



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

POSOUZENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY

FOTOAKTIVNÍCH POVRCHŮ DYNAMICKOU METODOU

ANTIMICROBIAL ACTIVITY ASSESSMENT OF PHOTOACTIVE SURFACES BY DYNAMIC METHOD

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Adam Smelik

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Marcela Králová, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1977/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Adam Smelik**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Marcela Králová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Posouzení antibakteriální aktivity fotoaktivních povrchů dynamickou metodou

Zadání bakalářské práce:

- Vypracujte literární rešerši shrnující současný stav poznání o testech viability mikrobiálních populací pomocí barvicích postupů.
- Optimalizujte resazurinovu metodu, jakožto nástroj pro vyhodnocení koncentrace přeživších mikroorganismů při testech antimikrobiální aktivity dynamickou metodou.
- Proveďte kritické zhodnocení navrženého postupu a porovnejte ho se zavedenými normovanými postupy.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

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

Adam Smelik
student

Ing. Marcela Králová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá posouzením antibakteriální aktivity fotoaktivních povrchů dynamickou metodou za využití modifikovaného resazurinového testu. Resazurinový test využívá nevratné konverze resazurinu na resorufin při metabolizování bakteriemi, která se při sledování projeví změnou v barvě a intenzitě fluorescence. V této práci je resazurinový test využit k vyhodnocení antibakteriálního účinku fólií s fotoaktivní vrstvou, na které je nanášena suspenze obsahující bakterie druhu *Escherichia coli*. Prostřednictvím zhotovené kalibrační křivky pro tento druh byla posouzena antibakteriální aktivita fólií a byly určeny způsoby optimalizace námi zvolené metody.

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with the assessment of the antimicrobial activity of photoactive surfaces by a dynamic method using a modified resazurin test. The resazurin test utilizes the irreversible conversion of resazurin to resorufin when metabolized by bacteria, which is characterized by a change in color and fluorescence intensity when observed. In this project, the resazurin test is used to evaluate the antibacterial effect of foils with a photoactive layer, on which a suspension containing *Escherichia coli* is applied. The antimicrobial activity of the foils was assessed by means of the calibration curve created for this species, and ways to optimize the method chosen by us were determined.

KLÍČOVÁ SLOVA

resazurin, antibakteriální aktivita, fotoaktivní povrch, *E. coli*

KEYWORDS

resazurin, antimicrobial activity, photoactive surface, *E. coli*

SMELIK, Adam. *Posouzení antibakteriální aktivity fotoaktivních povrchů dynamickou metodou*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156391>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Marcela Králová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych vyjádřil své upřímné poděkování všem, kteří mi poskytli podporu během tvorby této bakalářské práce. Zvláštní poděkování patří vedoucí mé práce, Ing. Marcele Králové, Ph.D., a to především za její věnovaný čas, cenné rady, odborné znalosti a zkušenosti. Dále bych rád vyjádřil vděčnost mé konzultantce, Ing. Sylvii Patakyové, která při tvorbě této práce byla vždy ochotna navést mě na správnou cestu.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	8
2.1 Barvicí metody v současnosti	8
2.1.1 Barvení trypanovou modří	8
2.1.2 Barvení propidium jodidem a ethidium bromidem.....	8
2.1.3 Barvení pomocí tetrazoliových solí (MTT, CTC)	9
2.1.4 Barvení krystalovou violetí.....	10
2.1.5 Barvení 5-CFDA-AM	11
2.2 Historie využití resazurinu v biochemických stanoveních	11
2.3 Normy relevantní pro stanovení antibakteriální aktivity	12
2.3.1 Norma E2149-20.....	12
2.3.2 Normy ISO 27447:2019 a ISO 17094:2014	12
2.3.3 Srovnání normovaných postupů s resazurinovou metodou	12
2.4 Charakterizace použitých chemikálií a vzorků.....	13
2.4.1 Resazurin.....	13
2.4.2 Bakteriální kmen <i>Escherichia coli</i>	14
2.4.3 Antibakteriální folie	15
2.4.3.1 Ftalocyanin a sloučeniny jej obsahující	15
2.4.3.2 Pyrithion zinku	16
3 CÍL PRÁCE	17
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
4.1 Příprava použitých látek	18
4.1.1 Příprava bakteriální suspenze	18
4.1.2 Příprava roztoku PBS.....	18
4.1.3 Příprava roztoku resazurinu	18
4.2 Popis použitých aparatur	18
4.2.1 Aparatura pro časosběrný záznam	18
4.2.2 Reaktor pro imerzní experimenty	20
4.3 Realizace vybraných experimentů.....	21
4.3.1 Sestavení kalibrační křivky	21
4.3.2 Sestavení imerzního experimentu	22
4.3.3 Sestavení time-kill experimentu	23
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	24
5.1 Metodologie vyhodnocení časosběrného záznamu	24
5.2 Kalibrační křivka	24
5.3 Výsledky imerzních experimentů	26

5.3.1 Folie D0	27
5.3.2 Folie D50	28
5.3.3 Folie D200	29
5.3.4 Souhrn výsledků imerzních experimentů.....	30
5.4 Výsledky time-kill experimentů	31
6 ZÁVĚR.....	33
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	35
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	40

1 ÚVOD

Testy buněčné viability jsou důležitou součástí moderního mikrobiologického výzkumu. Posouzení, zda jsou antibakteriální látky a povrchy dostatečně efektivní při konání své funkce, jsou klíčová ve zdravotnictví, potravinářství a mnohých odvětvích průmyslu, především pro ochranu zdraví koncových spotřebitelů.

K posouzení efektivity antibakteriálních materiálů je potřeba zjistit schopnost přežití mikrobiální populace při expozici a množství, případně koncentraci, přeživších bakterií. V současnosti se pro efektivní stanovení koncentrace bakterií používá široká škála normovaných postupů, v teoretické části se tato práce zaměří pouze na testování prostřednictvím barvicích metod. Barvicí metody náleží do oblasti fotochemických stanovení a zkoumá se při nich interakce živých či mrtvých bakterií s barvivem. Je možné přímo počítat zabarvené bakterie pod mikroskopem, nebo také stanovit množství úbytku či transformace barvicí látky. V porovnání s ostatními jsou barvicí metody relativně nedestruktivní a technologicky nenáročné.

Experimentální část této práce se zabývá uplatněním resazurinového testu bakteriální viability jako způsobu posouzení efektivity folií s antibakteriální vrstvou. Skládá se ze dvou částí: v první části byla sestavena kalibrační křivka, ve druhé byla data této křivky aplikována na experiment s foliemi. Resazurin byl pro analýzu vybrán proto, že je pro námi vybrané bakterie druhu *E. coli* netoxický při námi použitých koncentracích a jeho využití pro kolorimetrická stanovení mikroorganismů je podloženo dřívějším výzkumem. Bakteriální druh *E. coli* byl vybrán pro nenáročnost své kultivace a nízkou nebezpečnost při práci s jeho vzorky.

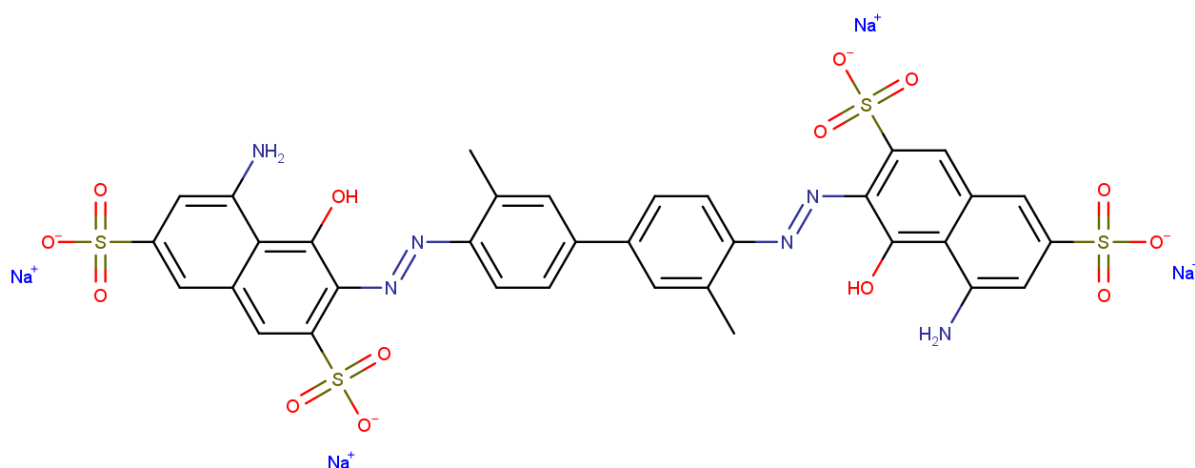
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Barvicí metody v současnosti

2.1.1 Barvení trypanovou modří

V současné cytometrii je používána široká škála barvicích látek. Jednou z nich je trypanová modř, azobarvivo odvozené od *o*-toluidinu se strukturou uvedenou na Obrázku 1. Tato látka selektivně barví buňky s porušenou cytoplazmatickou membránou do modra, živé buňky s neporušenou cytoplazmatickou membránou se neobarví. Po vytvoření bakteriální suspenze v PBS je část této suspenze oddělena a smíchána s 0,4% roztokem trypanové modři v poměru 1:1. Takto připravená směs se nechá 3–5 minut odstát při laboratorní teplotě, poté se kapka této směsi analyzuje pod mikroskopem nebo prostřednictvím cytometru a numerických postupů. [1]

Ačkoliv je tato metoda jednoduchá, vyžaduje časovou přesnost kvůli prokazatelně toxickému působení trypanové modři na živé buňky už po 5 minutách po expozici. [1][2] Nevýhodou je také obtížné určování viability na základě porušení buněčné membrány, buňky, které nejsou schopny dalšího růstu, totiž mohou mít buněčnou membránu zachovalou a tím pádem nevstřebají částice modři. [1] Je také nutno poznamenat, že baktericidní účinek trypanové modři proti bakteriím z rodu *Trypanosoma* a jim příbuzných je natolik silný, že deriváty tohoto barviva dodnes používají při léčení trypanosomiázy. [3]

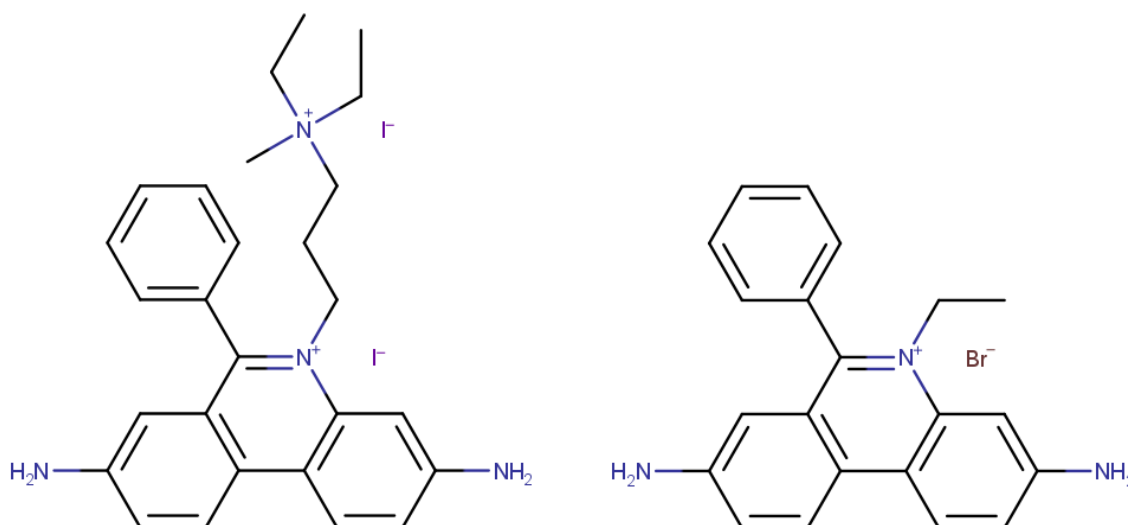


Obrázek 1: Struktura molekuly trypanové modři [3]

2.1.2 Barvení propidium jodidem a ethidium bromidem

Na podobném principu jako stanovení trypanovou modří funguje i metoda využívající látku propidium jodid, případně ethidium bromid, s tím rozdílem, že fluorescence těchto látek je pod mikroskopem mnohem lépe viditelná než jejich barva. [4] Buňky s porušenou plazmatickou membránou při ozáření fluoreskují oranžovým zářením vlnové délky mezi 600 a 620 nm. Maxima excitačního záření jsou ale u těchto dvou látek různá: ethidium bromid je excitován ultrafialovým zářením (300 nm), propidium jodid je excitován zeleným světlem (540 nm). [5][6] Od používání propidium jodidu a ethidium bromidu se upouští ve prospěch syntetických barviv, jako je např. zelené barvivo SYTOX™. [4][7] Nevýhodou jejich používání je nežádoucí

pomalý průnik především ethidium bromidu do živých buněk přes jejich buněčnou membránu kvůli své struktuře (vizte Obrázek 2). [4]

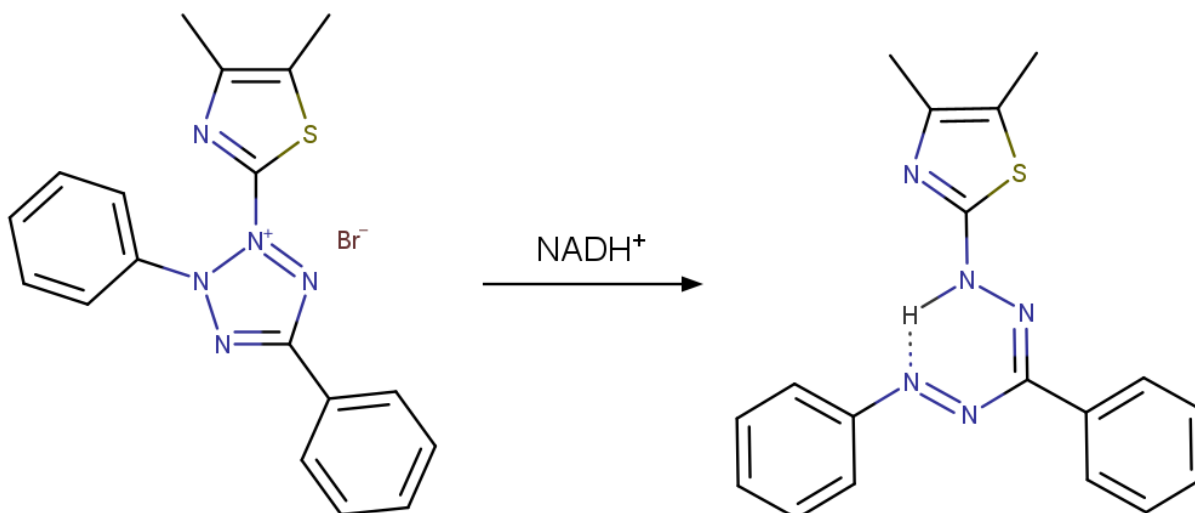


Obrázek 2: Struktura molekul propidium jodidu (vlevo) a ethidium bromidu (vpravo) [8]

2.1.3 Barvení pomocí tetrazoliových solí (MTT, CTC)

Další barvicí metoda spočívá v redukcí tetrazoliových solí na formazany. Nejpoužívanější tetrazoliovou solí pro tyto účely je MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid, který je žlutý a v přítomnosti NADH^+ se redukuje na fialovou, ve vodě nerozpustnou formazanovou formu podle schématu na Obrázku 3. Vzhledem k tomu, že pouze živé buňky jsou schopny poskytnout NADH^+ pro tuto reakci, množství formazanu je úměrné množství živých buněk. Formazan se kvůli své nerozpustnosti ve vodě musí při tomto stanovení extrahovat do okyseleného isopropanolu, DMSO (dimethylsulfoxidu) nebo minerálního oleje, poté se stanovuje UV-Vis spektrometrií. [9][10] Měření absorpčního spektra probíhá typicky mezi 500 a 600 nm.

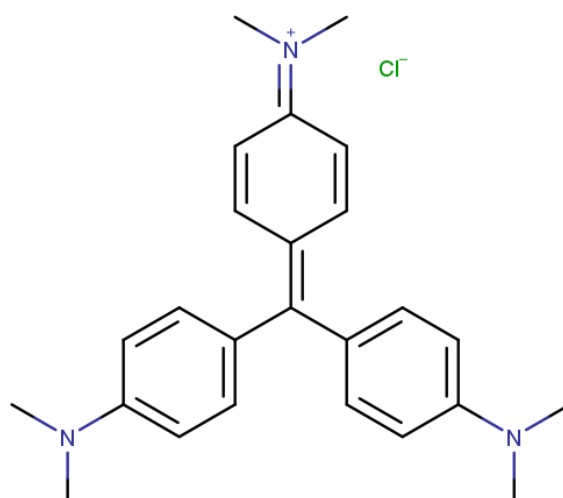
Při tomto kolorimetrickém stanovení je nežádoucí kontaminace jinou barevnou látkou, která může např. být součástí živného média či bakteriálním metabolitem. [11] Pokud je přítomnost barevných látek nevyhnutelná, alternativou je použití CTC, 5-kyano-2,3-ditolyltetrazolium chloridu. Příprava probíhá stejně, ale měřenou veličinou je fluorescence místo absorbance. [10] CTC je bezbarvá a nefluoreskující látka, ale formazanový produkt fluoreskuje červeně když je excitován zářením vlnové délky mezi 420 a 480 nm. Analýza pomocí CTC v současnosti nalézá uplatnění hlavně v oblasti stanovování bakteriálního obsahu ve vodě. [12][13] Pokud není při stanovení žádaný extrakční krok, tým Alamoudi et al. v roce 2018 představil metodu využívající azobarvivo na bázi safraninu, jehož metabolit je rozpustný i ve vodě. [14]



Obrázek 3: MTT a jeho konverze na formazanovou formu [10][16]

2.1.4 Barvení krystalovou violetí

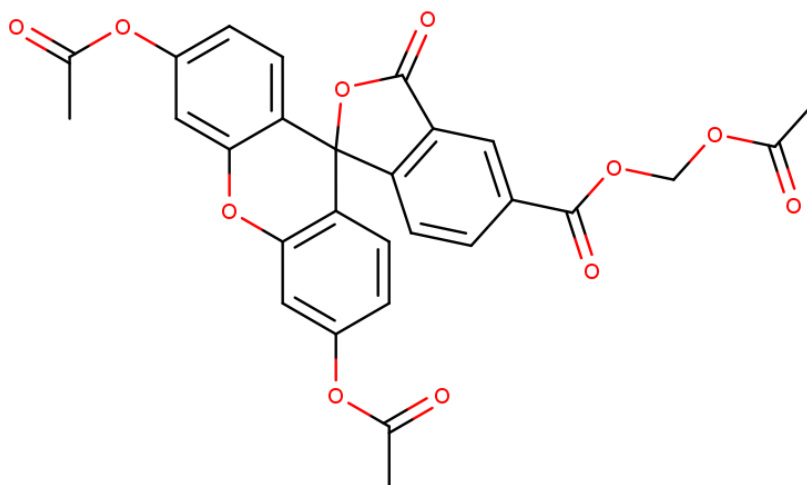
Krystalová, nebo také genciánová, violet je triarylmethanové barvivo (strukturu vizte na Obrázku 4), jehož nejznámějším použitím je tzv. Gramovo barvení, které slouží pro identifikaci bakterií. [15] Roztok krystalové violeti v methanolu či ethanolu se používá především k barvení bakterií, které ulpěly a jsou zafixovány na povrchu např. paraformaldehydem. [16][17] Přebytečná violet se spolu s nefixovanými bakteriemi a makromolekulami omyje vodou a zbylé bakterie se stanovují pomocí měření UV-Vis spektrometrem. [17][18] Absorpční maximum se udává při vlnových délkách v rozmezí 550 až 570 nm. Barvení krystalovou violetí není specifické jen pro bakterie, barví se jí i další biomakromolekuly, což může znesnadnit potenciální aplikace tohoto typu barvení. [18] Při práci s krystalovou violetí je nutno si uvědomit, že je genotoxická, karcinogenní a obecně škodlivá pro životní prostředí. [19] Tým Chiba, Kawakami a Tohyama v roce 1998 představil kombinovanou metodu využívající MTT, krystalovou violet a neutrální červeně pro měření cytotoxicity. Zde je krystalová violet použita jako doplňkový způsob barvení ke zbylým dvěma způsobům. [20]



Obrázek 4: Struktura molekuly krystalové violeti [16]

2.1.5 Barvení 5-CFDA-AM

Poslední metodou, kterou je nutno zmínit, je fluorimetrické měření za použití látky 5-CFDA-AM (acetoxymethyl-5-karboxyfluoresceindiacetátu, pro strukturu vizte Obrázek 5). [16] Tento ester je schopen proniknout přes plazmatickou membránu bakterií do cytoplazmy, kde je prostřednictvím enzymatické reakce přeměněn na 5-karboxyfluorescein (5-CF). Tato látka není schopna projít zpět přes membránu do okolí a je tedy zadržena v buňce. [21] Excitační záření pro fluorescenci je vlnové délky 500 nm, emitované je vlnové délky kolem 520 nm. [22][23] V mnohých aspektech se tento typ měření podobá resazurinovému testu, existují studie, při kterých se tyto dva testy provádějí souběžně. [23]



Obrázek 5: Struktura molekuly 5-CFDA-AM [24]

2.2 Historie využití resazurinu v biochemických stanoveních

Využití redukce resazurinu na resorufin je v biochemii známo nejspíše už od roku 1929, kdy Pesch a Simmert ve svém díle popsali svůj proces pro kvantifikaci obsahu bakterií v mléce za pomoci této reakce. [25] V současnosti na tuto publikaci navázal tým Silanikove a Shapiro. Ve svých člancích popisují využití roztoku resazurinu pro stanovení enzymatické aktivity a množství bakteriálních metabolitů v potravinářství, jmenovitě v mléce a jogurtu. Kvůli nehomogenitě mléčných výrobků je jednoduchá kolorimetrická analýza obtížná, Silanikove a Shapiro tedy navrhuji fluorimetrickou analýzu za použití resazurinu, jejíž cílem je nepřímo stanovit množství laktózy a galaktózy ve zkoumaných jogurtech. [26][27]

Analýza kvality mléka prostřednictvím zkoumání redukce resazurinu na resorufin byla zkoumána a modernizována už v první polovině 20. století. [28][29] V roce 1940 byl vydán článek týmu Johns a Howson porovnávající redukci resazurinu s redukcí methylenové modři při stanovení bakteriologické kvality mléka potenciometrickou metodou. Výsledky tohoto experimentu ukázaly, že ačkoliv se potenciometrická křivka vzorků s resazurinem liší od potenciometrické křivky vzorků s methylenovou modří, přesné indikace resazurinem je možné dosáhnout za kratší dobu. Redukce resazurinu je také urychlena pravidelným opatrným otočením zkumavky s reakční směsí. [29]

Zjištění, že resazurinové testy jsou rychlejší než jiné metody za zachování přesnosti, vedlo k vývoji resazurinových „rychltestů“, které se používají k rychlému orientačnímu stanovení bakteriální aktivity především v nepasterovaném mléce. Testy přitom nabývaly různých forem, od resazurinem napuštěného filtračního papíru, jehož použití lze datovat od roku 1969, po resazurinové tablety, které jsou používány až do současnosti. [30][31]

2.3 Normy relevantní pro stanovení antibakteriální aktivity

2.3.1 Norma E2149-20

Norma E2149 s názvem „Standardní testovací metoda pro stanovení antibakteriální aktivity antimikrobiálních látek za podmínek dynamického kontaktu“ byla vydána americkou organizací American Society for Testing and Materials (ASTM) v roce 2020. Cílem zmíněného normovaného postupu je srovnání množství bakterií v suspenzích, které buď obsahují testovanou antibakteriální látku na povrchu nosiče, či nikoliv. Tuto normu je tedy možno chápat jako základní kámen pro imerzní experimenty – testovaný povrch je totiž vždy celý ponořen v suspenzi. Stejně jako tomu je v provedeném experimentu, i v normovaném postupu jsou bakteriální suspenze umístěny na třepač a ponechány na určitou dobu třepání, např. v normě je definovaná doba třepání jedna hodina, což antibakteriálnímu povrchu dodá dynamické kontaktní podmínky pro optimální působení. Norma se ale poté liší od provedeného experimentu způsobem vyhodnocení počtu bakterií, místo využití resazurinové metody totiž využívá sériového ředění, dodatečné inkubace a optickému stanovení počtu kolonií. [32]

2.3.2 Normy ISO 27447:2019 a ISO 17094:2014

Mezinárodní normy ISO 27447:2019 a ISO 17094:2014 se týkají měření antibakteriální aktivity na fotokatalytických materiálech. Obsahově jsou podobné, obě se týkají netextilních povrchů za využití identického postupu, liší se ale v druhu použitého záření, jehož zdroje jsou popsány v subsidiárních normách. [33][34] Tyto normy také explicitně zmiňují testování na bakteriálních druzích *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Vzorek fotokatalytického materiálu je umístěn do Petriho misky, posléze je zalit bakteriální suspenzí, následně zakryt krycím sklem a nakonec vystaven definovanému záření. Podobně se sestaví druhý vzorek s tím rozdílem, že neobsahuje fotokatalytickou vrstvu. Bakteriální obsahy těchto dvou vzorků jsou poté stanoveny vhodnou metodou a srovnány. [35][36]

2.3.3 Srovnání normovaných postupů s resazurinovou metodou

Součástí vybraných normovaných postupů je převedení bakteriální populace do Petriho misky a následné optické vyhodnocení počtu bakteriálních kolonií. Tento krok zavádí do testovacího procesu jistou subjektivitu, zkoumající musí být totiž zkušený v počítání bakteriálních kolonií, musí být schopen určit mnohdy zavádějící rozhraní mezi dvěma splynulými koloniemi, musí umět identifikovat případnou kontaminaci vzorku jiným bakteriálním druhem a také musí být schopen udržet pozornost při této repetitivní činnosti. Manuální počítání je možno obohatit tzv. počítačkovou kolonií, což ale způsobuje nutnost zakoupení nového přístroje určeného pro tento specifický úkon. Normované postupy jsou navíc také zatíženy přídatnou inkubační dobou, kterou je nutné dodržet pro růst kolonií po působení baktericidního činidla.

Resazurinová metoda je ve srovnání s normovanými postupy objektivním, rychlým a nedestruktivním způsobem stanovení bakteriálního obsahu ve vzorku. Tuto metodu může provést každá osoba obeznámená se základy mikrobiologie, sterilních pracovních postupů a obsluhy počítačového rozhraní. Data jsou získána fotografováním vzorků s následným zpracováním na počítači, což má za cíl minimalizovat chybu způsobenou uživatelem. Resazurinová metoda je taktéž poněkud nenáročná komplexitou požadované aparatury, je třeba zajistit pouze fotoaparát a LED, pro celý popis použité aparatury vizte kapitolu 4.2.

2.4 Charakterizace použitých chemikálií a vzorků

2.4.1 Resazurin

Resazurin (sumární vzorec $C_{12}H_7NO_4$, CAS 550-82-3, molární hmotnost $229,19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) je oxidačně-redukční indikátor odvozený od heterocyklické látky fenoxazinu, který strukturou připomíná antracen. [37] Na trhu je k dostání pod obchodním názvem Alamar Blue v podobě své sodné soli. Tato sůl je rozpustná ve vodě a organických rozpouštědlech. [38] Roztoky resazurinu mají při neutrálním pH tmavě modrou až modrofialovou barvu.

Redukce resazurinu nevratně vede k tvorbě produktu resorufinu. Na rozdíl od modrého resazurinu je resorufin růžový a vysoce fluorescentní, s excitačním maximem při vlnové délce 570 nm a emisním maximem při 580 nm. [38][39] Při další redukci se resorufin mění na dihydroresorufin, který je čirý a nefluoreskuje. Druhotná konverze resorufinu na dihydroresorufin je vratná, změny zpět na resorufin je možné dosáhnout vystavením vzdušnému kyslíku – např. protřepáním. [40] Výše uvedené reakce jsou schematicky znázorněny na Obrázku 6.



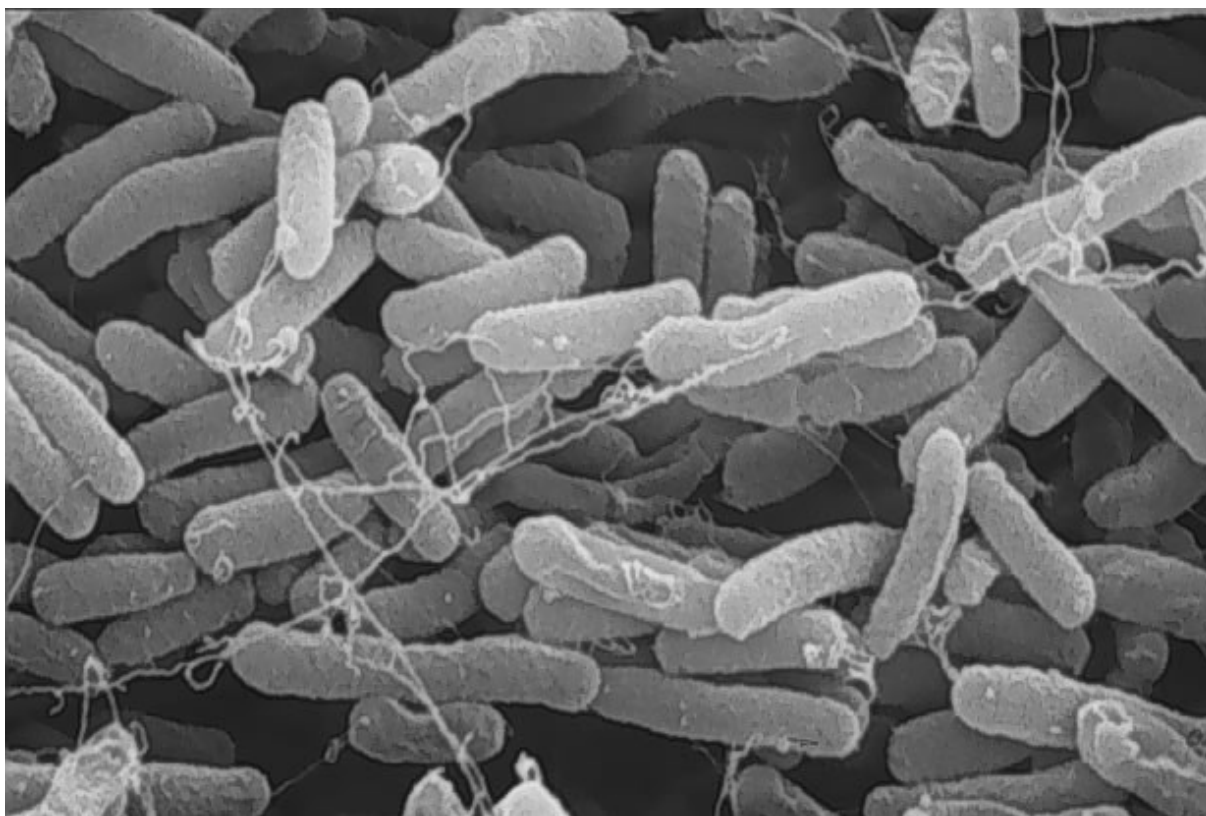
Obrázek 6: Redukce resazurinu a vratná redukce resorufinu [41]

Intracelulární prostor je pro redukci resazurinu vhodným médiem. Metabolismus resazurinu bakteriemi není přesně popsán, je ale jasné, že bakterie spotřebovávají kyslík volně vázaný na fenoxazinovém jádře molekuly resazurinu nejspíše za přítomnosti enzymů v mitochondriích. [40] Za předpokladu, že v reakční směsi nejsou přítomna jiná činidla, která by byla resazurin schopna redukovat, je množství resorufinu úměrné množství bakterií, které jsou schopny resazurin metabolizovat a zároveň přežít anaerobní podmínky po vyčerpání dostupného kyslíku.

2.4.2 Bakteriální kmen *Escherichia coli*

Bakterie druhu *E. coli* jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinkovité bakterie dlouhé kolem 2–3 μm . Netvoří spory a pohybují se za pomoci bičíků. Přirozeně se vyskytují ve střevech teplokrevných živočichů včetně člověka, kde tvoří součást střevní mikroflóry a produkují vitamin K a koliciny, látky toxické pro jiné druhy bakterií. Ačkoliv je přítomnost a přiměřené množení *E. coli* ve střevě prospěšné, nadměrný růst kolonií je původcem mnoha druhů průjmových onemocnění a infekcí močového traktu. K léčbě infekcí *E. coli* se používají beta-laktamová antibiotika, jako jsou např. peniciliny a cefalosporiny, ale vzhledem k rostoucí rezistenci bakterií vůči léčbě antibiotiky se léčba infekcí s mírným průběhem v poslední době provádí spíše symptomaticky. [42]

E. coli je dobře prozkoumaný druh nenáročný na kultivaci, který je možné pěstovat na široké škále substrátů *in vitro*. Díky jednoduchosti kultivace jsou bakterie tohoto druhu využívány nejen pro biochemické aplikace, ale např. i pro účely genového inženýrství. Jelikož jsou fakultativně anaerobní, dokážou pro tvorbu energie využívat kyslík v živném médiu (aerobní respirace) nebo sacharidy v případě, kdy kyslík v médiu dojde (fermentace). Bakterie tohoto druhu jsou schopny tolerovat široký rozsah teplot, mezi 4 a 53 $^{\circ}\text{C}$, ale nejlépe rostou při teplotě kolem 37 $^{\circ}\text{C}$. Optimální pH substrátu pro růst *E. coli* je 7,0. [42][43]



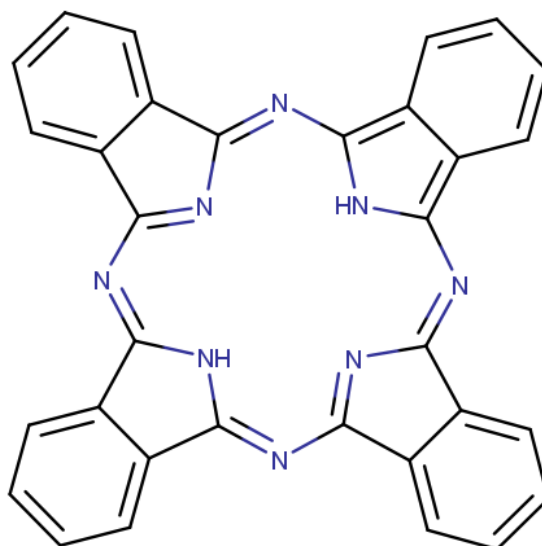
Obrázek 7: Bakterie *E. coli* pod skenovací elektronovým mikroskopem [44]

2.4.3 Antibakteriální folie

Pro účely tohoto experimentu byly použity PVC (polyvinylchloridové) folie. Na tyto folie byla nanášena antibakteriální vrstva, jako referenční vzorky byly použity tytéž folie, ale bez vrstvy. Formulace antibakteriální vrstvy pro účely tohoto experimentu obsahuje ftalocyaninový fotosenzibilizátor a pyrithion zinku.

2.4.3.1 Ftalocyanin a sloučeniny jej obsahující

Ftalocyanin (sumární vzorec $C_{32}H_{18}N_8$, CAS 574-93-6, molární hmotnost $514,55 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) je organická makrocyclická látka příbuzná tetrapyrrolovým barvivům. [45] Skládá se ze čtyř isoindolových jednotek, mezi kterými jsou můstky tvořené atomy dusíku. Podobně jako tomu je u tetrapyrrolových barviv, atomy dusíku v isoindolové jednotce jsou schopny vázat koordinačně-kovalentní vazbou atomy kovů (např. Cu, Fe nebo Zn) a několikaatomové jednotky (např. vanadyl). Mimo výzkum se tyto sloučeniny používají jako mimořádně syté a stabilní pigmenty. [46][47]



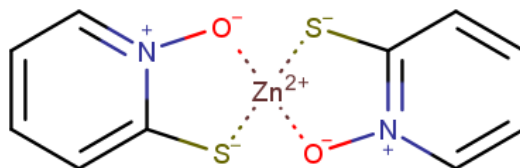
Obrázek 8: Struktura molekuly ftalocyaninu [46]

Ftalocyaninové sloučeniny jsou v kontextu tohoto experimentu využity jako tzv. fotosenzibilizátory. Molekula obsahující ftalocyaninovou jednotku absorbuje energii v podobě světla, čímž se převede do excitovaného stavu. Tuto energii poté předá molekule kyslíku, kterou tímto způsobem excituje a sama se konvertuje zpět do stavu základního. [48]

Vzniklá excitovaná forma molekuly kyslíku se označuje jako singletová a v literatuře se zapisuje jako $^1\text{O}_2$. Singletový kyslík se od běžnější tripletové formy ($^3\text{O}_2$) liší rozpoštěním elektronů v molekulových orbitalech a jejich spiny. Singletový kyslík patří do skupiny reaktivních kyslíkových částic (ROS, reactive oxygen species), které jsou schopny vyvolat redoxní reakce, do kterých se tripletový kyslík zapojit nemůže. Podstatné jsou především reakce singletového kyslíku s biomakromolekulami, na které ROS působí destruktivně. [48][49]

2.4.3.2 Pyrithion zinku

Pyrithion zinku (sumární vzorec $C_{10}H_8N_2O_2S_2Zn$, CAS 13463-41-7, molární hmotnost $317,70 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) [50] je látka s bakteriostatickým účinkem, což znamená že zastavuje množení bakterií. Skládá se z dvojmocného atomu zinku navázaného na dvě jednotky pyrithionu a za standardních podmínek se vyskytuje v podobě dimeru. Běžně se používá jako součást přípravků proti lupům a kožní dermatidě, nebo jako součást venkovních nátěrů. Bakteriostatický účinek pyrithionu zinku spočívá v inhibici membránových procesů, což způsobuje zpomalení metabolických drah. [51][52]



Obrázek 9: Struktura monomerního pyrithionu zinku [52]

3 CÍL PRÁCE

Prvním cílem této práce bylo studium zdrojů týkajících se barvicích postupů v současné mikrobiologické praxi a norem stanovujících kontaktní podmínky pro stanovení antibakteriální aktivity a uplatnění získaných poznatků na testování antimikrobiálních vrstev modifikovanou resazurinovou metodou v části praktické.

Druhým cílem byla optimalizace resazurinové metody pro vyhodnocování antimikrobiálního účinku tří folií s baktericidní vrstvou – folií D0, D50 a D200. Tyto folie obsahují jak ftalocyaninový fotosenzibilizátor, tak různá množství pyriithionu zinku. Antibakteriální aktivita je v světelných i temnostních podmínkách na tomto množství závislá. Pro získání dat byla vybrána metoda sestavení kalibrační křivky prostřednictvím fotografického záznamu a následné obrazové analýzy vzorků obsahujících resazurin. Tato kalibrační křivka byla následně aplikována na záznam vzorků exponovaných foliím. Antibakteriální folie byly použity pro dva druhy experimentů – imerzní experiment a time-kill experiment. Získaná data byla posléze použita pro návrh, jak tuto zvolenou metodu optimalizovat.

Třetím cílem práce bylo srovnání navržené metodiky se zavedenými postupy. V porovnání s normovanými postupy je resazurinová metoda rychlejší a snadnější na provedení. Resazurinové rychlotesty jsou v současnosti používány na stanovení mikrobiální populace v mléce.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Příprava použitých látek

4.1.1 Příprava bakteriální suspenze

Bakteriální vzorky byly kultivovány v předem připraveném tekutém živném médiu. Použitým typem živného média je suspenze peptonového hydrolyzátu (peptonu) v destilované vodě. 25 g 1% peptonu bylo suspendováno v 1 000 ml destilované vody. Suspenze byla zahřívána do rozpuštění peptonu a rozdělena do 50ml Erlenmeyerových baněk. Baňky byly uzavřeny a sterilizovány v autoklávu. Podobným způsobem byla připravena suspenze peptonu pro výživu bakterií při probíhání experimentu, jediným rozdílem je koncentrace, která musí být 10x vyšší.

Po sterilizaci a ochlazení je živné médium připraveno na inokulaci bakterií. Médium v jedné baňce bylo zahřáto na teplotu kolem 37 °C. Očko z platinového drátu bylo nažhaveno nad kahanem. Z nádoby obsahující bakteriální vzorky v podobě želatinového disku byl pomocí rozžhaveného očka odebrán jeden disk a umístěn do živného média. Takto připravená bakteriální suspenze byla uzavřena a umístěna do termostatu nastaveného na 37 °C na dobu 24 hodin.

4.1.2 Příprava roztoku PBS

PBS (phosphate buffered saline) je pufr, který byl použit pro stabilizaci pH bakteriálních vzorků. Do odměrné baňky o objemu 1 000 ml bylo přidáno 800 ml destilované vody a následující chemikálie:

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,44 g Na₂HPO₄
- 0,245 g KH₂PO₄

Odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku, všechny soli byly rozpuštěny a roztok byl nadávkován do uzavíratelných lahví o objemu 200 ml. Tyto roztoky byly sterilizovány v autoklávu.

4.1.3 Příprava roztoku resazurinu

Do odměrné baňky o objemu 100 ml byl přidán resazurin, který byl rozpuštěn v destilované vodě. Navážka resazurinu je taková, aby měl výsledný zásobní roztok po desetinasobném zředění absorbancí 1,5 při měření UV-Vis spektrometrem při vlnové délce 600 nm.

4.2 Popis použitých aparatur

4.2.1 Aparatura pro časoběrný záznam

Experiment byl za dobu vypracování této práce realizován na dvou typech aparatury pro časoběrný záznam. Obě tyto aparatury využívají fotoaparát pro záznam snímků, liší se ale v konstrukci prvku udržujícího teplotu fotografovaných vzorků. První typ byl složen z topné desky doplněné tmavou neprůhlednou přepážkou. Na okraje topné desky byly umístěny dva

pásy s 12 zelenými LED tak, aby každý byl na jedné straně zatemňující přepážky. Každá LED je umístěna ve středu kruhové prohlubně přesně odpovídající průměru použitých vialek.



Obrázek 10: První typ zahřívacího prvku

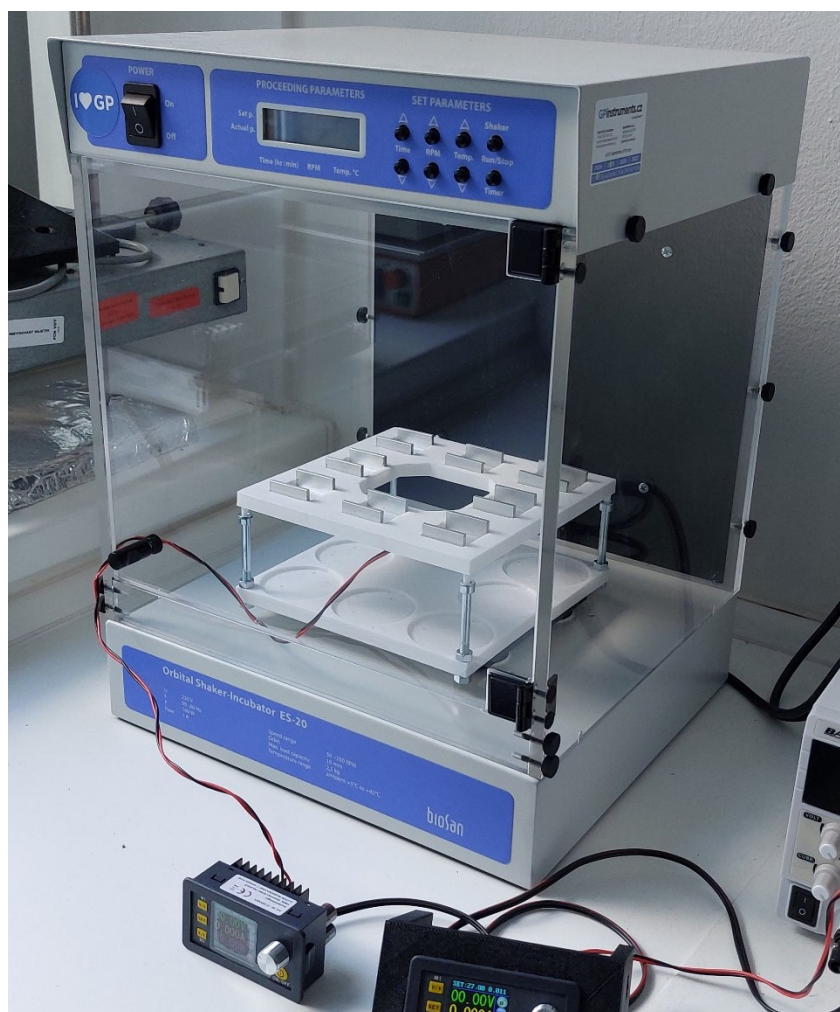
Nevýhodou prvního typu zahřívacího prvku byl nežádoucí únik tepla do okolí, což vedlo k vývoji druhého, pokročilejšího typu. Ten byl složen z umělohmotného boxu s dvěma připojenými držáky na LED pásy a termoregulačním prvkem na vnitřní straně. Tento typ byl také doplněn čirým umělohmotným uzávěrem, který bránil úniku tepla. Fotografování vzorků bylo prováděno přes tento průhledný uzávěr.



Obrázek 11: Druhý typ zahřívacího prvku

4.2.2 Reaktor pro imerzní experimenty

Pro imerzní experimenty bylo zapotřebí zajistit neustálý kontakt ponořené folie s bakteriální suspenzí za trvalého osvětlení, byl pro to tedy vybrán uzavíratelný třepač, na který byly nainstalovány zvlášť zhotovené součásti vytvořené 3D tiskem. První část obsahuje 8 prohlubní, každá určená na jednu Petriho misku o průměru 5 cm, a jednu polovinu nosných prvků v každém rohu. Na tuto část dosedá snímatelný nosič 8 diod, které jsou umístěny nad střed každé prohlubně. Výsledkem je rovnoměrné osvětlení každého třepaného vzorku, které bylo nastaveno na hodnotu 1 klx pro všechny imerzní experimenty. Pro vzorky pro třepání ve tmě nebylo nutné třepač speciálně modifikovat, byl tedy ponechán s původním nosným prvkem, pro zajištění temnoty byly průhledné části třepače pouze překryty neprůhlednou zatemňovací tkaninou.



Obrázek 12: Reaktor pro imerzní experimenty

4.3 Realizace vybraných experimentů

4.3.1 Sestavení kalibrační křivky

Bakteriální kultura v živném médiu byla po kultivaci distribuována do šesti centrifugačních zkumavek a odstředěna. Centrifugace probíhala 10 minut při 3 000 otáčkách za minutu. Supernatant byl vylit do odpadní lahve a bakteriální sediment ve zkumavkách byl suspendován v přibližně 5 ml PBS, přičemž část, která ulpěla na zdech zkumavky byla seškrábnuta kovovou špachtlí. Špachtle byla také použita k homogenizaci bakteriální suspenze, která byla poté nalita do kádinky o objemu 250 ml. Stejný postup byl opakován pro zbylé centrifugované preparáty.

V mezičase byla připravena aparatura na fotografický záznam vzorků. Stativ byl umístěn tak, aby byl fotoaparát schopen zachytit všechny vzorky na tmném pozadí a přitom zachytil co nejméně okolí aparatury. Byl zapnut topný prvek, udržující konstantní teplotu kolem 37 °C, a excitační LED podsvěčující vzorky.

UV-Vis spektrometr byl kalibrován na roztok PBS v plastové kyvetě při nastavené vlnové délce 600 nm. Do této kyvety byla poté nadávkována bakteriální suspenze, jejíž absorbance byla změřena. Počáteční absorbance této suspenze byla většinou větší než 1, do kádinky se suspenzí bylo tedy potřeba postupně přidávat roztok PBS tak, aby se absorbance bakteriální

suspenze co nejvíce blížila hodnotě 0,6. Hodnota 0,6 odpovídá koncentraci $4,8 \cdot 10^8$ CFU·ml⁻¹, kde CFU (colony forming units) je jednotka vyjadřující množství životaschopných bakterií. Pro nej přesnější přiblížení k této hodnotě byla absorbance měřena po každém přidavku PBS do bakteriální suspenze.

Po přípravě bakteriální suspenze byl UV-Vis spektrometr kalibrován na destilovanou vodu v plastové kyvetě. Prostřednictvím odměrného válce bylo připraveno 10 ml 10x zředěného roztoku resazurinu, jehož absorbance byla poté ověřována. Vyhovující je, aby měl takto zředěný roztok resazurinu stále absorbanci kolem 1,5 při měření při vlnové délce 600 nm.

Bylo připraveno 10 uzavíratelných plastových vialek na dvojkové ředění bakteriální suspenze. Do každé bylo mechanickou pipetou nadávkovány 3 ml roztoku PBS. Do první vialky byly pipetovány 3 ml suspenze, vialka byla uzavřena a protřepána. Do druhé vialky byly pipetovány 3 ml suspenze z první vialky. Tento postup byl opakován až do poslední připravené vialky, která odpovídá ředění 1/1024, což odpovídá koncentraci $4,69 \cdot 10^5$ CFU·ml⁻¹.

Bylo připraveno dalších 12 uzavíratelných vialek pro sestavení řady pro záznam. Do první bylo pipetováno 1,6 ml PBS, do druhé 1,6 ml původní bakteriální suspenze z kádinky a do zbytku po 1,6 ml zředěných bakteriálních suspenzí z vialek. Do každé vialky z řady bylo poté pipetováno 200 µl suspenze peptonu pro výživu (10x koncentrovanější) a poté 200 µl zásobního roztoku resazurinu. Vialky s reakční směsí byly zafixovány do aparatury a fotoaparát byl zapnut v režimu časosběrného záznamu. Záznam byl spuštěn na 1 snímek za minutu po dobu 800 minut.

Měření pro sestavení kalibrační křivky je pro statistické účely nutno provést několikrát. Kalibrační křivka byla provedena opakovaně pro dvojkové a opakovaně pro čtyřkové ředění. To se od dvojkového liší v ředění prvotních vialek – na počátku je pipetováno 4,5 ml PBS do každé vialky a poté se opakovaně pipetuje 1,5 ml předchozího roztoku.

4.3.2 Sestavení imerzního experimentu

Folie pro účely tohoto experimentu mají na jedné straně vrstvu fotoaktivní látky s různými přidavky baktericidní látky pyrithionu zinku – obsah pyrithionu zinku je 0, 50, nebo 200 mg na 1 kg sušiny nátěru. Pro podrobný popis látek obsažených v baktericidním nátěru vizte kapitolu 2.4.3. Mimo to jsou k dispozici i folie bez vrstvy, které slouží jako blank. Role těchto folií byly nařezány do archů o přibližném formátu A4. Do těchto archů jsou laserovým řezacím strojem vyřezány kruhy o průměru 5 cm. Tyto kruhy byly umístěny do plastových Petriho misek tak, aby fotoaktivní vrstva byla nahoře a dala se na ni nanést bakteriální suspenze.

Bakteriální kultura je po 24 h kultivace centrifugována a ředěna roztokem PBS do výsledné koncentrace $4,8 \cdot 10^8$ CFU·ml⁻¹. Poté je tato výchozí koncentrace naředěna na pracovní koncentraci 1/100 ($4,8 \cdot 10^6$ CFU·ml⁻¹).

Bylo připraveno 8 Petriho misek s folií bez vrstvy (blankem) a 8 Petriho misek s folií s vrstvou. Na tyto folie bylo nanášeno 6 ml připravené zředěné bakteriální suspenze, Petriho misky byly uzavřeny a umístěny do reaktorů tak, aby v osvětleném i zatemněném byly 4 misky s blankem a 4 misky s folií s vrstvou. Reaktory byly uvedeny do chodu při 110 RPM (otáčkách

za minutu), experiment probíhal za stálého míchání po dobu 4 hodin. V mezičase byla ověřena absorbance zásobního roztoku resazurinu stejným způsobem, jako v předešlé kapitole.

Po uplynutí reakční doby bylo z každé Petriho misky odebráno 1,6 ml vzorku do vialky a přidáno 200 μ l 10x koncentrovanější suspenze peptonu a 200 μ l zásobního roztoku resazurinu, podobně, jako při sestavení kalibrační křivky. Pro porovnání je možné vedle vzorků z Petriho misek připravit i vzorek z PBS a vzorek ze zředěné suspenze. Vzorky byly zafixovány do předem připravené zaznamenávací aparatury a fotoaparát nastaven na časosběrný záznam.

4.3.3 Sestavení time-kill experimentu

V mnohých aspektech přípravy se time-kill experiment podobá imerznímu experimentu popsanému v předešlé kapitole. Bakteriální kultura byla opět centrifugována, suspendována v PBS, ředěna tímtež do výsledné koncentrace $4,8 \cdot 10^8$ CFU \cdot ml $^{-1}$ a opět naředěna na pracovní koncentraci 1/100. Byly připraveny Petriho misky s blankem a s folií s vrstvou. Do všech misek bylo napipetováno 6 ml pracovní suspenze na plochu folie. Aparatura pro záznam byla opět připravena se stejným nastavením jako v předešlých kapitolách.

Na rozdíl od předchozího experimentu byly všechny misky se vzorky umístěny buď do osvětleného, nebo do zatměného reaktoru. Reaktor s miskami byl zapnut se 110 RPM. V mezičase byl připraven kontrolní vzorek, obsahující 1,6 ml pracovní suspenze, 200 μ l 10x koncentrovanější suspenze peptonu a 200 μ l zásobního roztoku resazurinu. Kontrolní vzorek byl zafixován do aparatury a na fotoaparátu byl spuštěn časosběrný záznam – 800 fotografií s frekvencí jedna fotka za 2 minuty.

Po hodině bylo třepání v reaktoru přerušeno a část blankových misek i misek s folií byla odebrána z reaktoru, načež bylo třepání opět spuštěno. Z odebraných misek byly zhotoveny vzorky na časosběrný záznam, opět obsahující 1,6 ml bakteriální suspenze, 200 μ l koncentrovaného peptonu a 200 μ l roztoku resazurinu. Odebrané misky se zbytkem suspenze byly položeny stranou. Vzorky ve vialkách byly umístěny do aparatury v průběhu snímání. Tento postup byl opakován i ve druhé, třetí a čtvrté hodině třepání misek se suspenzí.

Podrobnosti sestavení time-kill experimentu byly často pozměňovány a to především z důvodu časové náročnosti jejich přípravy a omezení z kapacitního hlediska. Pokusy o optimalizaci tedy vedly k obměně, při které bylo na začátku experimentu nanášeno větší množství suspenze na každou folii s tím, že se vzorky z aparatury nevyjmulý natrvalo, ale byly do ní po odebrání zpět navraceny. Diskuze s ohledem na tyto změny bude vedena v kapitole 5.3.4.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Metodologie vyhodnocení časosběrného záznamu

Výstupem z každého experimentu je soubor fotografií. Pro zpracování tohoto souboru byl zvolen program ImageJ, který masové zpracování fotografií umožňuje. Po nahrání bylo prvním krokem rozdělení na barevné kanály. Při tomto měření je v modrém kanálu jakákoliv aktivita zanedbatelná a zelený kanál představuje světlo z excitační diody, tyto kanály byly teda zavřeny. V červeném kanálu byla vybrána část záznamu prosvícená diodou a prostřednictvím nabízených funkcí obrazového zpracování byla získána numerická data. Ta byla v prostředí programu Excel interpretována jako závislost intenzity fluorescence na čase a byly z nich vybrány vhodné body pro sestavení výsledků. Pro eliminaci chyby způsobené pozorovatelem byly tyto body získány prostřednictvím funkcí programu Excel.

Data z programu Excel jsou prvně upravena klouzavým průměrováním, což eliminuje nežádoucí výkyvy způsobené přerušováním funkce vytápěcího prvku. Následně jsou normalizována, tj. vydělena maximální hodnotou tak, aby výsledná data byla v rozmezí mezi 0 a 1. Za pomoci rovnice pro tečnou přímkou, tj.

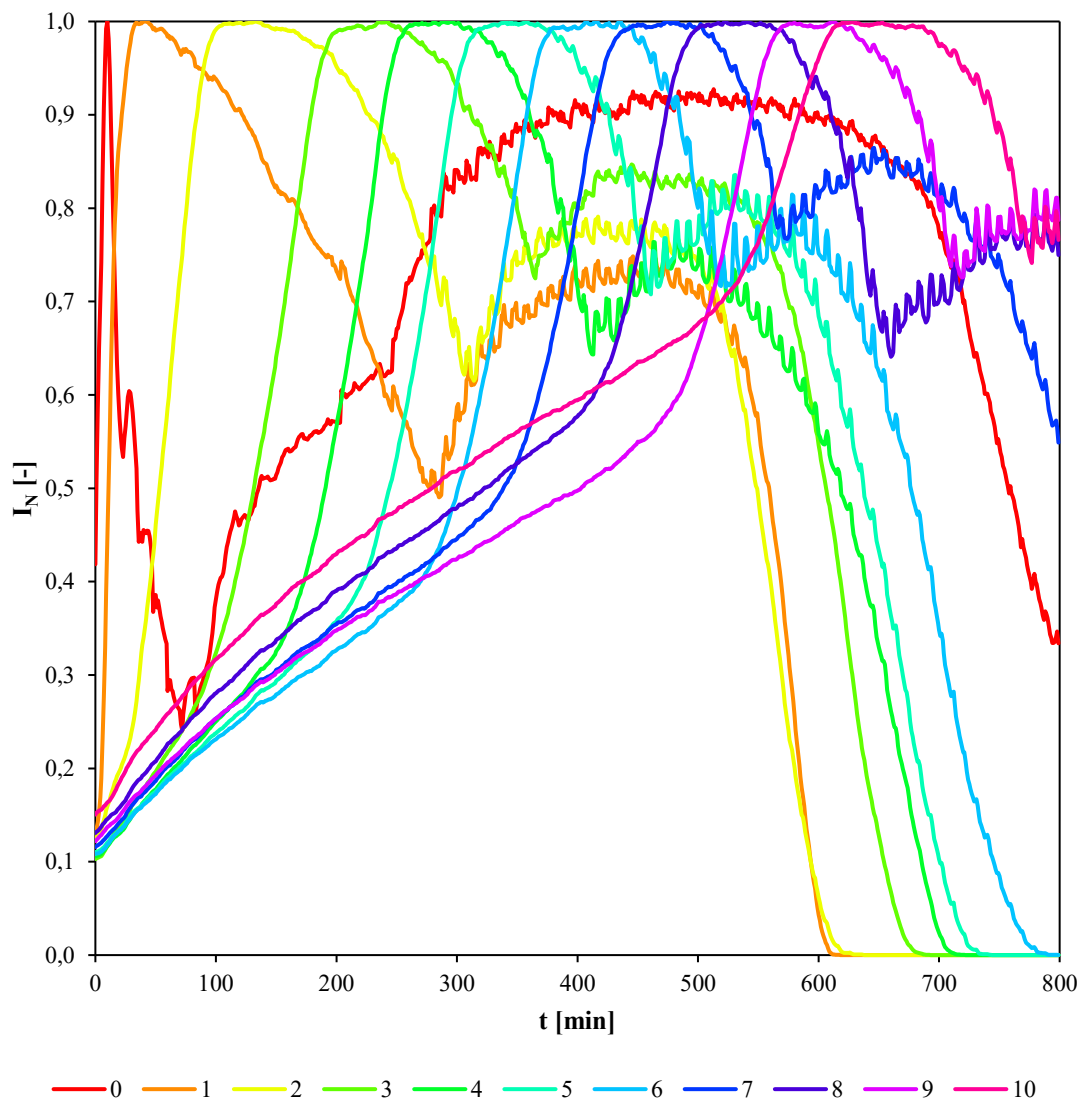
$$I_N = k \cdot t + q \quad (1)$$

kde k je experimentálně stanovený parametr, lze každému času t přiřadit hodnotu q , zjistit maximální hodnotu tohoto parametru a čas, který jí náleží, označit jako čas hledaného maxima. Hodnota k je směrnice tečné přímky v tomto maximu a pro účely vyhodnocení experimentů byla její hodnota určena jako $5 \cdot 10^{-4}$. Pokud je hodnota k nulová, lze touto funkcí nalézt globální maximum.

5.2 Kalibrační křivka

Postup pro získání dat pro kalibrační křivku je popsán v kapitole 4.3.1. Po výše uvedeném zpracování byly získány křivky z Obrázku 13. Popisky datových řad byly voleny tak, aby odpovídaly počtu ředění, např. popisek 1 odpovídá jednomu ředění. V každé závislosti byl vybrán první bod, kdy se hodnota intenzity blíží maximu a odečten čas, který této hodnotě náleží. Výsledky pro použité čtyřkové ředění jsou uvedeny v Tabulce 2. Logaritmus bakteriální koncentrace $\log(c)$ pro čtyřkové ředění byl získán z následujícího vztahu, kde n je počet ředění:

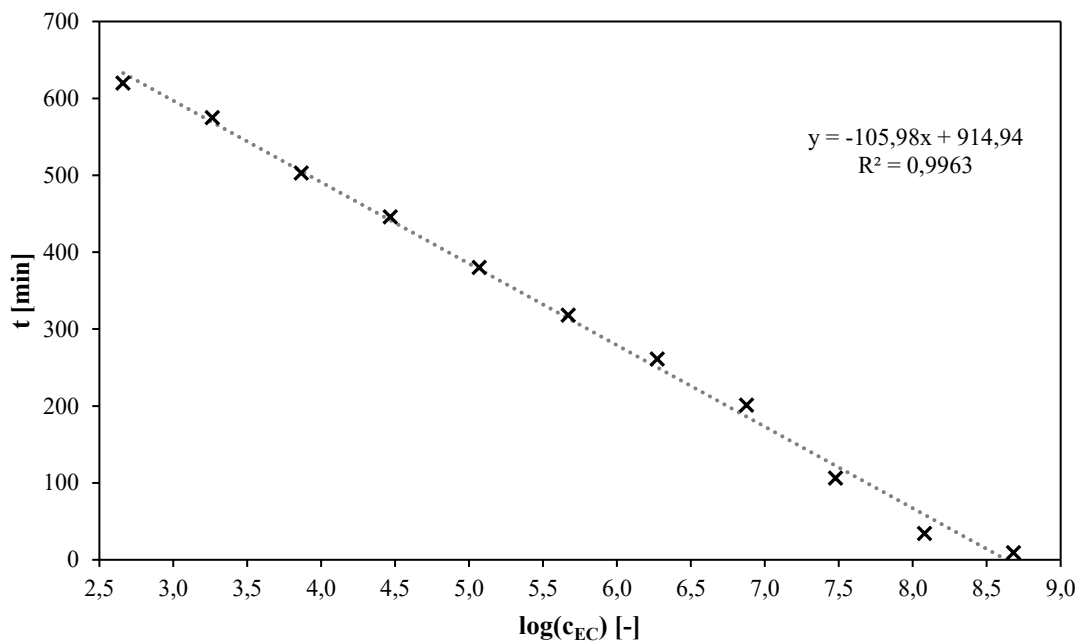
$$\log(c) = \log\left(\frac{4,8 \cdot 10^8}{4^n}\right) \quad (2)$$



Obrázek 13: Závislosti normalizované intenzity fluorescence na čase všech řad kalibrace

Tabulka 1: Hodnoty pro kalibraci – počet ředění, bakteriální koncentrace a zjištěný čas

n [-]	c_{EC} [CFU·ml ⁻¹]	$\log(c_{EC})$ [-]	t [min]
0	480 000 000	8,681	9
1	120 000 000	8,079	34
2	30 000 000	7,477	106
3	7 500 000	6,875	201
4	1 875 000	6,273	261
5	468 750	5,671	318
6	117 188	5,069	380
7	29 297	4,467	446
8	7 324	3,865	503
9	1 831	3,263	575
10	458	2,661	620



Obrázek 14: Kalibrační křivka – získaná závislost času na logaritmu koncentrace

Tabulka 2: Parametry lineární regrese kalibrační křivky

$a [min]$	-105,985	914,945	$b [min]$
$\Delta a [min]$	2,154	12,885	$\Delta b [min]$
koeficient determinace R^2 [%]		99,630	

5.3 Výsledky imerzních experimentů

Zpracování fotografií získaných imerzním experimentem (pro postup vizte kapitolu 4.3.2) je obdobné jako při sestavení kalibrační křivky. Každý imerzní experiment ústí ve čtyři sady dat, odpovídajících blanku ve tmě (B_D), blanku na světle (B_L), aktivnímu povrchu ve tmě (C_D) a aktivnímu povrchu na světle (C_L). Pro každou křivku byl opět vybrán bod v maximu intenzity a zaznamenán odpovídající čas podle metodologie z kapitoly 5.1. Získaná kalibrační křivka z kapitoly 5.2 byla na tyto hodnoty aplikována, což vede ke stanovení hodnoty $\log(c)$. K posouzení antibakteriální aktivity folií pak slouží kritérium ΔR :

$$\Delta R = R_L - R_D = \log\left(\frac{c_{B_L}}{c_{C_L}}\right) - \log\left(\frac{c_{B_D}}{c_{C_D}}\right) \quad (3)$$

Jestliže je jeden z dílčích logaritmů záporný, místo skutečné hodnoty je jeho hodnota považována za nulovou, záporná hodnota byla totiž způsobena velkými odchylkami některého z dílčích parametrů.

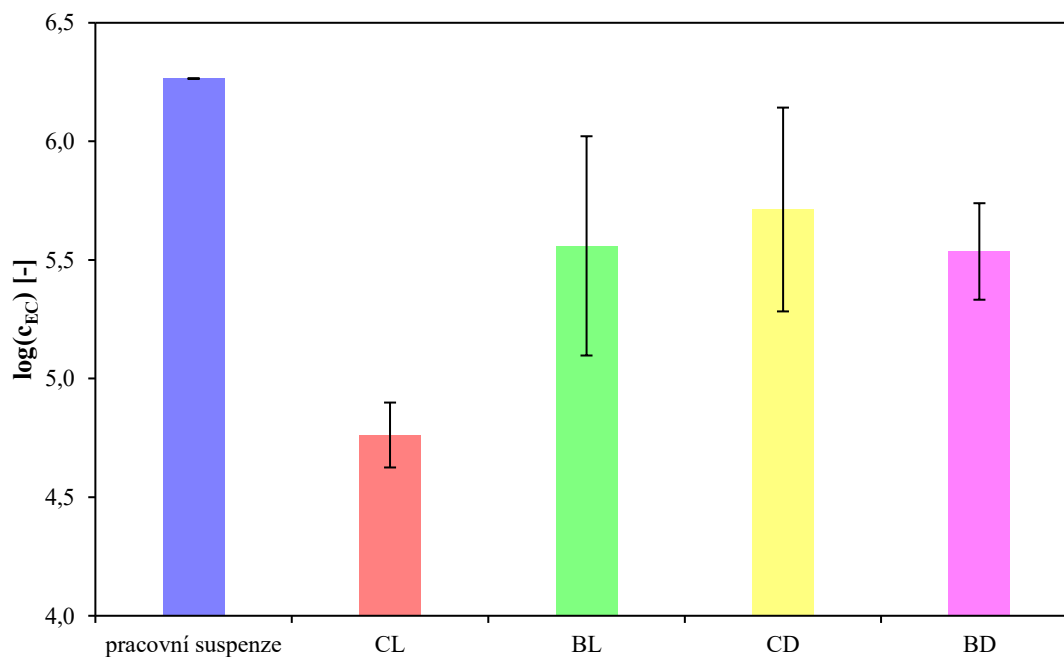
Imerzní experimenty jsou pro přehlednost rozděleny podle čísla použité aktivní folie. Jak bylo zmíněno v kapitole 4.3.2, byly použity tři typy folie s aktivní vrstvou – D0, D50 a D200.

5.3.1 Folie D0

Folie D0 obsahuje 0 mg ZnPyr na 1 kg sušiny. Obsahuje tedy jen ftalocyaninový fotosenzibilizátor, který působí baktericidně pouze na světle.

Tabulka 3: Vypočítané hodnoty pro folii č. 11 se stanovením antibakteriální aktivity ΔR

typ	č. vzorku	t [min]	$\log(c_{EC})$ [-]	$c_{EC} \cdot 10^5$ [CFU·ml ⁻¹]	průměr		
prac. suspenze	výpočtem	—	6,681	48,00			
	stanovená	251	6,265	18,40			
C_L	1	403	4,831	0,68	4,762	0,80	R_L
	2	403	4,831	0,68			
	3	432	4,557	0,36			
	4	403	4,831	0,68			
B_L	1	287	5,925	8,42	5,559		
	2	364	5,199	1,58			
	3	280	5,991	9,80			
	4	372	5,123	1,33			
C_D	1	248	6,293	19,64	5,713	-0,18	R_D
	2	302	5,784	6,07			
	3	344	5,387	2,44			
	4	344	5,387	2,44			
B_D	1	299	5,812	6,48	5,536		
	2	344	5,387	2,44			
	3	325	5,567	3,69			
	4	345	5,378	2,39			
						0,80	ΔR



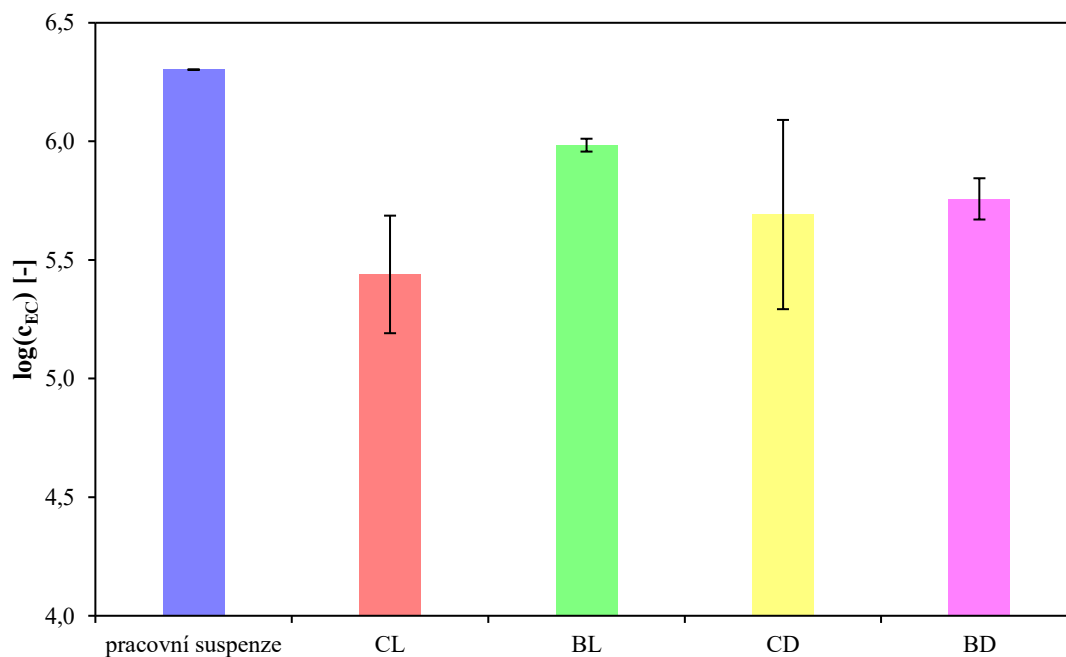
Obrázek 15: Vizualizace dat pro folii D0

5.3.2 Folie D50

Folie D50 obsahuje 50 mg ZnPyr na 1 kg sušiny. Díky menšímu množství této biocidní složky byl předpokládán určitý pokles živých buněk i ve tmě.

Tabulka 4: Vypočítané hodnoty pro folii č. 17 se stanovením antibakteriální aktivity ΔR

typ	č. vzorku	t [min]	$\log(c_{EC})$ [-]	$c_{EC} \cdot 10^5$ [CFU·ml ⁻¹]	průměr		
prac. suspenze	výpočtem	—	6,681	48,00			
	stanovená	247	6,303	20,07			
C_L	1	354	5,293	1,96	5,439	0,54	R_L
	2	364	5,199	1,58			
	3	331	5,510	3,24			
	4	305	5,755	5,69			
B_L	1	280	5,991	9,80	5,984		
	2	285	5,944	8,79			
	3	279	6,001	10,01			
	4	279	6,001	10,01			
C_D	1	355	5,283	1,92	5,692	0,07	R_D
	2	339	5,434	2,72			
	3	288	5,916	8,23			
	4	265	6,133	13,57			
B_D	1	307	5,736	5,45	5,758		
	2	292	5,878	7,55			
	3	314	5,670	4,68			
	4	306	5,746	5,57			
						0,48	ΔR



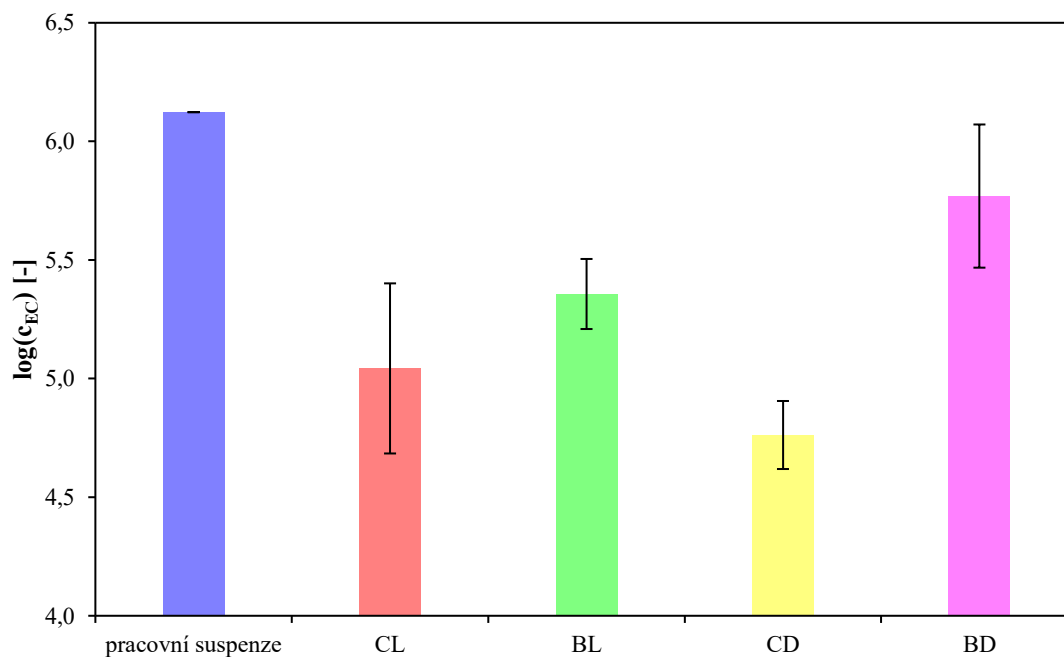
Obrázek 16: Vizualizace dat pro folii D50

5.3.3 Folie D200

Folie D200 obsahuje 200 mg ZnPyr na 1 kg sušiny. Obsahuje největší množství biocidní složky působící i ve tmě, což vede k pozorování poklesu živých buněk i v zatemněných vzorcích.

Tabulka 5: Vypočítané hodnoty pro folii č. 14 se stanovením antibakteriální aktivity ΔR

typ	č. vzorku	t [min]	$\log(c_{EC})$ [-]	$c_{EC} \cdot 10^5$ [CFU·ml ⁻¹]	průměr		
prac. suspenze	výpočtem	—	6,681	48,00			
	stanovená	266	6,123	13,28			
C_L	1	346	5,368	2,34	5,043	0,31	R_L
	2	356	5,274	1,88			
	3	390	4,953	0,90			
	4	430	4,576	0,38			
B_L	1	357	5,265	1,84	5,357		
	2	324	5,576	3,77			
	3	356	5,274	1,88			
	4	352	5,312	2,05			
C_D	1	417	4,698	0,50	4,762	1,01	R_D
	2	428	4,595	0,39			
	3	394	4,915	0,82			
	4	402	4,840	0,69			
B_D	1	286	5,935	8,60	5,769		
	2	319	5,623	4,20			
	3	269	6,095	12,44			
	4	340	5,425	2,66			
						-0,69	ΔR

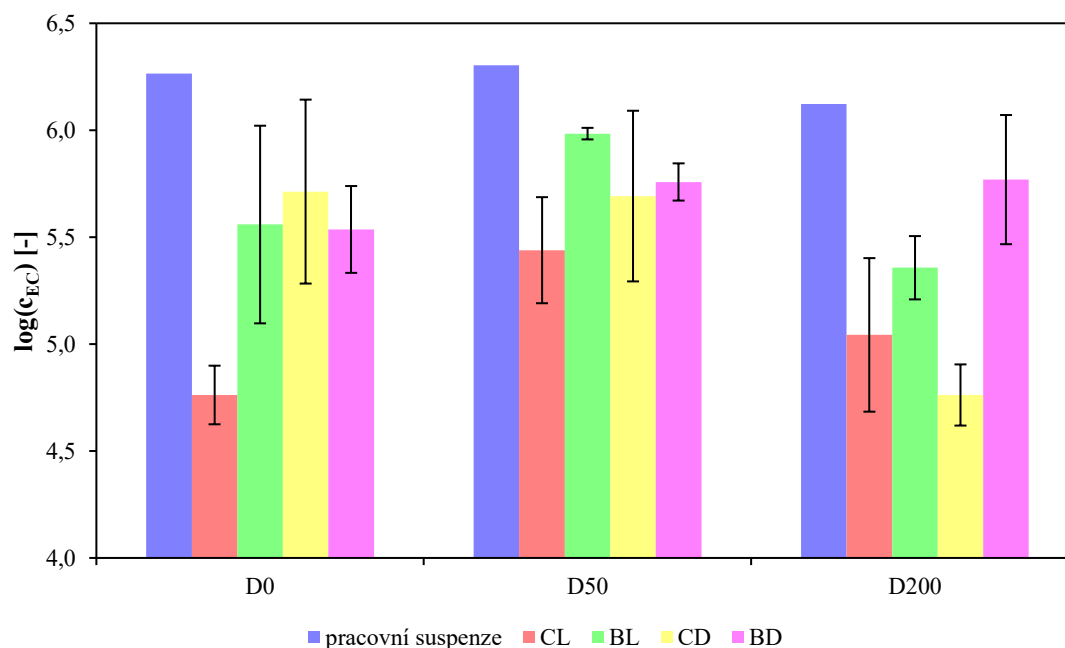


Obrázek 17: Vizualizace dat pro folii D200

5.3.4 Souhrn výsledků imerzních experimentů

Tabulka 6: Souhrnná tabulka pro všechny použité folie

folie	$\log(c_{EC}) [-]$				
	pracovní suspenze	C_L	B_L	C_D	B_D
D0	6,265	4,762	5,559	5,713	5,536
D50	6,303	5,439	5,984	5,692	5,758
D200	6,123	5,043	5,357	4,762	5,769



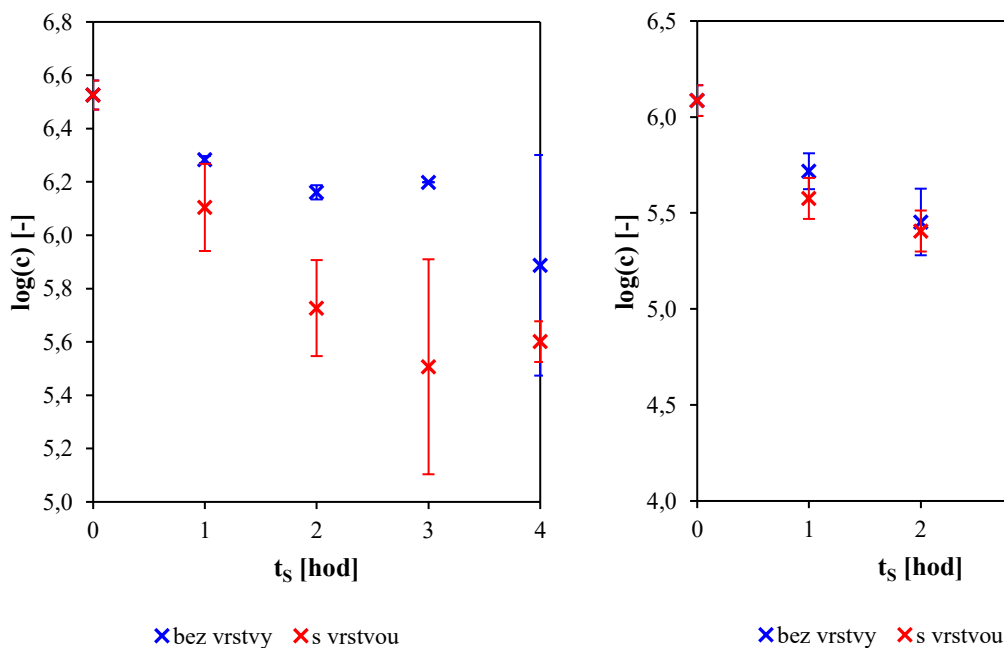
Obrázek 18: Souhrnná vizualizace pro všechny použité folie

V Tabulce 6 a na Obrázku 18 lze pozorovat především pokles všech bakteriálních populací, a to i těch vystavených blankovým foliím. Tento pokles by měl být minimální, informuje totiž o poklesu bakteriální populace vlivem okolního prostředí a ne vlivem antibakteriální folie. Důvodem tohoto poklesu je neoptimální nastavení parametrů experimentu, jako je např. délka pobytu bakteriální populace v reaktoru. Optimalizace délky expozice probíhá prostřednictvím time-kill závislostí, ty jsou dále popsány v kapitole 5.4.

Při experimentu s folií D0 byl zaznamenán určitý pokles bakteriální populace vystavené osvětlené folii s aktivní vrstvou (C_L), ostatní bakteriální populace jsou mezi sebou srovnatelné. Toto odpovídá očekávání, jelikož zde byl přítomen pouze fotokatalyzátor účinný pouze na světle. U experimentů s foliemi D50 a D200 byl zaznamenán navíc i pokles bakteriálních populací vystavených aktivní vrstvě v temnostních podmínkách (C_D), což lze atribuovat obsahu pyrrithionu zinku, který působí nezávisle na světelných podmínkách.

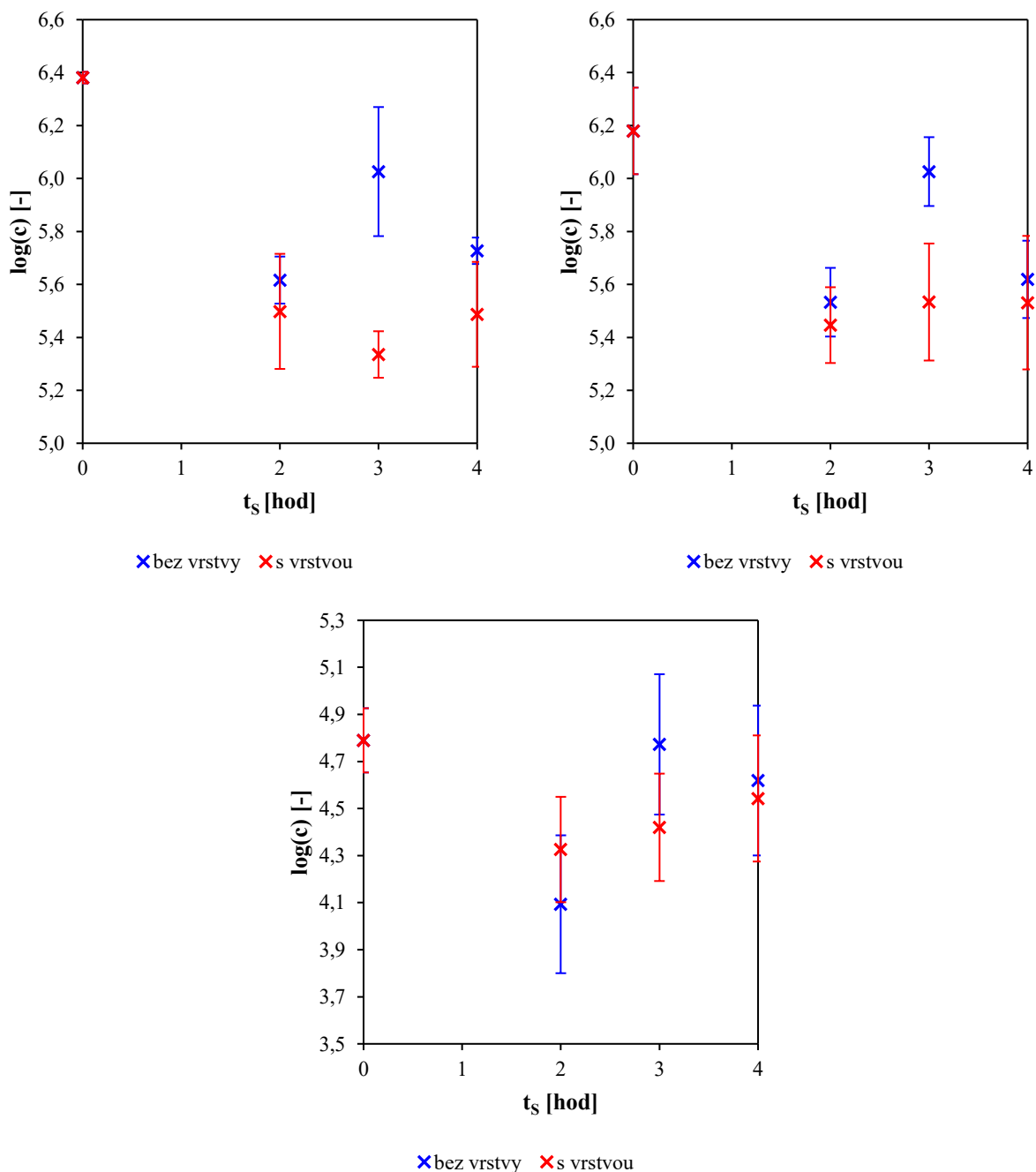
5.4 Výsledky time-kill experimentů

První time-kill experimenty byly vedeny za postupného odebrání vzorků z reaktoru, tak, jak bylo nastíněno v kapitole 4.3.3. Každá Petriho miska v reaktoru obsahovala 6 ml bakteriální suspenze na folii, ze které bylo odebráno 1,6 ml. Po odebrání byla miska vyřazena. Příklady získaných time-kill závislostí lze vidět na obrázcích níže. Time-kill závislost je závislost bakteriální koncentrace na době kontaktu bakteriální suspenze s aktivním povrchem.



Obrázek 19: Time-kill závislosti podle původního způsobu vypracování (vlevo na světle, vpravo ve tmě)

Tyto prvotní experimenty byly zatíženy malým množstvím zpracovaných vzorků každou hodinu. Experiment byl tedy obměněn tak, jak bylo nastíněno v kapitole 4.3.3, tj. zvýšením množství bakteriální suspenze v každé Petriho misce, postupným odebráním bakteriální suspenze a navrácením misky se zbytkem suspenze zpět do reaktoru. Vzhledem k maximální kapacitě aparatury pro záznam bylo také rozhodnuto neodebírat suspenzi v první hodině.



Obrázek 20: Time-kill závislosti obměněného způsobu

Na time-kill závislostech lze pozorovat pokles obou závislostí mezi 0 a 2 hodinami, po kterém následuje nárůst v případě referenční folie, zatímco koncentrace suspenze u folie s vrstvou zůstává víceméně konstantní. Autor práce se domnívá, že původní pokles bakteriální populace je způsoben náhlou změnou prostředí a následné množení bakterií je u folie s vrstvou kompenzováno jejím baktericidním účinkem. Bakteriální populace není tímto účinkem inhibována, tak se může dále množit. Pokles mezi třetí a čtvrtou hodinou autor odůvodňuje vyčerpáním látek umožňujících udržení stabilní bakteriální populace v suspenzi v Petriho miskách.

6 ZÁVĚR

Cíli této práce bylo vypracovat rešerši ohledně barvicích postupů v mikrobiologickém výzkumu a provést a optimalizovat modifikovanou resazurinovou metodu pro determinaci bakteriální populace. Pro stanovení množství bakterií v daném vzorku se v současnosti používají barvicí metody založené na přímém barvení životaschopných buněk nebo na vzniku metabolitu, který je možno detekovat kolorimetrickými metodami. Mezi metody, které přímo barví buňky patří např. barvení trypanovou modří nebo propidium jodidem – látkami, které buňka vstřebá a lze ji poté detekovat cytometrickými postupy. Metabolicko-kolorimetrické metody, jako je například metoda konverze tetrazoliových solí na formazany nebo resazurinová metoda, spočívají ve stanovení množství bakteriálního metabolitu původní látky prostřednictvím UV-Vis spektroskopie nebo fluorimetrie, intenzita získaného signálu je závislá na velikosti populace životaschopných buněk.

Resazurin je látka používaná již od počátku minulého století, a to pro testování kvality mléka. Resazurinová metoda spočívá v jeho konverzi na fluoreskující resorufin, která probíhá v intracelulárním prostoru bakterií a slouží tedy pro stanovení jejich množství. Resazurinová metoda ale není tak prozkoumaná jako normované postupy ASTM a ISO. Ve srovnání s normovanými postupy je ale resazurinová metoda rychlá, nenáročná a nedestruktivní, proto je její zkoumání středem zájmu této práce.

Modifikovaná resazurinová metoda byla využita pro posouzení antibakteriální aktivity folií s vrstvou obsahující ftalocyaninový fotosenzibilizátor a různá množství pyrithionu zinku vůči bakteriálním populacím druhu *Escherichia coli* v suspenzi. Konkrétně se jednalo o folie D0, D50 a D200, čísla v jejich označení indikují množství pyrithionu zinku v nich obsaženém. Nejprve byla sestavena kalibrační křivka, jejíž parametry byly posléze použity pro imerzní a time-kill experimenty. Data pro tyto experimenty byla získána fotografováním aparatury obsahující vialky s připravenými vzorky. Tyto vzorky se skládaly z bakteriální suspenze, peptonového hydrolyzátu pro udržení bakteriální populace a resazurinu pro redukci. Vzorky byly v aparatuře podsvíceny excitačním zářením, což vedlo k emisi vzniklého resorufinu, která byla fotograficky zachycena.

Pro sestavení kalibrační křivky bylo vybráno čtyřkové ředění místo dvojkového. Hlavním důvodem tohoto nahrazení je zjištěná skutečnost, že získaná závislost času na logaritmu koncentrace je lineární i při menších bakteriálních koncentracích. Získané parametry jsou zaznamenány v Tabulce 2, spolu s koeficientem determinace.

Výsledky imerzních experimentů jsou pro přehled zaznamenány v Tabulce 6. Hodnota C_D klesá v řadě D0 – D50 – D200, což je způsobeno vzrůstajícím množstvím obsaženého pyrithionu zinku. Pyrithion zinku je totiž jedinou působící antibakteriální složkou za těchto podmínek. Hodnota C_L nejvíce klesá u folie D0, kde je antibakteriální aktivita způsobena pouze ftalocyaninovým fotosenzitizátorem, u hodnoty C_L ostatních dvou folií nebyl tak velký pokles pozorován. Nesoulad mezi pozorovanými hodnotami C_L autor připisuje inhibičním interakcím mezi pyrithionem zinku a ftalocyaninem. U vzorků D50 byl dle normovaných postupů zaznamenán výsledek $\Delta R = 0,71$, výsledkem resazurinového testu je $\Delta R = 0,48$, jak lze vidět

v Tabulce 4. Rozdíl mezi těmito výsledky je menší než 0,3, což znamená, že tyto výsledky lze označit za „totožné“.

Z výsledků imerzního experimentu s foliemi obsahujícími obě složky není jistý příspěvek jedné či druhé složky na celkovou antibakteriální aktivitu. Nebylo totiž prozkoumáno, jestli pyrithion zinku má ve směsi s ftalocyaninem potenciační, či naopak inhibiční účinek v kontextu antibakteriální aktivity při různých podmínkách. Autor tedy navrhuje provedení většího množství experimentů s tímto druhem antibakteriálního nátěru pro determinaci vzájemných interakcí mezi pyrithionem zinku a ftalocyaniny.

Z výsledků time-kill experimentů autor usuzuje, že optimální dobou experimentu jsou dvě hodiny místo čtyř. Charakteristický tvar time-kill závislosti autor odůvodňuje fluktuací růstu a množení bakterií kvůli změnám v prostředí, ve kterém se bakterie vyskytují. Původně odhadovaný čas expozice v reaktoru je na základě těchto závislostí pravděpodobně zbytečně dlouhý. Při budoucím zkoumání antibakteriální aktivity těchto folií autor doporučuje přihlédnout k těmto výsledkům a změnit celkovou dobu experimentu.

Celkově je relevance resazurinových testů nezpochybnitelná. Resazurinové testy jsou časově nenáročné (doba vyhodnocení byla během optimalizací zkrácena z téměř 76 h na 24 h) a jednoduché na provedení. Při provedení resazurinových testů odpadá nutnost opětovné inkubace a chyby způsobené pozorovatelem lze omezit na minimum. Není pochyb, že se z resazurinového testu může po úplné optimalizaci stát efektivnější metoda než současné normované postupy.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] STROBER, Warren. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*. 2015, roč. 111, č. 1. ISSN 1934-3671.
<https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>.
- [2] TENNANT, Judith R. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*. 1964, roč. 2, č. 6, s. 685-694.
https://journals.lww.com/transplantjournal/abstract/1964/11000/evaluation_of_the_trypan_blue_technique_for.1.aspx
- [3] WAINWRIGHT, Milton. Dyes, trypanosomiasis and DNA: a historical and critical review. *Biotechnic & Histochemistry*. 2010, roč. 85, č. 6, s. 341-354. ISSN 1052-0295.
<https://doi.org/10.3109/10520290903297528>.
- [4] RAMIREZ, Christina Nicole; ANTCZAK, Christophe a DJABALLAH, Hakim. Cell viability assessment: toward content-rich platforms. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2010, roč. 5, č. 3, s. 223-233. ISSN 1746-0441.
<https://doi.org/10.1517/17460441003596685>.
- [5] *Spectrum [Propidium iodide]*. AAT Bioquest. 2023.
https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer/propidium_iodide.
- [6] *Spectrum [Ethidium Bromide]*. AAT Bioquest. 2023.
https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer/ethidium_bromide.
- [7] *SYTOX™ Green Nucleic Acid Stain - 5 mM Solution in DMSO*. ThermoFisher Scientific. 2023. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S7020>.
- [8] BENNETT, Hayley-Ann; MCADOREY, Alyssa a YAN, Hongbin. Staining Properties of Selected Commercial Fluorescent Dyes Toward B- and Z-DNA. *Journal of Fluorescence*. 2024, roč. 34, č. 3, s. 1193-1205. ISSN 1053-0509. <https://doi.org/10.1007/s10895-023-03343-8>.
- [9] LISS, Terry L.; MORAVEC, Richard A.; NILES, Andrew L.; DUELLMAN, Sarah; BENINK, Helene A. et al. Cell Viability Assays. In: *The Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013, 2016, s. 1-25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.
- [10] STOCKERT, Juan C.; HOROBIN, Richard W.; COLOMBO, Lucas L. a BLÁZQUEZ-CASTRO, Alfonso. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*. 2018, roč. 120, č. 3, s. 159-167. ISSN 00651281. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>.
- [11] LUIS, Carla; CASTAÑO-GUERRERO, Yuselis; SOARES, Raquel; SALES, Goreti a FERNANDES, Rúben. Avoiding the Interference of Doxorubicin with MTT

- Measurements on the MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Methods and Protocols*. 2019, roč. 2, č. 2. ISSN 2409-9279. <https://doi.org/10.3390/mps2020029>.
- [12] SIERACKI, Michael E.; CUCCI, Terry L. a NICINSKI, Justyna. Flow Cytometric Analysis of 5-Cyano-2,3-Ditoly Tetrzolium Chloride Activity of Marine Bacterioplankton in Dilution Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, roč. 65, č. 6, s. 2409-2417. ISSN 0099-2240. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2409-2417.1999>.
- [13] SCHAULE, G.; FLEMMING, H. C. a RIDGWAY, H. F. Use of 5-cyano-2,3-ditoly tetrzolium chloride for quantifying planktonic and sessile respiring bacteria in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993, roč. 59, č. 11, s. 3850-3857. ISSN 0099-2240. <https://doi.org/10.1128/aem.59.11.3850-3857.1993>.
- [14] ALAMOUDI, Widyan Ahmed; AHMAD, Faraz; ACHARYA, Sadanda; HAQUE, Shafiul; ALSAMMAN, Khaldoon et al. A simplified colorimetric method for rapid detection of cell viability and toxicity in adherent cell culture systems. *Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2018, roč. 23, č. 5, s. 1505-1513. <https://www.jbuon.com/archive/23-5-1505.pdf>.
- [15] TRIPATHI, Nishant a SAPRA, Amit. *Gram Staining*. National Library of Medicine - National Center for Biotechnology Information. StatPearls Publishing, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>.
- [16] GAVANJI, Shahin; BAKHTARI, Azizollah; FAMUREWA, Ademola C. a OTHMAN, Eman M. Cytotoxic Activity of Herbal Medicines as Assessed in Vitro: A Review. *Chemistry & Biodiversity*. 2023, roč. 20, č. 2. ISSN 1612-1872. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202201098>.
- [17] ELENGOE, Asita a HAMDAN, Salehuddin. Evaluation of Hyperthermia Effect on Cell Viability using Crystal Violet Staining, LDH and Trypan Blue Assays. *Advances in Environmental Biology*. 2014, roč. 8, č. 3, s. 744-747. https://www.researchgate.net/publication/288112129_Evaluation_of_hyperthermia_effect_on_cell_viability_using_crystal_violet_staining_LDH_and_trypan_blue_assays.
- [18] NILLES, Julie; WEISS, Johanna a THEILE, Dirk. Crystal violet staining is a reliable alternative to bicinchoninic acid assay-based normalization. *BioTechniques*. 2022, roč. 73, č. 3, s. 131-135. ISSN 0736-6205. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0064>.
- [19] MANI, Sujata a BHARAGAVA, Ram Naresh. Exposure to Crystal Violet, Its Toxic, Genotoxic and Carcinogenic Effects on Environment and Its Degradation and Detoxification for Environmental Safety. In: DE VOOGT, W.P. (ed.). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 237*. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Cham: Springer International Publishing, 2016, s. 71-104. ISBN 978-3-319-23572-1. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_4.
- [20] CHIBA, K.; KAWAKAMI, K. a TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells.

- Toxicology in Vitro*. 1998, roč. 12, č. 3, s. 251-258. ISSN 08872333.
[https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(97\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(97)00107-0).
- [21] *What are the principles of 5-CFDA-AM assay?*. AAT Bioquest. 2023.
<https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/what-are-the-principles-of-5-cfda-am-assay>.
- [22] GOROKHOVA, Elena; MATTSSON, Lisa a SUNDSTRÖM, Annica M. A comparison of TO-PRO-1 iodide and 5-CFDA-AM staining methods for assessing viability of planktonic algae with epifluorescence microscopy. *Journal of Microbiological Methods*. 2012, roč. 89, č. 3, s. 216-221. ISSN 01677012.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.03.005>.
- [23] SCHREER, Anja; TINSON, Cheryl; SHERRY, James P. a SCHIRMER, Kristin. Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxyethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. *Analytical Biochemistry*. 2005, roč. 344, č. 1, s. 76-85. ISSN 00032697.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.06.009>.
- [24] *PubChem Compound Summary for CID 180237, Cfda-AM*. In: PubChem. National Center for Biotechnology Information.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/CFDA-AM>.
- [25] PESCH, K. L. a SIMMERT, U. Combined assays for lactose and galactose by enzymatic reactions. *Milchw. Forsch.* 1929, č. 8, s. 551.
- [26] SILANIKOVE, Nissim a SHAPIRO, Fira. CHAPTER 23. Combined Assays for Lactose and Galactose by Enzymatic Reactions. In: PREEDY, Victor R (ed.). *Dietary Sugars. Food and Nutritional Components in Focus*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2012, s. 395-404. ISBN 978-1-84973-370-0. <https://doi.org/10.1039/9781849734929-00395>.
- [27] SHAPIRO, Fira a SILANIKOVE, Nissim. Rapid and accurate determination of D- and L-lactate, lactose and galactose by enzymatic reactions coupled to formation of a fluorochromophore: Applications in food quality control. *Food Chemistry*. 2010, roč. 119, č. 2, s. 829-833. ISSN 03088146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.029>.
- [28] RAMSDELL, Guy A.; JOHNSON, W.M.T. a EVANS, F.R. Investigation of Resazurin as an Indicator of the Sanitary Condition of Milk. *Journal of Dairy Science*. 1935, roč. 18, č. 11, s. 705-717. ISSN 00220302. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(35\)93193-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(35)93193-9).
- [29] JOHNS, C.K. a HOWSON, R.K. Potentiometric Studies with Resazurin and Methylene Blue in Milk. *Journal of Dairy Science*. 1940, roč. 23, č. 4, s. 295-302. ISSN 00220302. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(40\)95526-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(40)95526-6).
- [30] OTSUKA, G. a NAKAE, T. Resazurin Test Paper Method for Determining the Sanitary Quality of Raw Milk. *Journal of Dairy Science*. 1969, roč. 52, č. 12, s. 2041-2044. ISSN 00220302. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(69\)86894-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(69)86894-3).

- [31] *Resazurin Tablets for Milk Testing, vial of 100*. Labtek Services. 2024.
<https://labtekservices.co.uk/product/resazurin-tablets-for-milk-testing-vial-of-100/>.
- [32] ASTM INTERNATIONAL. ASTM E2149-20, *Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions*. West Conshohocken, 2020. doi.org/10.1520/E2149-20.
- [33] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 14605:2013, *Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) — Light source for testing semiconducting photocatalytic materials used under indoor lighting environment*. Ženeva, 2013.
- [34] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10677:2011, *Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) — Ultraviolet light source for testing semiconducting photocatalytic materials*. Ženeva, 2011.
- [35] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 27447:2019, *Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) — Test method for antibacterial activity of semiconducting photocatalytic materials. 2*. Ženeva, 2019.
- [36] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 17094:2014, *Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) — Test method for antibacterial activity of semiconducting photocatalytic materials under indoor lighting environment*. Ženeva, 2014.
- [37] *PubChem Compound Summary for CID 11077, Resazurin*. In: PubChem. National Center for Biotechnology Information.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resazurin>.
- [38] *Product Information: Resazurin (sodium salt)*. Cayman Chemical Company, 2023.
[https://www.caymanchem.com/product/14322/resazurin-\(sodium-salt\)](https://www.caymanchem.com/product/14322/resazurin-(sodium-salt)).
- [39] *Spectrum [Resorufin]*. AAT Bioquest. 2023. <https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer/resorufin>.
- [40] O'BRIEN, John; WILSON, Ian; ORTON, Terry a POGNAN, François. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*. 2000, roč. 267, č. 17, s. 5421-5426. ISSN 0014-2956. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>.
- [41] UZARSKI, Joseph S.; DIVITO, Michael D.; WERTHEIM, Jason A. a MILLER, William M. Essential design considerations for the resazurin reduction assay to noninvasively quantify cell expansion within perfused extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*. 2017, roč. 129, s. 163-175. ISSN 01429612.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.015>.
- [42] HURYCH, Jakub a ŠTÍCHA, Roman. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. 3. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2021. ISBN 978-80-7553-976-2.

- [43] TUTTLE, Amie R.; TRAHAN, Nicholas D. a SON, Mike S. Growth and Maintenance of *Escherichia coli* Laboratory Strains. *Current Protocols*. 2021, roč. 1, č. 1. ISSN 2691-1299. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cpz1.20>.
- [44] COMM TECH LAB, MICHIGAN STATE UNIVERSITY. *The Well Known Microbe: E. coli*. In: The Microbe ZOO. 1999. <http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/zah0700.html>.
- [45] *PubChem Compound Summary for CID 86280045, Phthalocyanine*. In: PubChem. National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phthalocyanine>.
- [46] The Phthalocyanines: A New Class of Synthetic Pigments and Dyes. *Industrial & Engineering Chemistry*. 1939, roč. 31, č. 7, s. 839-847. ISSN 0019-7866. <https://doi.org/10.1021/ie50355a012>.
- [47] WAGNER, Hans J.; LOUTFY, Rafik O. a HSIAO, Cheng-Kuo. Purification and characterization of phthalocyanines. *Journal of Materials Science*. 1982, č. 17, s. 2781-2791. <https://doi.org/10.1007/BF00644652>.
- [48] PIBIRI, Ivana; BUSCEMI, Silvestre; PALUMBO PICCIONELLO, Antonio a PACE, Andrea. Photochemically Produced Singlet Oxygen: Applications and Perspectives. *ChemPhotoChem*. 2018, roč. 2, č. 7, s. 535-547. ISSN 2367-0932. <https://doi.org/10.1002/cptc.201800076>.
- [49] LANG, Kamil; MOSINGER, Jiří a WAGNEROVÁ, Dana Marie. Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku. *Chemické listy*. 2005, roč. 99, č. 4, s. 211-221. ISSN 0009-2770. http://chemicke-listy.cz/docs/full/2005_04_211-221.pdf.
- [50] *PubChem Compound Summary for CID 26041, Pyrithione Zinc*. In: PubChem. National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyrithione-Zinc>.
- [51] CHANDLER, Carol J. a SEGEL, Irwin H. Mechanism of the Antimicrobial Action of Pyrithione: Effects on Membrane Transport, ATP Levels, and Protein Synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1978, roč. 14, č. 1, s. 60-68. ISSN 0066-4804. <https://doi.org/10.1128/AAC.14.1.60>.
- [52] GUTHERY, Eugene; SEAL, Lawton A. a ANDERSON, Edward L. Zinc pyrithione in alcohol-based products for skin antiseptics: Persistence of antimicrobial effects. *American Journal of Infection Control*. 2005, roč. 33, č. 1, s. 15-22. ISSN 01966553. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2004.07.012>.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

zkratka	význam
ASTM	American Society for Testing and Materials
CFU	colony forming units (kolonie formující jednotky)
ISO	International Organisation for Standardization
LED	light-emitting diode (světlo emitující dioda)
PBS	phosphate buffered saline (fosfátový pufr)
ROS	reactive oxygen species (reaktivní kyslíková částice)
RPM	rotations per minute (otáčky za minutu)