

## METODA VYHODNOCOVÁNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY POČÍTAČOVÝM PRAHOVÁNÍM BAREV

RENATA RYCHTÁRIKOVÁ a GABRIELA  
KUNCOVÁ

Ústav chemických procesů AV ČR, v. v. i., Rozvojová 135,  
165 02 Praha 6 – Suchbátka  
rychtarikova@icpf.cas.cz

Došlo 22.2.2011, přijato 15.5.2011

Klíčová slova: analýza obrazu, mikroorganismy, polymery, toxicita, fotosenzitivní materiály

### Úvod

Pro určení životaschopnosti (viability) mikrobiálních buněk se využívá vitálního barvení pro světelnou a fluorescenční mikroskopii<sup>1,2</sup>, turbidimetrického měření zákalu buněčných suspenzí<sup>3</sup>, vážkového stanovení buněčné sušiny<sup>4</sup> a počítání buněk na plotnách<sup>5</sup>.

Společnou nevýhodou těchto metod je časová náročnost vyhodnocení a nutnost kalibrace. Co se týká plotnové metody, nelze pomocí ní přímo zjistit viabilitu buňky, ale pouze její schopnost rozmnožování<sup>5</sup>. Mikroorganismy se též mohou ve vzorku vyskytovat ve vysoké koncentraci a pro počitatelnost kolonií na misce je třeba vybrat vhodné ředění, protože spojené buňky vytvoří pouze jednu kolonii.

Tuto nevýhodu do značné míry odstraňuje metoda popsaná v této práci, která využívá v mikrobiologii dosud málo používaného<sup>6–11</sup> počítačového zpracování obrazu nárůstu mikroorganismů na pevném substrátu prahováním barevného tónu typického zbarvení kolonií nebo změněné barvy substrátu v důsledku extracelulární aktivity. Tuto metodu jsme použily při vyhodnocování baktericidní účinnosti fotosenzitivní vrstvy produkující reaktivní kyslíkové částice<sup>12</sup> (ROS).

### Experimentální část

#### Sterilizace materiálu

Pro sterilizaci médií a materiálu byl použit autokláv PS121 V/I (Chirana, ČSSR) při teplotě 120 °C a tlaku 0,1 MPa po dobu 20 min. Sterilní práce byla prováděna v laminárním boxu 1.2 Basis (Heto-Holten, Dánsko). Zaočkované Petriho misky byly inkubovány v termostatu FTC90I (Velp Scientifica, Itálie).

#### Původ a kultivace mikrobiálních kmenů

Selektovaný kmen *Lactobacillus helveticus* CH-1 byl získán z mikrobiologické sbírky Ústavu technologie mléka a tuků VŠCHT Praha, selektované kmeny *Bacillus amyloliquefaciens* 3129, *Micrococcus roseus* 3054 a *Rhodococcus* sp. z mikrobiologické sbírky Ústavu biochemie a mikrobiologie (ÚBM) VŠCHT Praha. Geneticky upravené *Escherichia coli* BL21(DE3) s vloženým plazmidem pET16bDsRed a *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  s vloženým plazmidem pUC19 byly připraveny J. Lipovem (ÚBM VŠCHT Praha).

Pomnožení kultur probíhalo na lineární třepače SWB25 (Haake-Technik, SRN) po zaočkování mikrobiální konzervy na agaru temperované na teplotu kultivace do temperovaného bujónu (50 ml) v 250ml Erlenmayerově baňce při 85 ot. min<sup>-1</sup> po dobu 16–18 h do stacionární fáze. Bujóny a teploty kultivace jsou uvedeny v tab. I.

#### Roztoky a složení mikrobiologických médií

Agar a ampicilin (Sigma-Aldrich, SRN), agar MRS, bujón MRS a trypton (vše Oxoid, UK), D-glukosa, chlorid sodný p.a. a *N,N*-dimethylformamid p.a. (DMF; vše Lach-Ner, ČR), isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG; Promega, USA), kvasničný extrakt (AppliChem, SRN); škrob rozpustný podle Leulieria p. a. (Lachema, ČR) a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (X-gal; Eppendorf, SRN).

Fyziologický roztok na ředění bakteriálních suspenzí (8,5 g l<sup>-1</sup> NaCl), médium Luria-Bertani (LB, 10 g l<sup>-1</sup> NaCl, 10 g l<sup>-1</sup> tryptonu, 5 g l<sup>-1</sup> kvasničného extraktu, příp. 10 nebo 20 g l<sup>-1</sup> agaru) a škrobový agar (5 g l<sup>-1</sup> tryptonu, 2,5 g l<sup>-1</sup> kvasničného extraktu, 1 g l<sup>-1</sup> D-glukosy, 10 g l<sup>-1</sup> škrobu, 10 g l<sup>-1</sup> agaru) byly sterilovány v autoklávu. Do sterilovaného média LB byl po jeho ochlazení cca na 50 °C přidán vodný roztok ampicilinu (200 g l<sup>-1</sup> média LB), příp. IPTG (1 mmol l<sup>-1</sup> média LB) či roztok X-gal v DMF. Ten byl připraven rozpuštěním X-gal v DMF 20 mg ml<sup>-1</sup> a uchovávan ve skleněné láhvi obalené alobalem při -18 °C. Vodný roztok IPTG (0,1 mol l<sup>-1</sup>) byl sterilován přes 0,22  $\mu$ m filtr a uchovávan při -18 °C. Ke stanovení amylasové aktivity *B. amyloliquefaciens* 3129 sloužil Lugolův roztok (3,3 g l<sup>-1</sup> I<sub>2</sub>, 6,7 g l<sup>-1</sup> KI).

#### Pracovní postup

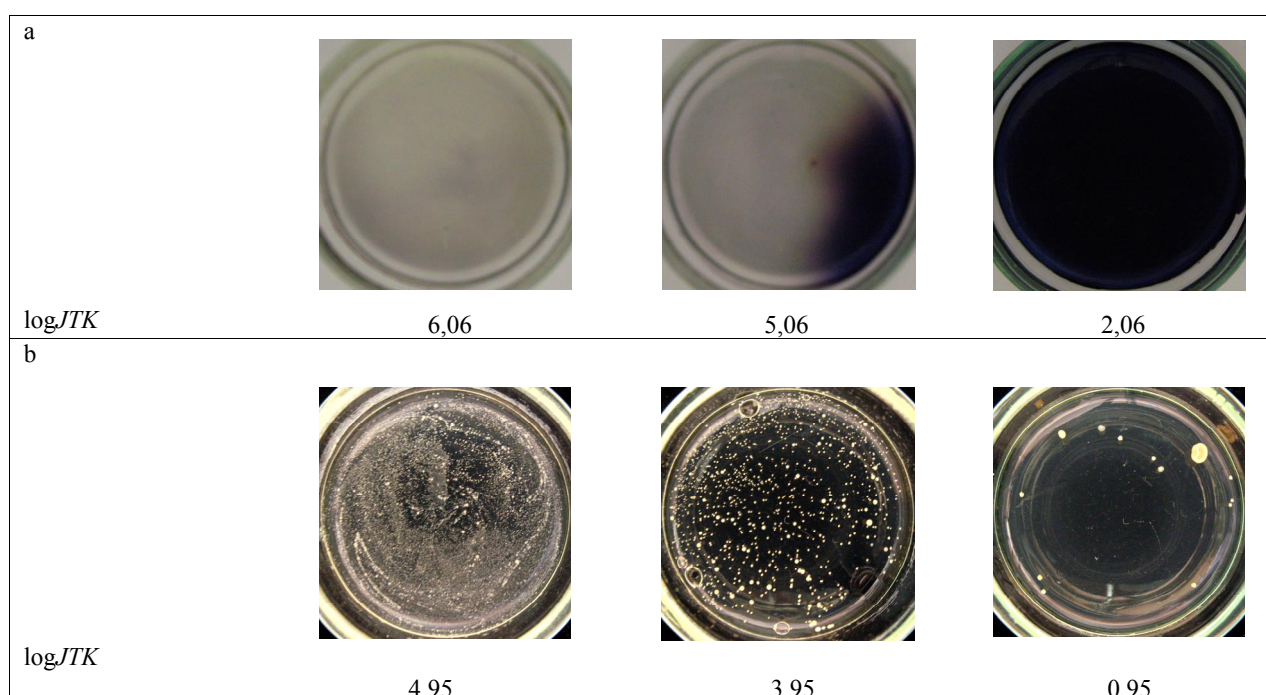
##### Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení počtu bakterií v agaru

Pomnožená kultura *E. coli*, *L. helveticus*, *Rhodococcus* sp., resp. *B. amyloliquefaciens* byla postupně (7 $\times$  až 8 $\times$ ) ředěna desetinásobným ředěním do fyziologického roztoku. Každé ředění (20  $\mu$ l) bylo pipetováno na skleněnou Petriho misku ( $\varnothing$  3,5 cm), přelito 1% agarem uvedeným v tab. I a promícháno. Inkubace zaočkovaných misek probíhala v termostatu při teplotě růstu mikroorganismu po dobu 48–96 h (tab. I). Pro každé ředění byly připraveny

Tabulka I  
Podmínky testů antimikrobiální aktivity porfyrinových kompozitů

| Mikroorganismus                  | Bujón/teplota [°C]  | Agar     | Inkubace<br>teplota [°C]/čas [h] | Prahování barev<br>rozsah R/G/B           |
|----------------------------------|---------------------|----------|----------------------------------|---|
| <i>L. helveticus</i> CH-1.       | MRS/42 <sup>a</sup> | MRS      | 42/72                            | světlé kolonie<br>154-255/117-255/98-254  |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> 3029 | LB/30               | škrobový | 30/48                            | tmavý agar <sup>b</sup><br>0-58/0-63/0-77 |
| <i>Rhodococcus</i> sp.           | LB/37               | LB       | 30/96                            | růžové kolonie<br>172-255/145-255/102-230 |
| <i>M. roseus</i> 3054            | LB/30               | LB       | -                                | růžové kolonie <sup>c</sup>               |
| <i>E. coli</i> BL21 <sup>d</sup> | LB/37               | LB+IPTG  | 37/48                            | růžové kolonie<br>147-255/109-216/85-111  |
| <i>E. coli</i> DH5a <sup>d</sup> | LB/37               | LB+X-gal | 37/48                            | modré kolonie <sup>c</sup>                |

<sup>a</sup> Omezený přísun O<sub>2</sub>, <sup>b</sup> ošetření misek Lugolovým roztokem (250 µl), v kalibrační křivce vyneseno plošné zastoupení barvy agaru neobarveného Lugolovým roztokem, <sup>c</sup> nebylo vyhodnocováno, <sup>d</sup> pěstovány na médiu LB s ampicilinem (200 mg l<sup>-1</sup>)



Obr. 1. Nárůsty bakterií v závislosti na jejich koncentraci v agaru – kalibrace pro vyhodnocování pomocí analýzy obrazu; a) amylosaccharásová aktivita *B. amyloliquefaciens* 3129 (obarvení Lugolovým roztokem), b) kolonie rodu *Rhodococcus* sp. Hodnoty pod snímky určují dekadické logaritmy počtu buněk v agaru na miskách

tří paralelní měření.

Po inkubaci byly fotoaparátem Canon Power Shot A640 pořízeny snímky skleněných misek s agarem s narostlou mikrobiální kulturou (obr. 1). Tyto nárůsty byly vyhodnocovány softwarem NIS Elements 2.30 jako procentuální zastoupení pixelů určité barvy AF v celkovém

objemu agaru (viz dále).

Z 5.–8. ředění byly suspenze (0,1 nebo 1 ml) pipetovány na plastové Petriho misky (ø 8 cm) a přelity 2% agarem (tab. I). Tyto misky, inkubované 24–48 h byly použity pro vyhodnocení počtu mikroorganismů na jednotku objemu (JTK ml<sup>-1</sup>). Zjištěná hodnota JTK ml<sup>-1</sup> byla přepočítá-

na desítkový logaritmus počtu mikroorganismů ( $\log JTK$ ) vyskytujících se v jednotlivých desetinasobných ředěních v agaru na skleněných Petriho miskách ( $\varnothing$  3,5 cm).

Samotná kalibrační křivka byla vyhodnocena softwarem OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, USA) proložení experimentálně nalezené závislosti logaritmu počtu buněk v agaru ( $\log JTK$ ) na plošném podílu ( $AF$ ), který po inkubaci v agaru zaujímají, funkcí *OneSiteBind*:

$$\log JTK = \frac{\log JTK_{\max} \times AF}{AF_{50} + AF}$$

Konstanty  $\log JTK_{\max}$ , resp.  $AF_{50}$  [%] odpovídají dekadickému logaritmu limitního počtu buněk, které na misce narostou, resp. ploše, kterou zabírá počet buněk odpovídající  $\log JTK_{\max}/2$ .

Pro vyhodnocení počtu *B. amyloliquefaciens* v agaru byly použity hodnoty  $(100 - AF)$  %, tj. plocha agaru nezbarvaná Lugolovým roztokem.

#### Testování antimikrobiální aktivity porfyrinového kompozitu

Pro porovnání chování mikroorganismů k oxidačnímu stresu sloužila fotosenzitivní vrstva připravená na skleněné Petriho misce ( $\varnothing$  3,5 cm) enkapsulací<sup>12</sup> 5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)porfyrinu (TMPyP) do gelu z tetramethoxysilanu (dále TMOS-TMPyP).

Mikrobiální kultury ve stacionární fázi byly  $10\,000\times$  ředěny do 1% agarů uvedených v tab. I, které byly pipetovány (1,5 ml) přes vrstvu TMOS-TMPyP. Poměr tloušťky vrstvy TMOS-TMPyP vůči agaru byl 1,5.

Následně byly misky ozařovány lampou Kaiser (Kaiser Fototechnik, SRN) s halogenovou žárovkou Osram 64514 120V/300W (Osram, SRN) po dobu 0; 1,5 a 3 h. Jako tepelný filtr mezi lampou a Petriho miskami sloužila skleněná nádoba s vodou, podložku pod miskami tvořil bílý papír. Intenzita záření ( $E_V = 5,5$  klx) dopadající na Petriho misky byla měřena luxmetrem LX-103 (Lutron, USA). Ze vztahu  $Q_V = 1,46 \cdot 10^{-7} \times E_V \times t$ , ve kterém faktor  $1,46 \cdot 10^{-7}$  přepočítává<sup>13</sup> intenzitu v [lx] při vlnové délce 555 nm na  $[W\,cm^{-2}]$  a  $t$  je doba ozařování, byla vypočítána energie záření dopadající na misky v průběhu ozařování (0; 4,3; resp. 8,7 J  $cm^{-2}$ ).

Po ozařování byly misky inkubovány ve tmě. Doba a teplota inkubace jsou uvedeny v tab. I. Po přelití misek s *B. amyloliquefaciens* Lugolovým roztokem byly následně pořízeny jejich snímky, které byly vyhodnoceny analýzou obrazu (viz dále).

#### Fotografování a analýza nárůstů bakterií

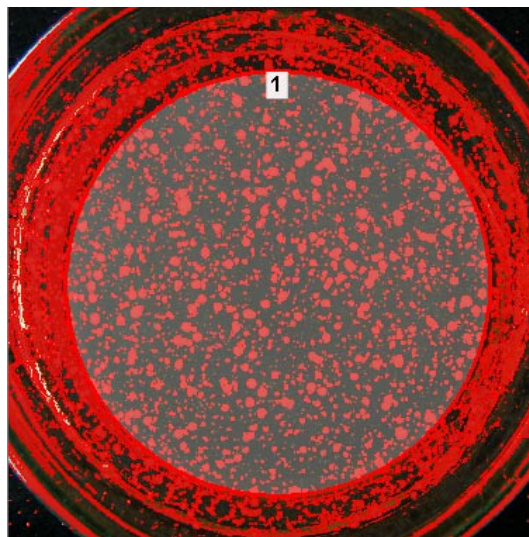
Snímky Petriho misek ( $\varnothing$  3,5 cm) s bakteriemi byly pořízeny při konstantním osvětlení fotoaparátem Canon Power Shot A640, umístěným na stativu RS1 s osvětlovacím systémem RB 5000 DL (Kaiser Fototechnik, SRN). Nárůsty *E. coli* BL21(DE3), *L. helveticus* CH-1 a rodu *Rhodococcus* sp. byly snímány proti černému pozadí (černý samet), zatímco misky s *B. amyloliquefaciens* 3129

přelité Lugolovým roztokem (250  $\mu$ l) proti pozadí bílému (bílý samet).

Kvantitativní analýza nasnímaných obrazů byla provedena v softwaru NIS Elements BR 2.30 (Laboratory Imaging, ČR). Snímky z jednotlivých pokusů byly zpracovány za konstantního osvětlení jednou osobou na jednom počítači s konstantní kalibrací monitoru Hyundai L72DD s vyváženým barevným profilem. Pomocí analýzy obrazu byl vyhodnocován parametr (příznak) *AreaFraction* odpovídající veličině  $AF$  a popisující procentuální zastoupení počtu pixelů určité barvy vůči celku:

- 1) Ve složce *Binární* byla pomocí funkce *Definice prahování* naprahována barva odpovídající nárůstu bakterie v agaru (tab. I, obr. 2).
- 2) Ve složce *Měření* byla pomocí funkce *ROI Editor* (tzv. masky) vybrána oblast agaru, vůči níž se vztahovalo procentuální zastoupení naprahované barvy (obr. 2).

Podobně byl vyhodnocen parametr *NumberObjects* („počet objektů“ *NO*) určující počet kolonií.



Obr. 2. Vyhodnocování nárůstu rodu *Rhodococcus* sp. v agaru LB softwarem NIS Elements

## Výsledky a diskuse

### Výběr mikroorganismů a vývoj metody

Pro vývoj metody bylo vybráno 6 mikroorganismů, jejichž nárůst je okem dobře viditelný. Jedná se o 4 selektované kmeny – *Lactobacillus helveticus* CH-1 tvořící bílé kolonie v/na tmavém agaru MRS, *Micrococcus roseus* 3054 a *Rhodococcus* sp. s růžovými koloniemi v/na světlém agaru LB a *Bacillus amyloliquefaciens* 3129, jehož detekce je umožněna odbarvením fialového Lugolova roztoku ve škrobovém agaru v důsledku aktivity extracelulár-

ních enzymů. Další dva kmeny byly geneticky upravené. *Escherichia coli* BL21(DE3) s plazmidem pET16bDsRed tvoří pod ampicilinovým tlakem za přítomnosti laktosy v růstovém médiu červeně fluoreskující protein. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  s plazmidem pUC19 štěpí z X-gal indolové barvivo<sup>14</sup>.

Postup vyhodnocování prahováním barev spočíval v sestrojení kalibračních křivek (obr. 3 a tab. III) závislosti počtu buněk v agaru na Petriho miskách na ploše, kterou v agaru zaujímají. Po inkubaci agarů zaočkovaných na známou mikrobiální denzitu byly povrchy agarů s narostlou kulturou fotografovány (obr. 1) a snímky byly vyhodnocovány počítačovou analýzou v programu NIS Elements prahováním barvy pod maskou odpovídající barvě kolonií bakterie (obr. 2), resp. barvě Lugolova roztoku na škrobovém agaru. Závislosti známého počtu buněk na ploše, kterou zaujímají, byly v programu Origin proloženy závislostí *OneSiteBind* (obr. 3).

Získané rovnice závislosti (tab. III) byly použity k přepočtu nárůstu bakterie na počet buněk v agaru po působení antimikrobiálního činidla.

Dvě z vybraných bakterií se ukázaly jako nevhodné. Kmen *M. roseus* 3054 se špatně množil v tekutém médiu a tvořil shluky buněk. Agar zaočkovaný *E. coli* DH5 $\alpha$  se zase nemísil s roztokem X-gal v DMF, který byl navíc pro mikroorganismy toxický. Práškový X-gal se v agaru rozpuštěl pouze omezeně a pro bakterie byl špatně dostupný.

Závislost mezi počtem kolonií vyhodnocovaném jako „počet objektů“ *NO* a jejich počtem zjištěném z „plošného podílu“ *AF* byla lineární až do koncentrace 10<sup>4</sup> buněk. Při vyšších koncentracích buněk kolonie na agaru srůstaly a „počet objektů“ *NO* odpovídající počtu kolonií rozlišených programem pro analýzu obrazu byl až o několik řádů nižší než počet bakterií vypočítaný z kalibrační křivky.

Porovnání mikroorganismů použitých ke stanovení antimikrobiální aktivity s využitím obrazové analýzy je uvedeno v tab. II. Jednoduchost vyhodnocení je tím lepší, čím je větší barevný kontrast vůči substrátu. Rychlosti v tab. I odpovídají dobám inkubace agarů. Dále byla vyhodnocena citlivost metody, která je v tomto případě úměrná poklesu počtu kolonií po působení ROS.

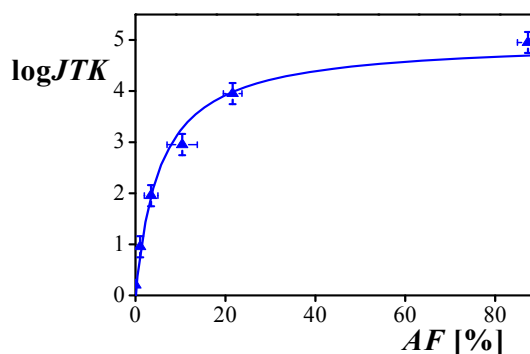
Tabulka II

Porovnání mikroorganismů pro stanovení metodou prahování

| Mikroorganismus                  | Vyhodnocování      | Citlivost vůči ROS <sup>a</sup> | Barevný kontrast vůči pozadí (rozsah R/G/B) <sup>b</sup> | Růstová rychlost [h] |
|----------------------------------|--------------------|---------------------------------|--|----------------------|
| <i>L. helveticus</i> CH-1        | barva kolonií      | 1.                              | 4. (21-107/18-105/17-103)                                | 72                   |
| <i>Rhodococcus</i> sp.           | barva kolonií      | 3.                              | 3. (8-55/11-121/0-121)                                   | 96                   |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)         | barva kolonií      | 2.                              | 2. (0-92/3-89/0-89)                                      | 48                   |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> 3129 | amylasová aktivita | 4.                              | 1. (0-164/0-148/0-142)                                   | 24                   |

<sup>a</sup> 1. nejcitlivější, 4. nejméně citlivá, <sup>b</sup> 1. nejlepší kontrast, 4. nejhorší kontrast, rozsah barev pozadí RGB uveden pro kalibrační křivku

Pro kvantitativní stanovení počtu buněk *L. helveticus* CH-1, *Rhodococcus* sp. a *E. coli* BL21(DE3) bylo použito prahování barvy jejich kolonií. Nejrychlejší bylo stanovení pomocí amylasové aktivity *B. amyloliquefaciens* 3129, které bylo možné v daném uspořádání využít pouze pro kvantitativní vyhodnocení v rozmezí nárůstu 3–6 řádů. Nárůsty do 3 řádů totiž nevykazovaly dostatečně silnou amylasovou aktivitu a nedocházelo k odbarvení Lugolova roztoku. Naopak nárůsty nad 6 řádů odbarvovaly Lugolův roztok v celé misce. Ze sledovaných mikroorganismů byl *L. helveticus* CH-1 v agaru MRS nejvíce ovlivněn reaktivními kyslíkovými částicemi produkovanými z povrchu TMOS-TMPyP. Oproti tomu růžově pigmentovaná *E. coli* BL21(DE3) rostoucí v LB agaru byla nejlépe viditelná, a tudíž nejsnadněji vyhodnotitelná. Ampicilin v jejím růstovém médiu snižoval navíc pravděpodobnost mikrobiální kontaminace. Nevýhodou je však legislativní omezení použití GMO.



$$\log JTK = \frac{4,99 \times AF}{5,45 + AF}, R^2 = 0,91759$$

Obr. 3. Kalibrační křivka nárůstu rodu *Rhodococcus* sp. v agaru (1,5 ml) na Petriho misce (ø 3,5 cm); *AF* – procentuální nárůst bakterie v agaru, *log JTK* – desítkový logaritmus počtu buněk v agaru

Tabulka III

Konstanty kalibračních křivek nárůstů bakterií v agarrech (1,5 ml) na Petriho misce (ø 3,5 cm)

| Mikroorganismus                               | $\log JTK_{\max}$ | $AF_{50}$ | $R^2$  |
|---|-------------------|-----------|--------|
| <i>L. helveticus</i> CH-1                     | 5,86              | 10,81     | 0,9656 |
| <i>Rhodococcus</i> sp.                        | 4,99              | 5,45      | 0,9176 |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)                      | 8,75              | 27,97     | -0,25  |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> 3129 <sup>a</sup> | 3,06              | 23,25     | 0,9176 |

$${}^a AF = 0 \Rightarrow \log JTK \in \langle 0; 3,06 \rangle; AF \in (0; 100) \Rightarrow \log JTK = \frac{3,06 \times AF}{23,25 + AF} + 3,06; AF = 100 \Rightarrow \log JTK \in \langle 6,08; \infty \rangle$$

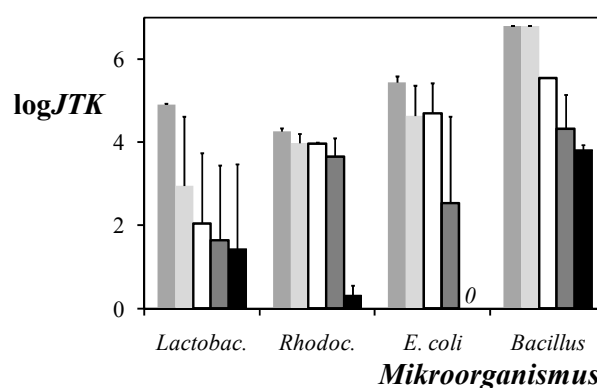
#### Aplikace metody pro ověření biologické aktivity fotosenzitivní vrstvy

Metodika vyvinutá na agarových plotnách byla použita k testování antimikrobiální aktivity povrchů křemičitých gelů s porfyrinem (TMOS-TMPyP)<sup>12</sup>.

Mikroorganismy *L. helveticus* CH-1, *Rhodococcus* sp., *E. coli* BL21(DE3) s plazmidem pET16bDsRed a *B. amyloliquefaciens* 3129 se lišily citlivostí k oxidativnímu stresu způsobenou rozdílnou stavbou buněčné stěny včetně obsahu karotenoidů, rozdílným vztahem ke kyslíku, obsahem oxidoredukčních enzymů, molárním poměrem bází guaninu a cytosinu v DNA či schopností tvořit za nepříznivých podmínek spóry<sup>3</sup> (tab. IV).

Počty buněk zjištěné prahovací metodou v samotné agarové vrstvě a v této vrstvě nalité na čistý křemičitý gel z TMOS jsou na obr. 4. Toxický účinek methanolu uvolněného při přípravě vrstvy z TMOS byl nejmenší u *B. amyloliquefaciens*, kde došlo pouze k malé změně zabarvení oproti samotnému agaru.

Výsledky působení reaktivních kyslíkových částic produkovaných vrstvou TMOS-TMPyP na mikroorganismy v závislosti na energii ozařování (0; 4,3 a 8,7 J cm<sup>-2</sup>) jsou uvedeny na obr. 4. Bakterií nejcitlivější na produkci ROS vrstvou TMOS-TMPyP byl mikroaerofilní



Obr. 4. Nárůsty bakterií v agarrech (1,5 ml) nad TMOS-TMPyP na Petriho misce (ø 3,5 cm) po ozařování halogenovou lampou; logaritmičké počty buněk  $\log JTK$  byly vypočítané z kalibračních křivek uvedených v tab. III. *Lactobac.* – *Lactobacillus helveticus* CH-1, *Rhodoc.* – *Rhodococcus* sp., *E. coli* – *E. coli* BL21(DE3) s pET16bDsRed, *Bacillus* – *Bacillus amyloliquefaciens* 3129; ■ kontrola – agar bez vrstvy, □ kontrola – TMOS, □ TMOS-TMPyP, 0 J cm<sup>-2</sup>, ■ TMOS-TMPyP, 4,3 J cm<sup>-2</sup>, ■ TMOS-TMPyP, 8,7 J cm<sup>-2</sup>

Tabulka IV

Charakterizace mikrobiálních kmenů

| Kmen <sup>a</sup> | Gram | Metabol. <sup>b</sup>    | Spor. <sup>c</sup> | Tvar                        | KAT <sup>d</sup> | OX <sup>e</sup> | SOD <sup>f</sup> | MnPP <sup>g</sup> | G-C <sup>h</sup> | Kar. <sup>i</sup> |
|-------------------|------|--------------------------|--------------------|-----------------------------|------------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| <i>Lbc.</i>       | +    | mikroaer. <sup>j</sup>   | –                  | tyčinky                     | –                | –               | –                | +                 | nízký            | –                 |
| <i>Bc.</i>        | +    | aerofilní                | +                  | tyčinky                     | +                | +               | +                | –                 | vysoký           | –                 |
| <i>Rhod.</i>      | +    | aerofilní                | –                  | tyčinky nebo koky v myceliu | +                | –               | +                | –                 | vysoký           | +                 |
| BL21              | –    | fak. anaer. <sup>k</sup> | –                  | tyčinky                     | +                | –               | +                | –                 | vysoký           | –                 |

<sup>a</sup>*Lbc.* – *L. helveticus* CH-1, *Bc.* – *B. amyloliquefaciens* 3129, *Rhod.* – *Rhodococcus* sp., BL21 – *E. coli* BL21(DE3) s vloženým plazmidem pET16bDsRed, <sup>b</sup>Metabol. – metabolismus, <sup>c</sup>Spor. – sporulace, <sup>d</sup>KAT – katalasa, <sup>e</sup>OX – cytochrom-*c*-oxidasa, <sup>f</sup>SOD – superoxididismutasa, <sup>g</sup>MnPP – polyfosfát manganatý, <sup>h</sup>G-C – obsah guaninu a cytosinu, <sup>i</sup>Kar. – karotenoidy, <sup>j</sup>mikroaer. – mikroaerofilní, <sup>k</sup>fak. anaer. – fakultativně anaerobní

*L. helveticus* CH-1, který nemá silný detoxikační systém odstraňující v buňce volné radikály (tab. IV). Navíc toxický účinek ROS byl zesílen přechodem z anaerobního prostředí při kultivaci do aerobního prostředí nad vrstvou TMOS-TMPyP. Nárůst v agaru MRS byl tak snížen již na počátku měření ( $\sim 0 \text{ J cm}^{-2}$ ) na 2 řády.

U rodu *Rhodococcus* sp. vyvolala světelná energie  $4,3 \text{ J cm}^{-2}$  pokles ze 4 na 3,5 řádu, avšak zdvojnásobením dávky světelné energie byl zaznamenán celkový pokles na 0,5 řádu. Tato odolnost vůči působení ROS v první polovině ozářování byla pravděpodobně způsobena nejen jeho silným aerobním metabolismem, ale také obsahem karotenoidních barviv.

Nárůst gramnegativní fakultativně anaerobní *E. coli* BL21(DE3) klesal v průběhu měření rovnoměrně o 2,5 řádu po dopadu jednotlivých světelných dávek ( $4,3 \text{ J cm}^{-2}$ ). Po působení  $8,68 \text{ J cm}^{-2}$  již nebyl nárůst zaznamenán.

Počet buněk *B. amyloliquefaciens* 3129 vyhodnocovaný nepřímo pomocí amylasové aktivity se působením světelné energie  $4,3 \text{ J cm}^{-2}$  snížil z 5,5 řádu o 1,25 řádu a při dvojnásobné dávce záření o dalšího 0,5 řádu. Přestože jsou grampozitivní bakterie obecně citlivější k působení ROS, vykazoval *B. amyloliquefaciens* oproti *E. coli* vyšší odolnost způsobenou jeho silně aerobním metabolismem, včetně schopnosti sporulace. Je ovšem nutné zmínit, že metoda s rodem *Bacillus* je nejméně přesná v důsledku postupné změny barvy agarů s rozmezím pouze 3–6 řádů počtu bakterií. To se projevilo nejnižší hodnotou konstanty  $\log JTK_{\max}$  kalibrační křivky (tab. III).

## Závěr

V práci je popsána plotnová metoda stanovení antimikrobiální aktivity látek modifikovaná vyhodnocením koncentrace mikroorganismů v živném substrátu počítačovou analýzou obrazu prahováním jejich barevného tónu. Byly použity *Bacillus amyloliquefaciens* 3129, jehož nárůst způsobuje odbarvení Lugolova roztoku na škrobovém agaru, *Lactobacillus helveticus* CH-1 na tmavém MRS agaru a růžově pigmentované *Rhodococcus* sp. a *E. coli* BL21(DE3) s plazmidem pET16bDsRed rostoucí na světelném agaru LB. Jedná se o uznanou metodu závisící na počáteční hustotě mikroorganismů v agaru, tloušťce zaočkované agarové vrstvy a době inkubace při kontaktu s toxickým materiálem. Použití metody bylo ukázáno na kvantitativním stanovení účinnosti antimikrobiálního povrchu fotosenzitivní vrstvy se zachyceným porfyrinem.

Kromě výše uvedených mikroorganismů lze pro danou metodu použít i jiné pigmentované mikroorganismy či mikroorganismy, jejichž přítomnost v živném gelu se projeví jeho zbarvením. Příkladem mohou být bakterie (*Leuconostoc mesenteroides*, *Citrobacter freundii* či *Comamonas testosteroni*), jejichž metabolickou aktivitou dochází ke změně pH a tedy i zbarvení živného substrátu (citrátového agarů) s pH indikátorem.

Popsaná metoda je oproti běžně používanému počítání buněk rychlejší a její použití je výhodné zejména

při testování materiálů se světlem indukovanou antimikrobiální aktivitou.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantů MŠMT ME892 a LC06070.

## LITERATURA

- Li W. L., Guo Z. P., Zhang L. A., Ding Z. Y., Wang Z. X., Shi G. Y.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 69, 44 (2011).
- Häusler J.: *Mikrobiologické metody kontroly jakosti vod II*. Zemědělské nakladatelství Brázda, Praha 1991.
- Funes M. D., Caminos D. A., Alvarez M. G., Fungo F., Otero L. A., Durantini E. N.: *Environ. Sci. Technol.* 43, 902 (2009).
- <http://biomikro.vscht.cz/documents/metmiklab/Metmiklab4.pdf>, staženo 16. 10. 2010.
- Sigler K., Chaloupka J., Brozmanová J., Stadler N., Höfer M.: *Folia Microbiol.* 44, 587 (1999).
- Gavoille A., Bardy B., Andremont A.: *Comput. Biol. Med.* 24, 179 (1994).
- Ogawa M., Tani K., Ochiai A., Yamaguchi N., Nasu M.: *J. Appl. Microbiol.* 98, 1101 (2005).
- Skandamis P. N., Brocklehurst T. F., Panagou E. Z., Nychas G.-J. E.: *J. Appl. Microbiol.* 103, 937 (2007).
- Dunsmore B., Youldon J., Trasher D. R., Vance I.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 454 (2006).
- Fung C. D., Theriot J. A.: *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 346 (1998).
- Pípek P., Rohlik B. A., Lojkova A., Staruch L.: *Cz. J. Food Sci.* 28, 258 (2010).
- Rychtáriková R., Kuncová G., Krulíková T., Šviráková E., Hetflejš J.: *XVI International Workshop on Bioencapsulation, Dublin, Ireland, 4-6 Sept. 2008*. Book of Abstracts, P19, str. 1. Dublin 2008.
- <http://whatis.techtarget.com/definition>, staženo 1. 2. 2011.
- Mosinger J., Jirsák O., Kubát P., Lang K., Mosinger Jr. B.: *J. Mater. Chem.* 17, 164 (2007).

**R. Rychtáriková and G. Kuncová** (*Institute of Chemical Process Fundamentals, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Assessment of Antimicrobial Activity via Computational Thresholding of Colours**

The determination of antimicrobial activity by plate method was modified by assessment of microbial concentration in substrate via computational analysis of coloured images of plates with microorganisms. The method was demonstrated on agar plates with *Lactobacillus helveticus* CH-1 (white colonies in MRS agar), *Rhodococcus* sp. (pink colonies in LB agar), GMO *Escherichia coli* BL21 (DE3) (pink fluorescent colonies in LB agar), and *Bacillus amyloliquefaciens* 3129 (decoloratization of Lugol solution) and successfully applied to determination of light induced antimicrobial activity of surfaces of silica gels with entrapped 5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)porphyrin.