aplikovať aj na suspenzie s vyššou koncentráciou buniek, ale napriek tomu sa ďalšie výsledky vyhodnocovali prevažne pri časoch pôsobenia 4 hodiny. Aktívna vrstva tiež prejavila lepší účinok pri všetkých druhoch fólií vo svetelných podmienkach, čo vďaka kontrolným vzorkám s neošetrenými fóliami vo svetle aj tme môžeme s určitosťou prisúdiť účinku vrstvy a nie výhodnejším podmienkam rastu *E.coli* v tme, vzhľadom na to, že kontrolné vzorky v oboch podmienkach mali podobné hodnoty. Z dvoch sérií meraní (viď Tab. 5 a Tab. 6) vyplýva, že najlepší účinok majú vzorky D200 s najväčšou koncentráciou biocídnej látky. Hneď za ňou mala veľmi podobný účinok vzorka D50 a najmenší ako bolo predpokladané mala vzorka D0, bez obsahu pyritionu zinku.

Relevancia týchto nameraných výsledkov resazurínovou metódou bola preukazovaná ekvivalentným meraním v laboratóriách na VŠCHT, kde mali lepšie prispôbené podmienky na zamedzenie chýb fyzikálnych faktorov meraní ako aj kontaminácie, a vyhodnocovanie intenzity fluorescenčného farbiva prebehlo pomocou plate-readera. Na pôde tejto univerzity bola opäť premeraná kalibračná krivka, ktorá potvrdila presnosť tej našej, čo podčiarklo správnosť vyhodnocovania našej metódy. Taktiež boli zmerané všetky typy fólií pre obe koncentrácie suspenzií s časom pôsobenia 4 hodiny. Tieto merania potvrdili trendy, namerané touto metódou na VUT. Výsledky antimikrobiálnych aktivít boli hodnotovo porovnateľné s našimi v troch prípadoch pričom pri dvoch na vzorkách D0, čo podčiarkuje funkčnosť resazurínovej metódy, keďže práve pri tejto vzorke nie je možné predpokladať účinky samotnej fólie a tým by sa dali očakávať výsledky, ktoré sú najviac rozdielne.

Na zhodnotenie relevancie resazurínovej metódy sa výsledky z meraní porovnávali aj s metódou použitou v ISO 27447:2019. Uskutočnila sa séria experimentov s vyhodnotením prostredníctvom agarovej dilučnej metódy a aj napriek nie úplnému zvládnutiu tejto metódy v obmedzenom čase bolo možné z nameraných výsledkov potvrdiť predchádzajúce trendy a nájsť prienik relevantných výsledkov z experimentov prostredníctvom resazurínovej metódy. Vzhľadom na časovú náročnosť nebolo možné uskutočniť viac experimentov pre túto normovanú metódu, ale z predchádzajúcich porovnaní pre projektové účely bolo tiež zrejmé, že výsledky týchto dvoch metód sú porovnateľné.

V konečnom dôsledku musím kriticky poznamenať, že aj napriek tomu, koľko faktorov môže resazurínovú metódu stanovenia bakteriálnej koncentrácie ovplyvniť je tá metóda veľmi účinná a spoľahlivá. Poskytuje porovnateľné výsledky s normovanými postupmi a je menej časovo náročná. Vďaka tomu, že pred samotným experimentom nie je potrebné vzorky vopred upravovať sa z nej stáva metóda s veľkým potenciálom pre širokospektrálne využitie v rôznych oblastiach, kde bude potrebné vzorky analyzovať v čo najkratšom čase za čo najmenšie náklady. Jedinou nevýhodou je nutnosť vytvorenia kalibračnej krivky pre každý analyzovaný bakteriálny kmeň, čo však z časovej náročnosti stále neprevyšuje normované metódy a preto považujem resazurínovú metódu za využiteľnejšiu.

## 8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. Miroslav V. *Lékařská mikrobiologie obecná 2. přepracované vydání*. NEPTUN; 2005:351.
2. Adriana L. *Lekárska mikrobiológia*. HERBA; 2019.
3. NCCLS. M26-A: Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents, Approved Guideline. Pennsylvania: NCCLS; 1999. p. 29.
4. ISO. ISO 22196: Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces. Switzerland: ISO; 2011. p. 15.
5. ISO. ISO 27447:2019: Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics)-Test method for antibacterial activity of semiconducting photocatalytic materials. Switzerland 2019. p. 23.
6. Arenas Yaxal, Mandel Arkady, Lothar L. Kynetic resazurin assay (KRA) for bacterial quantification of foodborne pathogens. doi:<https://doi.org/10.1117/12.912177> .  
<https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/8225/1/Kynetic-resazurin-assay-KRA-for-bacterial-quantification-of-foodborne-pathogens/10.1117/12.912177.full?SSO=1&tab=ArticleLink>
7. Travnickova Eva, Mikula Premysl, Oprsal Jakub, et al. Resazurin assay for assessment of antimicrobial properties of electrospun nanofiber filtration membranes. AMB Express 2019. doi:<https://doi.org/10.1186/s13568-019-0909-z> <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-019-0909-z>
8. Fai Patricia Bi, Alastair G. A rapid resazurin bioassay for assessing the toxicity of fungicides. Chemosphere; 2009;74:1165-1170. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.078>  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653508014896?via%3Dihub>
9. Mariscal Alberto, M. L-GR, Manuel C-V, Joaquin F-C. Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. Applied Microbiology and Biotechnology; 2009;82:773–783. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-009-1879-x>  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-009-1879-x>
10. Resazurin cell viability assay. <https://www.creative-bioarray.com/support/resazurin-cell-viability-assay.htm>
11. František K. *Fyziologie bakterii*. Státní pedagogické nakladatelství; 1983.
12. Vladimír B, Pavel N. *Všeobecná mikrobiológia*. Alfa; 1997:477.
13. T. GA, W. HR. Eradicating bacterial biofilms with natural products and their inspired analogues that operate through unique mechanisms. Current topics in medical chemistry; 2016;17:1954 - 1964. doi:10.2174/1568026617666161214150959  
<http://www.eurekaselect.com/article/80348>
14. Marek B, al. e. *Lékařská mikrobiologie, bakteriologie, virologie, parazitologie*. Marvil; 1996.
15. Hudcová Daniela, Viktor M. *Mikrobiológia*. Edícia skript. Slovenská technická univerzita; 2002.
16. Mária V. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 3 ed. Vysoké učení technické, Fakulta chemická; 2004.
17. Matias GC, Martínez Fernanda B., Patiño Vidal Cristian, Camillo S, Escrig Juan, Carol LdD. Antimicrobial metal-based nanoparticles: A review on their synthesis, types and antimicrobial action. 11. *Beilstein Journal of Nanotechnology*; 1450-1469. doi:<https://doi.org/10.3762/bjnano.11.129> <https://www.beilstein-journals.org/bjnano/articles/11/129>
18. Pharma-reports. *Klinicky významné bakterie*. Triton; 2012.
19. E.coli: What is it, How does it cause Infections, Symptoms and causes. Cleveland Clinic. <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/16638-e-coli-infection>
20. Rocha Fellipy S. , Gomes Anderson J. , Lunardi Claire N. , Kaliaguine Serge , S. PG. Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet Visible Spectroscopy—UV-Vis. .The Canadian Journal of Chemical Engineering 2018;96:2512-2517. doi:<https://doi.org/10.1002/cjce.23344>
21. team P. Spectroscopy: Principle, Instrumentation, and Applications - Instrumental Analysis. PSIBERG. <https://psiberg.com/uv-vis-spectroscopy/>
22. editors M. UV-Vis Spectroscopy: Principle, Instrumentation, Applications, Advantages, And



Limitation. Microbiologynote. <https://microbiologynote.com/uv-vis-spectroscopy/>

23. Hamad AMS, Kanwal R. Ultraviolet-Visible (UV-VIS) Spectroscopy. Essentials of pharmaceutical analysis; 2020:29-56. doi:[https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7_3)  
[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-1547-7\\_3](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-1547-7_3)

24. H. PM. Basic principles of spectroscopy. *Food Analysis*. Springer International Publishing; 2017. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-45776-5\\_6](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-45776-5_6)

25. Tom J. UV-VIS Spectroscopy: Principle, Strengths and Limitations and Applications. Technology Networks; 2023. <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/uv-vis-spectroscopy-principle-strengths-and-limitations-and-applications-349865>

26. editors M. UV-Vis Spectroscopy Principle, Instrumentation, Applications, Advantages, And Limitation. Microbiologynote. <https://microbiologynote.com/uv-vis-spectroscopy/>

27. Govinda V, Manish M. Development and optimization of UV-VIS spectroscopy: A review. World Journal of Pharmaceutical Research;7. [https://wjpr.s3.ap-south-1.amazonaws.com/article\\_issue/1527938423.pdf](https://wjpr.s3.ap-south-1.amazonaws.com/article_issue/1527938423.pdf)

28. Pratap SD, R. IS, Sandeep K. Fluorescence Spectrometry. *Modern Techniques of Spectroscopy: Basics, Instrumentation and Applications*. Springer; 2021:431-468. doi:[https://doi.org/10.1007/978-981-33-6084-6\\_17](https://doi.org/10.1007/978-981-33-6084-6_17) [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-33-6084-6\\_17](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-33-6084-6_17)

29. A. HD, J. SN. Resazurin-based assay for screening bacteria for radiation sensitivity. SpringerPlus; 2013;2. doi:<https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-55>  
<https://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/2193-1801-2-55>

30. Andrew M, Wells Nathan, Christopher O. Correlation between the photocatalysed oxidation of methylene blue in solution and the reduction of resazurin in a photocatalyst activity indicator ink (Rz Paiti). Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry; 2016;330:86-89. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.07.020>  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010603016304828?via%3Dihub>

31. Andrew M, Nathan W, John M, Grant M. Kinetics of reduction of a resazurin-based photocatalytic activity ink. Catalysis Today; 2017;281:14-20. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2016.05.045>  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920586116304060?via%3Dihub>

32. Jing L, Xiulei T, Jianbo G, et al. Effects of resazurin on perchlorate reduction and bioelectricity generation in microbial fuel cells and its catalysing mechanism. *Biochemical Engineering Journal*. 2016;114:164-172. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.06.028>  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X16301814?via%3Dihub>

33. S. UJ, D. DM, A. WJ, M. MW. Essential design considerations for the resazurin reduction assay to noninvasively quantify cell expansion within perfused extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*. 2017;129:163-175. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.015>  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961217300893?via%3Dihub>

34. David I, Daniel I-B, Alejandro P-J, Begona G-GM, David H-S, Pablo F-B. Raman and fluorescence spectroelectrochemical monitoring of resazurin-resorufin fluorogenic system. *Dyes and Pigments*. 2020;172. doi:<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107848>  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143720819312793?via%3Dihub>

35. Raphael O, Lin CJ, C. SD, W.J. ST. Rapid serial diluting biomicrofluidic provides EC50 in minutes. *Micro and Nano Engineering*. 2019;2:92-103. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mne.2019.02.002>  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590007219300061?via%3Dihub>

## 9 ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

<b>Symbol</b>	<b>Význam</b>
MIC	Minimálna inhibičná koncentrácia
MBC	Minimálna baktericídna koncentrácia
CLSI	Clinical and Laboratory Standards institute
ISO	International organisation for Standardisation
CFU	Colony forming units
RFU	Relative fluorescence units
Pk	Farmako-kinetické parametre
Pd	Farmako-dynamické parametre
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
MFC	Microbial fuel cells
ECM	Extracelulárna matrix
PBS	Phosphate buffered saline