



*ACADEMIA MEDICA GEDANENSIS
FACULTAS PHARMACEUTICA*

Rafał Hałasa

**Zastosowanie fluorescencyjnej respirometrii optycznej
do analizy wzrostu komórek w hodowlach bakteryjnych i
eukariotycznych poddanych działaniu związków
bakteriostatycznych i cytotoksycznych.**

Praca doktorska wykonana

pod kierunkiem dr hab. Władysława Werela, prof. nadzw.

w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej

Akademii Medycznej w Gdańsku.

Gdańsk 2009

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu promotorowi **dr hab. Władysławowi Werelowi, prof. nadzw.** za pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy, opiekę naukową i cierpliwość. Dziękuję dr Maciejowi Drozdowi za skonstruowanie generatora impulsów świetlnych, napisanie i uruchomienie programu komputerowego sterującego działaniem aparatu pomiarowego. Dziękuję Pracownikom Zakład Mikrobiologii Klinicznej Szpitala Specjalistycznego Św. Wojciecha-Adalberta w Gdańsku za udostępnienie szczepów bakterii opornych na chemioterapeutyki. Wszystkim pracownikom Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej za wsparcie i dobrą radę w dążeniu do celu składam serdeczne podziękowania*

Rodzicom

Spis treści:

1. WSTĘP.....	5
1.1. Metody pomiaru wzrostu bakterii.....	5
1.1.1. Metody niebioelektrochemiczne.....	7
1.1.2. Metody bioelektrochemiczne.....	18
1.2. Technika respirometrii oparta na gaszeniu fluorescencji sensora tlenowrażliwego.....	19
1.2.1. Fizyczne postawy fluorescencyjnej respirometrii optycznej.....	20
1.2.2. Wygaszanie stanów wzbudzonych.....	23
1.2.3. Biosensory tlenowrażliwe.....	25
2. CEL PRACY.....	27
3. MATERIAŁY I METODY.....	28
3.1. Materiały.....	28
3.1.1. Biosensor tlenowrażliwy.....	28
3.1.2. Szczepy mikroorganizmów.....	28
3.1.3. Stosowane pożywki.....	29
3.1.4. Odczynniki.....	29
3.2. Metody.....	30
3.2.1. Metoda otrzymywania sensora tlenowego tris 4,7-difenylo-1,10-fenantrolino dichlorku rutenu (II)(Ru(DPP) ₃ Cl ₂).....	30
3.2.2. Pomiary spektrofotometryczne.....	31
3.2.3. Pomiary fluorometryczne.....	31
3.2.4. Opłaszczanie studzienek 96-dołkowej płytki titracyjnej biosensorem Ru(DPP) ₃ Cl ₂	31
3.2.5. Oznaczanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków chemicznych.....	32
3.3. Pomiary sygnału fluorescencji biosensora Ru(DPP) ₃ Cl ₂	35
4. WYNIKI I DYSKUSJA.....	36
4.1. Konstrukcja platformy pomiarowej do pomiarów metodą fluorescencyjnej respirometrii optycznej.....	36
4.2. Ocena czułości układu pomiarowego.....	51
4.3. Wyniki prób biologicznych.....	54
4.3.1. Monitorowanie wzrostu hodowli bakterii za pomocą pomiarów respirometrycznych z wykorzystaniem biosensora tlenowego.....	54
4.3.2. Wpływ działania dimetylosulfotlenku na bakterie <i>Escherichia coli</i>	62
4.3.3. Analiza wpływu ampicyliny na komórki <i>Escherichia coli</i>	67
4.3.4. Wpływ ko-timoksazolu (trimetoprimu/sulfametaksazolu) na bakterie <i>Escherichia coli</i>	70
4.3.5. Wpływ metali ciężkich na wzrost <i>Escherichia coli</i>	73
4.3.6. Monitorowanie wzrostu hodowli komórek eukariotycznych za pomocą pomiarów respirometrycznych z wykorzystaniem biosensora tlenowego.....	80
4.3.7. Wyznaczanie działania antybakteryjnego nowosyntetyzowanych związków chemicznych.....	88
5. STRESZCZENIE.....	95
6. BIBLIOGRAFIA.....	97
7. STOSOWANE SKRÓTY.....	106
DODATEK NR 1	
Elementy składowe modułu orientującego płytkę pomiarową.....	107
DODATEK NR 2	
Elementy składowe modułu optycznego.....	119

DODATEK NR 3	
Fotopowielacz H5783 firmy Hamamatsu.....	120
DODATEK NR 4	
Licznik fotonów SR400 firmy Stanford Research System.....	123
DODATEK NR 5	
Moduł termoregulujący.....	128

1. WSTĘP

1.1. Metody pomiaru wzrostu bakterii.

Określanie ilości drobnoustrojów odgrywa bardzo ważną rolę we wszystkich przemysłowych procesach biotechnologicznych wykorzystujących technologie fermentacyjne. Pomiar biomasy bakterii i grzybów daje możliwość oceny wzrostu drobnoustrojów, wydajności syntez, szybkości i równowagi bioprocessów. W medycynie i farmacji stwierdzenie obecności i wzrostu drobnoustrojów w organizmie może decydować o życiu i zdrowiu pacjenta, a analizy wpływu chemioterapeutyków na drobnoustroje są podstawą do wyboru właściwego sposobu leczenia i kontroli procesu terapeutycznego.

Rozwój metodologii analiz wrażliwości szczepów bakterii na antybiotyki ma długą historię począwszy od opartych na analizach własności fenotypowych drobnoustrojów metodach rozcieńczeniowych, przez liczne modyfikacje metod dyfuzyjnych aż po najnowsze techniki genotypowania /106/. W tym przypadku, w oparciu o analizy DNA, stwierdza się obecność genów oporności w materiale genetycznym. Stwierdzenie występowania takich genów nie jest jednak równoznaczne z fenotypową manifestacją oporności, podobnie jak niestwierdzenie obecności odpowiedniego genu nie oznacza również automatycznie, że mikroorganizm musi być wrażliwy. Nie ulega więc wątpliwości, że wprowadzenie nowych metod molekularnych do rutynowych analiz antybiotykowrażliwości musi być wyczerpująco przetestowane i wystandaryzowane w oparciu o równoległe prowadzone analizy wzrostu mikroorganizmów w obecności czynników przeciwdrobnoustrojowych. Analizy wzrostu drobnoustrojów pozostają więc nadal najbardziej efektywnym sposobem analizy wpływu związków chemicznych na bakterie i grzyby, a istotny postęp technologiczny w automatyzacji procesu identyfikacji drobnoustrojów i oceny wrażliwości na związki przeciwdrobnoustrojowe zwiększa znaczenie tych analiz /31, 21, 61, 92/. W ostatnich latach wprowadzono szereg nowych metod ilościowej analizy drobnoustrojów, które wykorzystują fizyczne, biochemiczne lub bioelektrochemiczne techniki analizy. Nie ma jednak jednej uniwersalnej metody, która dawałaby zadawalające wyniki ilościowej oceny liczby drobnoustrojów w analizowanych próbkach. Poszukuje się więc nowych, szybkich i ekonomicznych metod stwierdzania obecności i oceny ilości drobnoustrojów. Metoda taka powinna być dokładna, szybka, charakteryzować się odpowiednią czułością, mieć szerokie zastosowanie, powinna pozwalać różnicować komórki żywe od martwych, mieć krótki czas przygotowania próbki

oraz wykorzystywać minimalną ilość odczynników. Urządzenia stosowane w metodzie powinny być proste w obsłudze i kalibracji, łatwo i bez uszczerbku podlegać procesowi sterylizacji i tanie w eksploatacji. Poniżej przedstawiono charakterystykę wybranych metod. Ze względów praktycznych podzielono je na metody niebioelektrochemiczne oraz na bioelektrochemiczne, w których sygnał analityczny jest generowany przez drobnoustroje pochłaniające bądź generujące ładunek elektryczny, który jest wykrywany na elektrodach /31/. Wśród metod niebioelektrochemicznych można wyróżnić klasyczne i specjalne metody detekcji. Tabela 1 zawiera charakterystykę parametrów analitycznych wybranych metod niebioelektrochemicznych.

Tabela 1. Parametry analityczne wybranych metod niebioelektrochemicznych służących do określania liczby komórek (biomasy bakterii) wg /31/.

Metoda	Czas analizy (godziny)	Źródło sygnału	Próg detekcji (ml ⁻¹)
Pomiar suchej masy	8	Cząstki stałe	0,02 mg
Określanie liczby żywych drobnoustrojów	24-72	Żywe komórki	10
Mikroskopia bezpośrednia	1	Żywe komórki	10 ⁴
Turbidymetria	Czas rzeczywisty	Zawieszone cząstki	2 x 10 ⁶
Radiometria	8-16	Żywe komórki	1
Mikrokalorymetria	2	Żywe komórki	10 ⁵
Epifluorescencja	0,5	Żywe komórki	5 x 10 ³
Bioluminescencja	0,2	Żywe komórki	10 ⁵
Licznik Coulter'a	0,5	Cząstki stałe	5 x 10 ⁴
Metody filtracji	Czas rzeczywisty	Zawieszone cząstki	2 mg
Nefelometria	Czas rzeczywisty	Zawieszone cząstki	2 x 10 ⁵
Immunofluorescencja	Czas rzeczywisty	Fluorochromy	10 ²
Pomiary piezoelektryczne	Czas rzeczywisty	Zawieszone cząstki	10 ⁶
Akustyczna sensytometria rezonansowa	Czas rzeczywisty	Zawieszone cząstki	>10 ⁸
Mikroskopia elektronowa	2-3	Cząstki stałe	600 fg μm ⁻³
Mikro-Elisa	2-3	Zawieszone cząstki	10 ³
Elektronowa analiza cząsteczek	100 analiz h ⁻¹	Zawieszone cząstki	10 ⁵

1.1.1. Metody niebioelektrochemiczne.

1.1.1.1. Klasyczne metody.

1.1.1.1.1. Pomiar suchej masy.

Metoda oparta jest na określaniu suchej masy bakteryjnej komórek żywych i martwych. Bakterie hodowane w znanej objętości podłoża hodowlanego odwirowuje się a następnie przemywa jałową wodą destylowaną w celu odpłukania resztek podłoża. Bakterie przenosi się do zważonego naczynia, suszy do stałej masy poprzez liofilizację lub w suszarce w temp. 105°C po czym, naczynie schładza się w eksykatorze i waży ponownie. Błędy tej metody mogą wynikać z rozpadu materiałów biologicznych oraz stosowania nierozpuszczalnych substratów, które mogą być obecne w pożywkach hodowlanych. Obecnie metoda jest rzadko stosowana, a jej praktyczne znaczenie ogranicza się do stosowania jej jako metody porównawczej do kalibracji innych metod /31, 78, 16/.

1.1.1.1.2. Określanie liczby żywych drobnoustrojów.

Do określania ilości żywych drobnoustrojów stosuje się kilka metod: metodę seryjnych rozcieńczeń (metoda płytkowa), filtrów membranowych oraz metodę „najbardziej prawdopodobnej liczby”.

Metodą seryjnych rozcieńczeń można określić ilość żywych bakterii jaka znajduje się w badanej próbce. Badanie wykonuje się sporządzając za pomocą roztworów izotonicznych rozcieńczenia badanego materiału w postępie geometrycznym, a kolejne rozcieńczenia posiewa się na podłożu agarowe w płytkach Petriego. Podczas inkubacji trwającej zazwyczaj 24-72 godziny tylko żywe, zdolne do podziału bakterie wyrosną na podłożu w postaci koloni (klonów komórki macierzystej obecnej w roztworze), które można policzyć. Uwzględniając liczbę kolonii, stopień rozcieńczenia i objętość inoculum, można obliczyć ilość żywych bakterii (CFU- ang. colony forming units) w 1 ml zawiesiny. Najistotniejszą wadę metody stanowi długi czas inkubacji. Jedną z prób częściowego ograniczenia tej wady i skrócenia czasu inkubacji była metoda przygotowania zawiesiny bakterii w ciekłym agarze i naniesienie w postaci kropli na środek płytki Petriego. Do policzenia rosnących w agarze mikrokolonii należało użyć soczewek powiększających /96/.

Modyfikacja metody, polegająca na mieszaniu danego rozcieńczenia badanej próbki z ostudzonym podłożem agarowym i posiewie zawiesiny na płytce Petriego, ma nadal zastosowanie do badania ogólnej liczby drobnoustrojów w żywności, wodzie /25/ i glebie /72/. Podobną zasadę badania ma inna metoda tzw. metoda „najbardziej prawdopodobnej liczby” (MPN), gdzie bakterie z każdego rozcieńczenia inkubuje się w kilku probówkach z selektywnym podłożem płynnym. Po inkubacji określa się ilość probówek z danego rozcieńczenia, w których zmętnienie podłoża świadczy o obecności i wzroście bakterii. Uwzględniając stopień rozcieńczenia i ilość pozytywnych prób dla różnych rozcieńczeń można określić MPN. Jest to metoda używana do określania ilości bakterii kałowych w próbkach wody /31/ oraz ilości drobnoustrojów w glebie /72/. Próby automatyzacji tego typu oznaczeń zaowocowały aparatami: Petrifoss firmy Foss electric AS, z Danii oraz Biotest wytwarzanego przez Biotest Diagnostics z Wielkiej Brytanii.

Kluczowym elementem metody filtrów membranowych jest zastosowanie filtrów z octanu celulozy o wielkości porów 0,45 μm , przez które przepuszcza się pod ciśnieniem roztwory płynne zawierające drobnoustroje. Wielkość porów pozwala przejść przez filtry tylko roztworowi, natomiast bakterie zostają zatrzymane. Po przesączeniu filtry inkubuje się na podłożach agarowych przez określony czas, a następnie zlicza ilość wyrosłych kolonii bakteryjnych /87/. Znając wyjściową objętość filtrowanej zawiesiny i ilość uzyskanych kolonii bakteryjnych można łatwo obliczyć ilość bakterii w 1ml. Metoda ta jest o wiele czulsza od metody seryjnych rozcieńczeń gdyż można oznaczyć niewielką ilość bakterii w dużych objętościach. Metoda ta jest zalecana do badania i oceny bakteriologicznej wody pitnej i płynów dializacyjnych /25/.

Istotnym elementem stosowanych metod analizy drobnoustrojów w hodowli jest, nie zawsze uświadamiane przez badaczy, ograniczenie w interpretacji wyników liczby komórek w próbce /113/. Ograniczenie to wynika z faktu, że nie wszystkie komórki w warunkach testu tworzą kolonie, a także nie wszystkie kolonie powstały z pojedynczych komórek w roztworze. Dlatego też celowe jest podawanie wyników oznaczeń jako liczbę CFU, a nie liczbę komórek w roztworze. W konsekwencji też reinterpretacji należałoby poddać pojęcie limitu detekcji w oznaczaniu liczby drobnoustrojów w hodowli.

1.1.1.1.3. Turbidymetria i nefelometria

Turbidymetria jest jedną z szeroko stosowanych metod służącą do określania ilości bakterii i ich biomasy. Jest metodą spektrofotometryczną wykorzystującą pomiar natężenia

światła, które przeszło przez ośrodek mętny (zawiesinę bakterii). Zmiana natężenia światła wywołana jest zjawiskami rozpraszania i adsorpcji /88/. Analizy turbidymetryczne opierają się na prawie Beer'a i wymagają porównania natężenia światła padającego na roztwór i wychodzącego z roztworu. Aby wyznaczyć liczbę drobnoustrojów w roztworze, należy skorzystać z uprzednio sporządzonej krzywej kalibracji zależności $\log I_0/I$ od stężenia drobnoustrojów w roztworze. Zależność ta jest prostoliniowa w wąskim zakresie stężeń. Wadę metody stanowi wrażliwość na warunki zewnętrzne, na zmianę odczynników, nieprawidłowe odpłukanie, co może wpłynąć na ciśnienie osmotyczne hodowli /31/.

Pomiary turbidymetryczne znalazły zastosowanie do wyznaczania najmniejszego stężenia hamującego (MIC-minimum inhibitory concentration) i najmniejszego stężenia bójczego (MBC-minimum bactericidal concentration), które określają wrażliwość drobnoustrojów na chemioterapeutyki i środki dezynfekcyjne /21, 3/.

Na pomiarach turbidymetrycznych opartych jest kilka komercyjnie dostępnych automatycznych urządzeń oznaczania antybiotykowrażliwości drobnoustrojów. Najczęściej stosowane są aparaty VITEK i VITEK2 firmy bioMerieux /21, 50, 92, 61/, które przy czułości $>7 \times 10^4$ CFU wymagają czasów inkubacji 4-18 godzin oraz MicroScan WalkAway firmy Dade Diagnostics Corp. /21, 92/.

Nefelometria podobnie jak turbidymetria wykorzystuje pomiar światła rozproszonego, które przeszło przez badaną próbkę z tą różnicą, że sam pomiar natężenia światła rozproszonego wykonywany jest pod kątem 90° w stosunku do wiązki padającej.

1.1.1.2. Specjalne techniki

1.1.1.2.1. Kolorymetria.

Zasada metod kolorymetrycznych jest oparta na pośrednim pomiarze wzrostu bakterii. Wykorzystuje się tu produkty przemiany materii, które powstają w wyniku wzrostu drobnoustrojów. Najczęściej jest to substrat niechromogenny, który pod wpływem działania specyficznego enzymu wytwarzanego przez drobnoustroje zostaje rozłożony do chromogennego produktu. Może być to również zmiana pH hodowli, która wpływa na zabarwienie indykatora obecnego w podłożu. Znalazły one zastosowanie do identyfikacji drobnoustrojów w komercyjnie dostępnych aparatach.

VITEK i VITEK2 firmy bioMérieux (najbardziej rozpowszechnione) /21, 50, 92, 61, 64/, MicroScan WalkAway firmy Dade Diagnostics Corp. /21, 92, 64/ to systemy do identyfikacji bakterii w których metody kolorymetryczne oparte na chromogenach i zmianie pH podłoża są podstawą różnicowania drobnoustrojów.

System MicroLog firmy Biolog Inc. umożliwia określanie gęstości hodowli bakterii oraz ich wzrostu w oparciu o redukcję błękitu nitrotetrazoliowego do formazonu /64, 61/. Natomiast systemy BactT/Alert firmy Organon Technika służący do detekcji drobnoustrojów we krwi /102, 114, 79/, i tej samej firmy MB/BacT stosowany do hodowli prątków gruźlicy /114/, oraz ESP Microbial Detection System (AccuMed International) wykorzystują pomiary kolorymetryczne zmian zabarwienia czułego wskaźnika obecnego w badanej próbce, na który pośrednio działa CO₂ wydzielany podczas wzrostu drobnoustrojów /102, 114/. W tym przypadku sensor umieszczony jest na dnie butli hodowlanej i oddzielony od hodowli bakteryjnej półprzepuszczalną membraną. Membrana ta jest nieprzepuszczalna dla jonów i wody, składników pożywki i krwi, umożliwia jednak swobodną dyfuzję dwutlenku węgla. CO₂ rozpuszczony w wodzie, którą nasycony jest sensor, generuje jony H⁺ w reakcji:



Jony wodoru powodują obniżenie pH i zmianę koloru sensora z ciemno zielonego na jasno zielony lub żółty. Detektorem sygnału jest fotodiody, która rejestruje zmianę natężenia światła czerwonego emitowanego przez diodę emitującą światło czerwone i odbitego od sensora. Sygnał z fotodiody jest proporcjonalny do stężenia CO₂ w hodowli /102/.

1.1.1.2.2. Immunofluorescencja.

Metoda ta znalazła szerokie zastosowanie w medycynie i detekcji drobnoustrojów *in situ* w ekologii. Zasada metody opiera się na specyficznym wiązaniu się przeciwciała z antygenem obecnym na powierzchni komórki drobnoustroju. Przeciwciała do tej metody uzyskiwane są od wcześniej immunizowanych zwierząt, a następnie sprzęgane z odpowiednim znacznikiem fluorescencyjnym np. izotiocyanianem fluoresceiny. Takim kompleksem fluorochrom-przeciwciała można poszukiwać antygeny występujące specyficznie na drobnoustrojach, które w ten sposób oznaczone fluoryzują w preparatach obserwowanych pod mikroskopem epifluorescencyjnym /31/.

Immunofluorescencja zaczyna odgrywać coraz większą rolę w klinicznej diagnostyce bakteriologicznej z zastosowaniem fluorescencyjnego cytometru przepływowego (FCM) /110, 91, 51, 13/. W cytometrze przepływowym komórki oznakowane odpowiednimi znacznikami fluorescencyjnymi przepływają w cieczy przez strumień światła. W zależności od długości fali absorbowanego światła i emitowanego światła fluorescencji można różnicować i identyfikować komórki. Komórki można dzielić na subpopulacje w zależności od występujących na ich powierzchni antygenów. Można też różnicować komórki martwe i żywe. Za pomocą cytometrii przepływowej udało się w ciągu 30 minut scharakteryzować komórki w heterogennej populacji bakterii o mianie 100 komórek/ml. Przy zastosowaniu FCM udaje się wykryć 10-100 komórek *E. coli* we krwi w ciągu 2 godzin /cytowane za 110/. Zastosowanie cytometru przepływowego skraca czas otrzymywania wyników antybiotykowrażliwości do 2-3 godzin dla *Escherichia coli* i do 24 godzin dla *Mycobacterium tuberculosis* /110, 60/. Istotnym ograniczeniem metody jest droga aparatura oraz ograniczona ilość specyficznych przeciwciał.

Metoda ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) oparta jest, tak jak i metoda immunofluorescencji, na specyficznym wiązaniu się przeciwciał do antygenów obecnych na komórkach drobnoustrojów. W tej metodzie przeciwciała wyznakowane są enzymem, który ma zdolność przekształcania, specyficznego dla niego, bezbarwnego substratu w barwny produkt. Ilość barwnego produktu odzwierciedla ilość poszukiwanego antygeny. Odmianą ELISA jest IRMA- (ang. immunoradiometric assay), gdzie przeciwciała są znakowane izotopem promieniotwórczym.

1.1.1.2.3. Radiometria.

W tej metodzie mikroorganizmy są hodowane na pożywkach, gdzie jeden z substratów jest znakowany radioaktywnym izotopem, najczęściej jest to ^{14}C . Mikroorganizmy żyjąc i dzieląc się w pożywce zużywają substrat a wydzielają $^{14}\text{CO}_2$, którego radioaktywność jest mierzona za pomocą licznika scyntylicyjnego i może być miarą aktywności metabolicznej bakterii. Metoda ta została zastosowana przez firmę Becton Dickinson Microbiology Systems w automatycznym urządzeniu służącym do wykrywania drobnoustrojów we krwi o nazwie BACTEC 460TB /79, 112/. Czułość metody jest na poziomie 10^7 komórek/ml, które wykrywa się w czasie 1,5-2,5 godziny, a w czasie 8-16 godzin można wykryć pojedynczą komórkę /31/. Podobne wyniki uzyskano z

zastosowaniem metody radiometrycznej przy oznaczaniu bakterii w próbkach wody i żywności.

1.1.1.2.4. Bioluminescencja.

Bioluminescencja wraz z chemiluminescencją należą do ważniejszych metod detekcji bakteryjnych patogenów. W przemyśle pomiary luminescencyjne umożliwiają w sposób ciągły monitorowanie procesów technologicznych. Metody bioluminescencyjne wykorzystują naturalną zdolność wielu organizmów do przekształcania energii chemicznej w światło. Wykorzystują w tym celu specjalne systemy np. (*lux*) *Vibrio harveyi* i *Vibrio fischeri* u bakterii czy też (*luc*) u owadów /54/. Systemy te zostały zaadaptowane dla potrzeb detekcji drobnoustrojów. Zaletą systemów detekcji opartych na analizie luminescencji jest ich duża czułość i szybkość /81/.

Podstawą zastosowań bioluminescencji do analiz wzrostu drobnoustrojów jest założenie, że w żywych komórkach jest stały poziom ATP, którego stężenie szybko zmniejsza się po śmierci komórki. Analiza ilości ATP prowadzona jest w oparciu o reakcję utleniania przeprowadzaną przez lucyferazę /31, 109/ według poniższego schematu:



Enzym ten w obecności tlenu i ATP, oprócz tworzenia utlenionej lucyferyny, AMP, CO₂ i pirofosforanu, powoduje emisję fotonów. Ilość fotonów jest proporcjonalna do ilości cząsteczek ATP. Ilość fotonów można zarejestrować za pomocą odpowiednich liczników /38/. Praktycznie wszystkie wiodące firmy mają w swojej ofercie gotowe zestawy odczynników do oznaczania stężenia ATP tą metodą. Obecnie dostępne automatyczne systemy do pomiarów bioluminescencji to: Lumac Biocounter firmy Lumac B.V. oraz Unilite (Biotrace Ltd) /31/. Na podobnej zasadzie działa opracowany przez firmę Promega Corporation aparat BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability przeznaczony do określania antybiotykowrażliwości bakterii /19/. Sakakibara i wsp. /85/ wykazali, że ilość ATP wytwarzana przez bakterie o mianie 10⁴ CFU/ml (ok. 10⁻¹⁴ M ATP) wystarcza do detekcji tych drobnoustrojów za pomocą luminometru. Wzbogacając test o system regeneracji ATP można 10000 razy zwiększyć czułość detekcji drobnoustrojów. W ten sposób można było stwierdzić obecność pojedynczej komórki bakterii /85/.

Chemiluminescencja, wprawdzie mniej czuła niż bioluminescencja, która wymaga obecności enzymów i ATP do generowania kwantów światła, jest jednak znacznie prostsza w wykonaniu. Pozbawiona jest też szeregu mankamentów, które związane były z koniecznością usuwania pozakomórkowego ATP, inaktywacją enzymów hydrolizujących ATP czy też ekstrakcją wewnątrzkomórkowego ATP /14, 20/. Reakcja chemiluminescencji zachodzi wówczas, gdy cząsteczki zdolne do chemiluminescencji (np. luminol) są utleniane w obecności katalizatora i powstaje niestabilne, wzbudzone stadium pośrednie, które ostatecznie ulega dezaktywacji dając końcowy produkt reakcji z równoczesną emisją światła. Utleniaczem w tej reakcji jest najczęściej nadtlenek wodoru, a katalizatorami jony metali lub enzymy np. peroksydaza z chrzanu lub alkaliczna fosfataza. W celu specyficznej detekcji bakterii w próbce (chemiluminescencję wykorzystuje się najczęściej do detekcji bakterii w produktach żywnościowych) stosuje się kombinację chemiluminescencji z testem immunologicznym. Pierwszorzędowe przeciwciała wiążą patogeny i immobilizują je w ten sposób na stałej powierzchni membrany, kulkach magnetycznych czy też w dołku płytki titracyjnej. Przeciwciała drugorzędowe, sprzęgnięte z enzymem, rozpoznają kompleks patogen-przeciwciało wiążące i reagują z antygenami na powierzchni drobnoustroju. Enzym związany z przeciwciałem drugorzędowym katalizuje właściwą reakcję chemiluminescencji tj. utleniania cząsteczek substratu zdolnego do chemiluminescencji dodanych do mieszaniny reakcyjnej. Opisaną technikę użyto do detekcji *Escherichia coli* O157:H7 w mielonym mięsie wołowym z limitem detekcji 10^3 CFU/ml /20/. Zastosowanie etapu wzbogacania przez pięciogodziną inkubację w temp. 37°C obniża limit detekcji do 1 CFU/g mięsa.

1.1.1.2.5. Metoda filtracji z epifluorescencją.

Jest jedną z najlepiej rozwijających się metod w mikrobiologii środowiskowej /72, 90/. Metoda znajduje szerokie zastosowanie w wykrywaniu mikroorganizmów w mleku i produktach mleczarskich /88/. Do badanej próbki dodaje się fluorochromu (oranz akrydynowy) lub ostatnio częściej DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenylindol) /90, 30, 77/, a następnie sączy pod ciśnieniem przez filtry membranowe. Komórki zatrzymane na membranie pod wpływem UV fluoryzują, co umożliwia ich policzenie za pomocą mikroskopu epifluorescencyjnego.

1.1.1.2.6. SPR-Powierzchniowy rezonans plazmonowy.

Począwszy od pierwszej demonstracji detekcji przez Nylandera i Lidberga w 1983 roku za pomocą tej techniki, SPR (ang. Surface plasmon resonance) stał się jedną z najważniejszych nowoczesnych metod analizy oddziaływań międzymolekularnych w biologii molekularnej i medycynie /29, 98/. SPR pozwala na mierzenie w czasie rzeczywistym bardzo małych zmian stężenia analitów przy powierzchni sensora przez monitorowanie zmian intensywności światła odbitego na granicy szkła z napyłoną warstwą metalu. Intensywność światła zależy z kolei od współczynnika załamania ośrodka, który wpływa na propagację powierzchniowej fali plazmonowej polegającej na oscylacjach gęstości ładunku na granicy metalu i dielektryka pod wpływem fali elektromagnetycznej /29/. Obecnie większość komercyjnie dostępnych platform pomiarowych wykorzystuje w module czynnym biosensora pryzmat i zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia oraz modulację bądź to długości fali bądź też modulację kąta padania światła. Najlepsze z nich osiągają zdolność rozdzielczą poniżej 5×10^{-7} RIU (ang. refractive index unit). Metoda ta szybko znalazła liczne zastosowania w diagnostyce klinicznej /39, 52/, analizie leków /17/ monitorowaniu środowiska i żywności /32, 42, 111/. Wydaje się również, że SPR będzie jedną z najważniejszych metod analitycznych mikrobiologii w przyszłości. Pozwala ona stwierdzać obecność drobnoustrojów (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* ssp., *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus* i innych) w próbkach klinicznych i pożywieniu z limitem detekcji na poziomie 10^4 - 10^6 CFU/ml /100, 99, 94, 42, 36/ chociaż donosi się również, że limit ten może być niższy i wynosi 10^2 CFU/ml /66, 65/. Kia i wsp. pokazali, że SPR (Biacore 2000) umożliwia detekcję oligonukleotydów, które powstały w wyniku asymetrycznej amplifikacji PCR genetycznego markera *E. coli* O157:H7 dla podjednostki A verotoksyny-2 /37/, a Miyachi i wsp. dokonali detekcji genu wirulencji *invA* *Salmonella* /59/. Demonstrowano również skuteczną detekcję przeciwciał w surowicy zwierząt, które przeszły infekcję bakteryjną /35, 101/.

1.1.1.2.7. Detekcja masy z użyciem biosensorów wykorzystujące ultracienkie dźwignie.

Submikronowe dźwignie (ang. microcantilever beams) zostały po raz pierwszy użyte jako sensory do analizy sił w mikroskopii sił atomowych (AFM- ang. atomic force microscopy). Od tego czasu stały się jednym z najbardziej spektakularnych przykładów postępu i możliwości systemów mikroelektromechaniki. Znajdują szerokie zastosowania

między innymi do analiz oddziaływań międzycząsteczkowych między ligandami i receptorami, antygenami i przeciwciałami, hybrydyzacji DNA, adhezji komórek, pomiarów pH i wilgotności, wyznaczania masy komórek i wirusów. Przykładem tego typu oznaczeń mogą być eksperymenty dotyczy to wyznaczania suchej masy komórek *Listeria innocua* /26/. W eksperymentach tych wykazano, że niespecyficzne związanie ok. 180 komórek bakterii powoduje przesunięcie rezonansowej częstotliwości o 1 kHz (dynamiczny typ detekcji), a sucha masa komórki oceniana jest na ok. 85 fg. W podobnych eksperymentach, w których bakterie wiązano specyficznie za pośrednictwem przeciwciał, przesunięcie częstotliwości rezonansowej było równe ok. 500 Hz, a ilość związanych komórek bakterii wynosiła 80. Wyznaczając przeciętną masę spor *Bacillus subtilis* w powietrzu uzyskano wartość 367 ± 135 fg, podczas gdy wartość przewidywana powinna się mieścić w granicach 300-500 fg /26/. Średnia masa cząstek wirusa *Vaccinia* wyznaczona w taki sposób jest równa 9,5 fg. Wartość przewidywana mieści się w przedziale 5-8 fg /6/.

1.1.1.2.8. Licznik Coulter'a

Aparat wyprodukowany przez Culter Electronics Inc. pozwala wyznaczyć liczbę bakterii w płynnym podłożu wzrostowym. Bakterie przechodząc przez otwór w aparacie powodują zmianę oporu między dwiema elektrodami o różnych potencjałach, co generuje impuls prądowy. Liczba zliczanych impulsów daje informację o liczbie bakterii w zawieszynie. Warunkiem prawidłowego pomiaru jest brak nierozpuszczalnych składników pożywki oraz niezbyt duża gęstość hodowli.

1.1.1.2.9. Elektroniczna analiza cząsteczek.

Zasada opiera się na monitorowaniu zachowania się cząstki w polu elektrycznym. Pozwala ona w krótkim czasie na określenie ilości i rozmiarów cząsteczek w badanej próbce. Wadą metody jest brak różnicowania organizmów żywych i martwych. Automatyczne urządzenie wykorzystujące tę metodę do szybkiej analizy próbek moczu zostało wyprodukowane przez Orbec Ltd. pod nazwą RAMUS 265.

Metoda **ERA** (ang. electrorotation assay) wykorzystuje różnicę w szybkości rotacji w polu elektrycznym ziaren polistyrenowych opłaszczonych specyficznymi przeciwciałami oraz ziaren, do których za pośrednictwem przeciwciał przyłączone są drobnoustroje. Rotację wywołują zmieniające się cyklicznie zmiany napięcia przyłożonego do czterech

elektrod zlokalizowanych w wierzchołkach kwadratu. Metoda pozwala na stwierdzenie obecności pojedynczych komórek na powierzchni ziaren polistyrenowych.

1.1.1.2.10. Metody akustyczne.

Metody oparte na wykorzystaniu fal akustycznych obejmują szeroką gamę urządzeń, których konstrukcja i działanie zależy od sposobu rozchodzenia się fali: TSM (ang. transverse shear mode) np. kwarcowe mikrowagi (ang. quartz crystal microbalances), SAW (ang. surface acoustic wave), STW (ang. surface transvers wave) i inne /67/.

Biosensor TSM

Ten typ biosensora może być użyty do wykrywania bardzo małych mas. Pomiar bazuje na wykorzystaniu zjawiska piezoelektrycznego w kryształach kwarcu, którego częstość rezonansowa zależy od masy rezonatora. Rozmieszczenie dodatkowej masy na powierzchni kryształu kwarcu powoduje zmianę (zmniejszenie) częstości rezonansowej drgań kryształu. Biosensory tego typu znalazły szerokie zastosowanie do detekcji drobnoustrojów w monitorowaniu środowiska, diagnostyce medycznej i farmacji, przemyśle spożywczym, ochronie przed bioterroryzmem /44, 73, 47, 93/. Specyficzność detekcji osiąga się przez naniesienie na kryształ kwarcu odpowiedniego receptora, którym mogą być przeciwciała skierowane przeciwko antygenom drobnoustroju. Lista przykładowych zastosowań biosensorów TSM do detekcji drobnoustrojów i ich komponentów jest długa, a czułość osiąga poziom nawet 10 komórek na ml /67/. Biorąc pod uwagę fakt, że systemy wykorzystujące biosensory TSM są stosunkowo tanie i bardzo czułe, metody wykorzystujące fale akustyczne stały się jednymi z najważniejszych metod detekcji drobnoustrojów, które umożliwiają kontrolę drobnoustrojów w czasie rzeczywistym. Na rynku jest obecnie szereg gotowych aparatów do akustycznej detekcji drobnoustrojów: RQCM (Maxtec, Inc.; E4 QCM-D (Q-Sense); CQCM (QCM Research); PZ-105 (Universal System, Inc.); QCM-2500 (KSV Instruments, Ltd) i inne.

1.1.1.2.11. Mikroskopia elektronowa.

Mikroskop elektronowy, mając większą zdolność rozdzielczą niż mikroskop świetlny, pozwala na dokładniejsze poznanie morfologii komórek drobnoustrojów, ale ze względu na cenę, czas przygotowania próbek oraz duże umiejętności operatora praktycznie

nie nadaje się do oceny masy bakteryjnej. Użycie mikroskopu elektronowego do oceny liczby drobnoustrojów jest jednak potrzebne przy kalibracji innych metod badawczych /26/.

1.1.1.2.12. Detekcja komponentów komórkowych.

Metody oparte na analizie komponentów komórkowych mikroorganizmów: lipidów, wielocukrów, białek i kwasów nukleinowych mają ogromne znaczenie w ustalaniu cech fenotypowych i genetycznych drobnoustrojów są, więc niezbędne do identyfikacji drobnoustrojów. Znacznie mniej przydatne są jednak do określania biomasy drobnoustrojów, ponieważ procedura izolacji i oczyszczania jest często długotrwała, kosztowna i wymaga dużego zaawansowania laboratoryjnego. W szczególnych przypadkach metody te pozwalają jednak ustalić liczbę komórek (np. PCR).

Analiza kwasów tłuszczowych.

Metoda ta opiera się na izolacji i analizie kwasów tłuszczowych obecnych w błonach mikroorganizmów co pozwala zidentyfikować drobnoustroje. Analiza tego typu została wykorzystana przez firmę Midi Inc. w automatycznym systemie MIDI- Sherlock Microbial Identification System /50, 92, 61/. Obecne w komórkach kwasy tłuszczowe zostają przekształcone w estry metylowe tych kwasów, które następnie się rozdziela i identyfikuje za pomocą chromatografii gazowej. Porównując wyniki rozdziałów z odpowiednimi bazami danych przeprowadza się identyfikację bakterii, grzybów oraz prątków. Podstawowym mankamentem systemu jest konieczność izolacji kwasów z czystych hodowli.

Metody wykrywające kwasy nukleinowe.

Detekcja kwasów nukleinowych, która w ostatnich latach jest coraz szerzej stosowana i powoli wkracza też do laboratoriów klinicznych oparta jest na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) /53, 43, 9, 24, 4/ oraz hybrydyzacji sond oligonukleotydowych komplementarnych do określonych sekwencji /90, 2/.

W reakcji polimeryzacji wykorzystuje się polimerazę DNA pochodzącą z termofilnych drobnoustrojów, która wykorzystując odpowiednie substraty i w odpowiednich warunkach jonowych przeprowadza syntezę DNA. Limit detekcji, oceniany

przez ilość wyjściowych kopii matrycowego DNA, wynosi mniej niż 10 komórek drobnoustroju. Sekwencjonowanie produktów PCR /53/ jest najlepszym sposobem identyfikacji drobnoustrojów. Firma Perkin-Elmer Applied Biosystems Division wprowadziła na rynek aparat Micro Seq500, który obecność oraz różnicowanie bakterii opiera na amplifikacji i sekwencjonowaniu fragmentu DNA odpowiedzialnego za kodowanie 16S rRNA, a w szczególności pierwszych 527 zasad /108, 27/. Jeśli do reakcji amplifikacji użyje się równocześnie zestawu różnych starterów (multiplex PCR) możliwa jest równoczesna identyfikacja w badanej próbce różnych drobnoustrojów.

Coraz częściej wykorzystuje się metodę Real-Time PCR czyli reakcję PCR w czasie rzeczywistym. Jest to metoda, w której monitoruje się przyrost ilości produktu w czasie rzeczywistym poprzez ocenę ilości powstających amplikonów. Pomiaru ilości produktów dokonuje się fluorymetrycznie rejestrując natężenie światła fluorescencji emitowanej przez znakowany fluorescencyjnie produkt amplifikacji /53, 4/. Znakowany produkt amplifikacji można uzyskać stosując barwnik (np. SYBR Green lub SYBR gold) niespecyficznie interkalujący w DNA /23/. Limit detekcji w tym przypadku jest na poziomie 1-5 CFU/ml. Fluorescencyjne technologie obejmują również użycie bardziej specyficznych sond, które pozwalają śledzić przebieg amplifikacji specyficznych sekwencji w czasie rzeczywistym (RTPCR). Do sond tego typu należą sondy TaqMan (5'egzonukleaza), sondy wykorzystujące zjawisko rezonansowego przeniesienia energii (FRET), Molecular Beacons i sondy Scorpion /53, 22, 4, 12, 104/. Różnią się one mechanizmem generowania sygnału, ale w każdym przypadku sygnał ten jest proporcjonalny do ilości produktu PCR.

1.1.2. Metody bioelektrochemiczne.

Metody bioelektrochemiczne stanowią grupę metod, z którymi wiązano duże nadzieje /31/. Najnowsze monografie poświęcone biosensorom i nowym technologiom świadczą jednak, że nadzieje te pozostały niespełnione i obecnie klasyczne metody bioelektrochemiczne pełnią marginalną rolę w procesach detekcji drobnoustrojów /113/. Brak jest znaczących prac ilustrujących praktyczne zastosowania tych metod, a nieliczne doniesienia poświęcone detekcji drobnoustrojów świadczą o tym, że ustępują one znacznie czułością detekcji innym metodom. Dotyczy to takich metod elektrochemicznych jak: potencjometria, komórki paliwowe, voltamperometria cykliczna i zmiennoprądowa prostokątna. Stosowane są nadal i rozwijane w zmodyfikowanej formie pomiary

impedancji i przewodności /58/ oraz w mniejszym stopniu pomiary amperometryczne (np. ITO/Pani biosensor) /1/.

1.1.2.1. EIS (elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna).

Przepływ prądu zmiennego przez próbki biologiczne napotyka na opór zależny od wartości oporu omowego i pojemnościowego mierzonych próbek (induktancja w strukturach biologicznych nie występuje). Wcześniejsze prace wskazywały, że impedancja hodowli znacząco zwiększa się gdy miano bakterii w hodowli osiąga wartość ok. 10^6 - 10^7 CFU/ml /31/. Obecnie do detekcji drobnoustrojów wykorzystuje się immunobiosensory, które działają w oparciu o pomiary impedancji. W tym celu powierzchnia elektrod jest modyfikowana przez naniesienie biologicznego receptora, który wiążąc drobnoustroje wpływa na mierzoną wartość impedancji. Zmiany impedancji mają związek ze zmianą pojemności interfejsu, oporu omowego, na który napotykają płynące elektrony oraz przewodności środowiska /58/. Dostępne na rynku komercyjne urządzenia to Bactometer[®] (Biomerieux), BacTrac[®] (Sy-Lab), Malthus System (Malthus Instruments) i RABIT[®] (Don Whitley Scientific) wykorzystują tradycyjne pomiary impedancji. Nowsze i szybsze techniki specyficznego rozpoznawania biomakromolekuł i drobnoustrojów wymagają stosowania impedancyjnych immunobiosensorów /58/

1.2. Technika respirometrii oparta na gaszeniu fluorescencji sensora tlenowrażliwego.

Metody omówione powyżej mają szereg wad: są skomplikowane, zastosowanie ich pochłania dużo czasu, wymagają złożonej i czasochłonnej obróbki próbki przed badaniem, niektóre z nich wykorzystują drogą aparaturę i odczynniki. Dlatego też wykorzystanie większości z tych metod do rutynowych badań praktycznie nie jest możliwe. Niektóre z metod np. metoda kalorymetryczna czy też metoda komórki paliwowej całkowicie wyszły z użycia i dają jedynie teoretyczną możliwość zastosowań praktycznych.

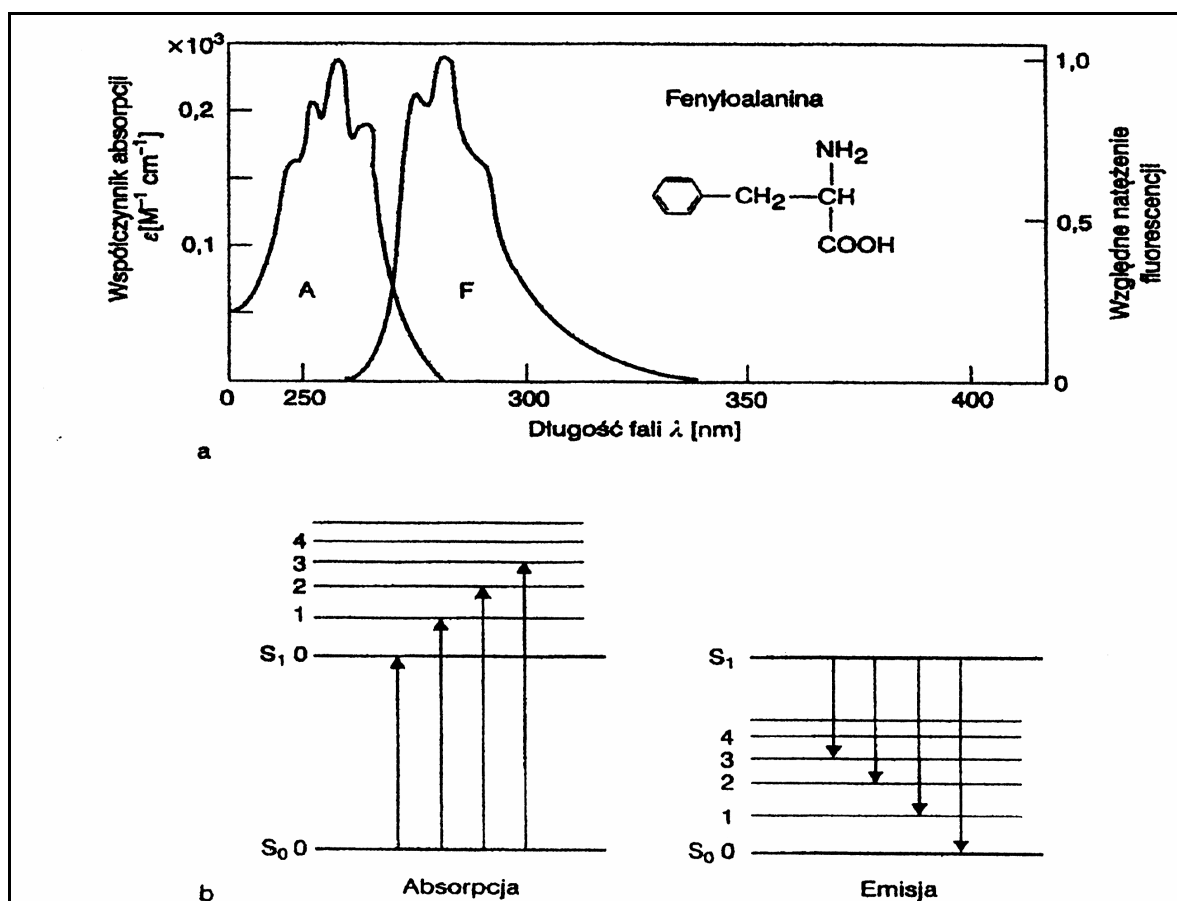
Istniejące układy automatyczne pozwalają stwierdzić obecność drobnoustroju w badanej próbce, lub służą do ich identyfikacji. Nie są one przydatne do analizy w czasie rzeczywistym zachowania się hodowli pod wpływem działania różnych czynników fizykochemicznych, które wpływają na szybkość metabolizmu drobnoustrojów. W wielu przypadkach wykonanie analiz wymaga nieodwracalnej destrukcji próbki. Ostatnio

zaproponowano nową metodę analizy wzrostu drobnoustrojów w hodowlach za pomocą tzw. respirometrii optycznej [107]. W metodzie tej wykorzystuje się analizę fluorescencji biosensora tlenowrażliwego, którego fluorescencja zależy od ilości tlenu w próbce badanej. Tlen cząsteczkowy wygasza fluorescencję. Mikroorganizmy rosnąc w hodowli zużywają tlen wpływając tym samym na intensywność fluorescencji próbki. Analizując zmianę natężenia fluorescencji w hodowlach można więc śledzić aktywność metaboliczną drobnoustrojów.

1.2.1. Fizyczne postawy fluorescencyjnej respirometrii optycznej.

Luminescencja jest zjawiskiem świecenia materii stałej, ciekłej lub gazowej w wyniku nietermicznego pobudzenia molekuł. W zależności od rodzaju energii wzbudzającej świecenie molekuł luminescencję można podzielić na elektroluminescencję, chemoluminescencję, mechanoluminescencję i fotoluminescencję. Fotoluminescencja to świecenie pod wpływem absorpcji kwantów światła przez wzbudzone molekuly. W zależności od kinetyki procesu emisji światła i rodzaju przejść elektronowych w cząsteczkach możemy wyróżnić dwa typy luminescencji: fluorescencje i fosforescencję.

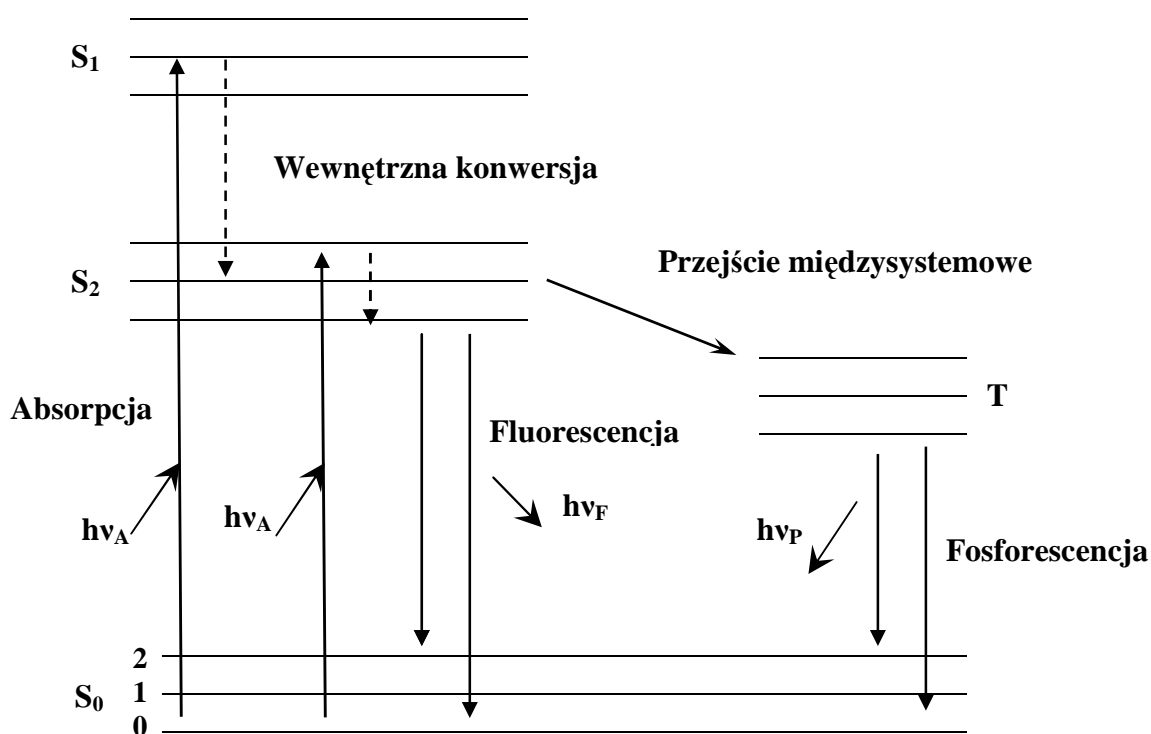
Analiza widm absorpcji i fluorescencji cząsteczek pozwala stwierdzić, że w większości przypadków widma fluorescencji są przesunięte w kierunku fal dłuższych w stosunku do widm absorpcji, jest to tzw. przesunięcie stokesowskie. Często też zdarza się, że widma absorpcji i emisji stanowią lustrzane odbicia. Ilustracją tych zależności mogą być widma absorpcji i fluorescencji fenyloalaniny przedstawione na rys. 1a.



Rys. 1. Schemat przedstawia przesunięcie stokesowskie widma fluorescencji względem widma absorpcji i symetrię zwierciadlaną obu widm (a) oraz odpowiadające im przejścia elektronowe (b) wg /34/.

Opisane własności widm absorpcji i fluorescencji można przewidzieć w oparciu o analizę poziomów energetycznych fluoryzujących molekuł i przejść elektronowych w tych cząsteczkach (rys.1b).

Absorpcja kwantów światła w czasie 10^{-15} s prowadzi do obsadzenia dowolnych poziomów oscylacyjnych singletowych stanów S_1 , S_2 itd. Wzbudzone molekuły dążą do przyjęcia najbardziej stabilnego energetycznie stanu z minimum energii potencjalnej i dlatego, w bardzo krótkim czasie (10^{-12} s), oddają bezpromieniście nadmiar energii obsadzając elektronem najniższy poziom oscylacyjny stanu S_1 . Ten proces bezpromienistej dezaktywacji, zachodzący w obrębie stanów o danej multipletowości znacznie szybciej niż przejścia promieniste, nosi nazwę wewnętrznej konwersji energii (ang. internal conversion) (rys. 2).



Rys. 2. Uproszczona wersja schematu Jabłońskiego. S₀, S₁ i S₂ to singletowe poziomy podstawowe i wzbudzone, T – najniższy wzbudzony poziom tripletowy, przerywana pionowa linia oznacza przejście bezpromienne, a $h\nu_A$, $h\nu_F$, $h\nu_P$, energie kwantów absorpcji i emisji fluorescencji i fosforescencji wg /34/

Emisja kwantów fluorescencji ma miejsce przy przejściu elektronu z najniższego poziomu oscylacyjnego singletowego stanu S₁ do stanu podstawowego S₀. Czas życia fluorescencji to na ogół 10⁻⁹-10⁻⁸s, zatem szybki proces wewnętrznej konwersji energii powoduje, że emisja fluorescencji odbywa się z termodynamicznie zrównoważonego stanu wzbudzonego. Alternatywną drogą dezaktywacji stanu wzbudzonego może być zamiast przeskoku elektronu z S₁ do S₀ przeskoku elektronu z któregoś ze wzbudzonych stanów singletowych na jeden z poziomów tripletowych T₁, T₂ itd. Proces taki - przejście międzysystemowe (ang. intersystem crossing) zachodzi z mniejszym prawdopodobieństwem, ponieważ jest to przejście między stanami o różnej multipletowości. Jedynie w przypadkach, gdy różnica energii między stanami singletowymi i tripletowymi jest niewielka, przejście intersystemowe może konkurować z procesem fluorescencji. Czasy życia molekuł w tripletowym stanie T₁ są znacznie dłuższe i wynoszą od ok. 10⁻⁶ s do 1 s. Ma to związek z faktem, że przejście z T₁ do S₀ jest formalnie

wzbronione i zachodzi z mniejszym prawdopodobieństwem. Dezaktywacji stanu T_1 do S_0 na drodze promienistej towarzyszy emisja światła fosforescencji. Bardzo istotną konsekwencją długich czasów przebywania molekuł w tripletowym stanie T_1 jest to, iż rośnie prawdopodobieństwo, że cząsteczki takie oddadzą energię w sposób bezpromienisty, a nie w postaci światła fosforescencji - nastąpi wygaszenie fosforescencji. Depopulację wzbudzonego stanu tripletowego T_1 można przeprowadzić również na drodze tzw. fluorescencji opóźnionej. Odbywać się to może w wyniku termicznego wzbudzenia molekuł w stanie tripletowym i przejściem $T_1 \rightarrow S_1$ z emisją kwantów fluorescencji (fluorescencja opóźniona typu E) bądź też w wyniku anihilacji stanów tripletowych wywołanych zderzeniem dwóch molekuł w stanie tripletowym (fluorescencja opóźniona typu P).

1.2.2. Wygaszanie stanów wzbudzonych.

Dezaktywacja stanów wzbudzonych może zachodzić na różne sposoby: przez emisję promieniowania (fluorescencja, fosforescencja), na drodze reakcji fotochemicznych, przez przeniesienie energii do innej cząsteczki oraz w sposób bezpromienisty. Różne też czynniki mogą powodować zmniejszenie natężenia fluorescencji badanych substancji. Proces taki określa się jako gaszenie fluorescencji a cząsteczki biorące udział w tym procesie są wygaszaczami. Procesy gaszenia są procesami dwucząsteczkowymi, które wymagają bliskiego kontaktu cząsteczek wygaszanych i cząsteczek wygaszających. Rozróżnia się dwa rodzaje wygaszania: statyczne, które jest charakterystyczne dla polimerów i szkliv oraz dynamiczne zachodzące w płynach i gazach. Różnią się one kinetyką zaniku luminescencji. Podczas gaszenia dynamicznego, zależnego od stężenia dyfundujących molekuł, czas życia luminescencji skraca się wraz ze wzrostem stężenia wygaszacza. Prowadzi to w efekcie do zmniejszenia wydajności kwantowej i natężenia emisji światła luminescencji. Zależność natężenia luminescencji i czasów życia od stężenia wygaszacza opisuje równanie Sterna-Volmera:

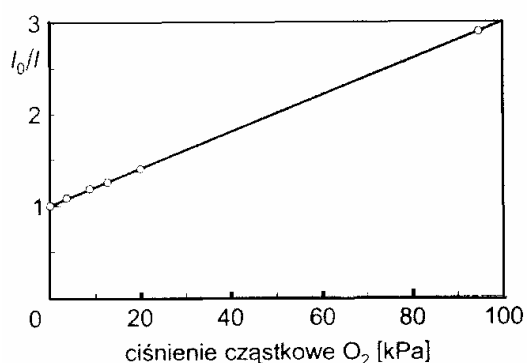
$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K[Q] \quad \text{wzór 1}$$

Gdzie:

I_0 i I oraz τ_0 i τ są odpowiednio natężeniem luminescencji i czasem życia bez wygaszacza i w obecności wygaszacza. K to stała Sterna-Volmera, a Q - stężenie wygaszacza.

Odstępstwa od liniowej zależności $I_0/I = f [Q]$ i $\tau_0/\tau = f [Q]$ świadczą o bardziej złożonym mechanizmie wygaszania niż typowe dynamiczne wygaszanie, dla którego zależności te byłyby liniowe.

Jednym z najważniejszych wygaszaczy jest tlen cząsteczkowy, który zderzając się ze wzbudzoną molekułą fluoroforu wygasza fluorescencję i powoduje powrót fluoroforu do stanu podstawowego bez emisji kwantów fluorescencji. Rys. 3 przedstawia liniową zależność I_0/I od ciśnienia tlenu cząsteczkowego, która świadczy o czysto zderzeniowym charakterze procesu wygaszania.



Rys. 3. Liniowa zależność Sterna-Volmera I_0/I od ciśnienia parcjalego tlenu dla sensora zawierającego dekacyklen /97/.

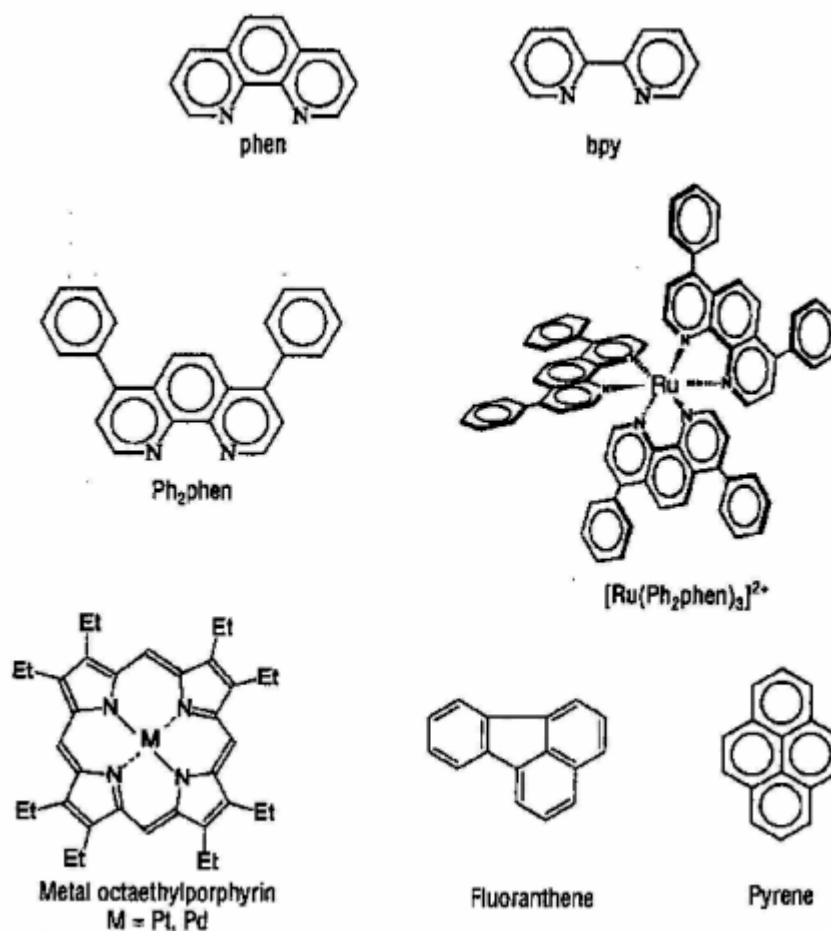
Proces wygaszania jest szczególnie efektywny w przypadku molekuł charakteryzujących się długimi czasami życia stanów wzbudzonych. Tym też należy tłumaczyć trudności z rejestracją fosforescencji w temperaturach pokojowych. Powszechnie obecny tlen praktycznie całkowicie wygasza fosforescencję w tych warunkach. Rejestracja i analiza fosforescencji staje się możliwa w niskich temperaturach. Na przykład, aby wzmacniające ekrany fosforyzujące stosowane do autoradiografii były skuteczne, kasety do autoradiografii ekspozować należy w temp. -80°C . Istotnie, skuteczność tlenu jako wygaszacza ma związek z dużą wartością współczynnika dyfuzji tlenu w wodzie, która w temp. 25°C jest równa $2,5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$. W czasie 10^{-8} s , porównywalnym z czasami życia wzbudzonych molekuł na poziomie S_1 , cząsteczka tlenu przebędzie drogę ok. 7 nm /86/.

1.2.3. Biosensory tlenowrażliwe

Biosensory mikrobiologiczne są urządzeniami wykorzystującymi mikroorganizm sprzężony z odpowiednim przekaźnikiem, który umożliwia bardzo czułą detekcję badanych analitów. Elementem wrażliwym na stężenie analitu jest w tym przypadku mikroorganizm lub komórka organizmu czy tkanka, lecz również makromolekuły - kwasy nukleinowe, enzymy czy przeciwciała. Przełącznik zamienia sygnał z takiego biologicznego czujnika na sygnał prądowy, zmianę potencjału czy sygnał świetlny, który może być następnie wzmacniany i rejestrowany za pomocą konwencjonalnych mierników /40, 48/. Biosensory wykorzystujące mikroorganizmy znalazły szerokie zastosowania w różnych dziedzinach, między innymi w monitorowaniu środowiska, medycynie i produkcji żywności /48, 57/. Biosensory tlenowrażliwe /15, 11/, podobnie jak biosensory oparte na detekcji produktu oddychania - CO₂ /103, 102/, dostarczają informacji o przebiegu metabolizmu i wzroście hodowli bakterii i grzybów. Umożliwiają tym samym uzyskanie informacji o czynnikach, które zaburzając metabolizm mikroorganizmu wpływają na szybkość respiracji - zużywanie tlenu i produkcję dwutlenku węgla.

Fizyczną podstawę funkcjonowania biosensorów tlenowrażliwych stanowi zjawisko gaszenia fosforescencji przez tlen cząsteczkowy. Unikalną cechą tlenu jest to, że stan podstawowy tlenu jest stanem tripletowym z dwoma niesparowanymi elektronami na orbitalach π^* /34/, co czyni go najbardziej rozpowszechnionym wygaszaczem paramagnetycznym. W tym stanie tlen wykazuje niską reaktywność i dopiero wzbudzenie do stanu singletowego ¹O₂*, które ma miejsce w czasie gaszenia fluoroforów, zwiększa reaktywność tlenu. Wzbudzony tlen singletowy występuje w dwóch stanach S₁ i S₂ różniących się czasami życia odpowiednio 2x10⁻⁶ i <10⁻¹¹ s. Ze względu na bardzo krótki czas życia S₂ reaktywną formą pozostaje singletowy tlen S₁ /34/.

Obecnie do najbardziej cennych biosensorów tlenu należą kompleksy metali Ru (II) oraz Pt(II) i Pd(II) z fenantroliną i porfirynami (rys. 4) /18, 33, 68, 69, 70/.



Rys. 4. Reprezentatywne cząsteczki stosowane jako biosensory tlenu wg /18/.

Najważniejszą zaletą tych kompleksów są długie czasy życia, które w przypadku kompleksów platyny i palladu z porfirynami osiągają setki mikrosekund, a w przypadku kompleksów rutenu fenantroliną setki nanosekund i mikrosekundy. Wzbudzone mogą być w zakresie widzialnym, mają duże wydajności kwantowe i wykazują duże przesunięcia stokesowskie. Znacząco upraszcza to wykonanie eksperymentu. Metale w kompleksach (efekt ciężkiego atomu) zwiększając sprzężenie spin-orbita ułatwiają przejścia międzysystemowe i obsadzenie poziomów tripletowych. Umożliwia to rejestrację fosforescencji biosensorów w temperaturach pokojowych. Ze wzrostem czasu życia stanów wzbudzonych (stany tripletowe) zwiększa się również wpływ wygaszacza.

2. Cel pracy.

Analizy wzrostu mikroorganizmów w hodowlach pozostają nadal jedną z podstawowych metod badań w laboratoriach badawczych, biotechnologicznych, klinicznych i przemysłowych, gdzie wytwarzane są nowe generacje środków leczniczych, białka o nowych właściwościach, zmodyfikowane metodami inżynierii genetycznej, szczepionki rekombinacyjne, optymalizuje się procesy fermentacji, bada skuteczność działania chemioterapeutyków, konserwacji podłoży i środków farmaceutycznych.

Badania prowadzone w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej AMG nad aktywnością nowych związków chemicznych, syntetyzowanych w jednostkach badawczych współpracujących z nami, oparte są na standardowych metodach oznaczeń wrażliwości drobnoustrojów na chemioterapeutyki. W tradycyjnych metodach, badania napotykają na trudności zwłaszcza, gdy liczba prób jest duża, oraz gdy właściwości fizykochemiczne mogą w sposób istotny wpływać na wyniki badań. Jedną z istotnych wad tych metod jest również to, że ilość uzyskiwanych informacji jest ograniczona. Odnosi się to przede wszystkim do wpływu na drobnoustroje stężeń niższych od minimalnych stężeń hamujących wzrost drobnoustrojów. Trudności te mogą być przezwyciężone w wyniku zastosowania nowej zautomatyzowanej metody fluorescencyjnej respirometrii optycznej.

Celem pracy jest wykazanie przydatności respirometrii opartej na gaszeniu fluorescencji sensora tlenowrażliwego do badań nad optymalizacją warunków hodowli drobnoustrojów, w badaniach działania chemioterapeutyków i środków toksycznych na bakterie i komórki eukariotyczne.

W tym celu należy:

1. Zaprojektować i skonstruować układ pomiarowy, wykorzystujący system zliczania pojedynczych fotonów emitowanych przez fluoryzujące molekuly sensora tlenowrażliwego.
2. Zsyntetyzować biosensor, którego działanie jest oparte na wykorzystaniu zjawiska gaszenia fluorescencji przez tlen cząsteczkowy.
3. Przeprowadzić charakterystykę funkcjonowania układu pomiarowego i ocenić jego przydatność do analiz wzrostu drobnoustrojów i wpływu różnych związków chemicznych na mikroorganizmy.

3. Materiały i metody.

3.1. Materiały

3.1.1. Biosensor tlenowrażliwy:

- Sensor tris 4,7-difenylo-1,10-fenantrolino dichlorek rutenu (II) ($\text{Ru}(\text{DPP})_3\text{Cl}_2$), otrzymany wg zmodyfikowanej procedury Watts'a i Crosby'ego (metody punkt 3.2.1).

3.1.2. Szczepy mikroorganizmów.

Do badań użyto:

- *Escherichia coli* ATCC 8739. Szczep jest wrażliwy na ampicylinę i trimetoprim/sulfametaksazol. Szczep pochodzi z kolekcji szczepów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu.
- *Escherichia coli* 6002. Otrzymano dzięki uprzejmości Zakładu Mikrobiologii Klinicznej Szpitala Specjalistycznego Św. Wojciecha-Adalberta w Gdańsku. Szczep charakteryzuje się wysoką opornością na ampicylinę jak i na skojarzenie trimetoprim/sulfametaksazol .
- *Candida albicans* ATCC 10231. Szczep pochodzi z kolekcji szczepów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu.
- *Saccharomyces cerevisiae*. Szczep z kolekcji Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej AMG.

3.1.3. Stosowane pożywki:

3.1.3.1. Podłoże płynne Muellera Hintona II Broth Becton, Dickinson and Company Sparks. MD 21252 USA

Ekstrakt wołowy	3,0g
Kwaśny hydrolizat kazeiny	17,5g
Skrobia	1,5g
Woda destylowana	do 1000ml

pH 7,6

Warunki sterylizacji w autoklawie: 121⁰C, 20 minut.

3.1.3.2. Podłoże płynne Sabourauda sporządzane w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej AMG wg przepisu:

Pepton firmy Difco Laboratories, Detroit, Michigan USA	10g
Glukoza, bezwodna cz.d.a. (Polfa Kraków)	20g
Woda destylowana	do 1000 ml

pH 5,7

Warunki sterylizacji w autoklawie: 121⁰C, 20 minut.

3.1.4. Odczynniki.

- Fluoresceina, masa molowa 332,3 g/mol (Sigma-Aldrich)
- Etanol 96% (Polmos)
- Olej mineralny (Sigma-Aldrich)
- Silica gel, Davisil™, grade 633, 200-425 mesh, 60A, 90%, (Sigma-Aldrich)
- 4,7-difenyl-1,10-fenanthrolina, C₂₄H₁₆N₂, masa cząsteczkowa 332,41, (Sigma-Aldrich)
- DMSO-(CH₃)₂SO -Dimetylosulfotlenek 100% (Reachim)
- Ampicylina, 0,5g (Polfa-Tarchomin S.A.)

- Ko-timoksazol (trimetoprim/sulfametaksazol) o stężeniu 16/80 mg/ml (Polfa-Tarchomin S.A.)
- Chlorek rutenu (III) (Sigma-Aldrich)
- Chlorek cynku ($ZnCl_2$) cz.d.a. (POCH Gliwice)
- Siarczan nikiu ($NiSO_4 \cdot 7H_2O$) cz.d.a. (POCH Gliwie)
- Siarczan miedzi ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) cz.d.a. (POCH Gliwice)
- Nowosyntetyzowane związki chemiczne
 - polimer polisilokasnowego z grupą N-N'-dialkiloimidazolwą IV-rzędowanego bromkiem oktylu - związek zostały zsyntetyzowane w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi;
 - 2-Hydroksyloiminoimidazolino-O-sulfonian 3,5,6,7-tetrahydrospiro[imidazo[2,1-c][1,2,4]triazolo-2,4'-morfolino]-2-iniowy - związek został zsyntetyzowany w Katedrze i Zakładzie Technologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego Farmaceutycznego AMG.
- Płytki titracyjne „F” dno płaskie, pojemność 370 μ l (Medlab-Products sp. z.o.o.)
- Mikropłytki czarne okrągłodenne, pojemność 400 μ l (Greiner Bio-one)
- Końcówki do pipet o pojemności 200 μ l typu Eppendorf (Medlab Product sp. z.o.o.)
- Pipeta automatyczna wielokanałowa o pojemności 10-100 μ l (Eppendorf)
- Pipety automatyczne o pojemności 20-200 μ l (HTL)
- Naczynia reakcyjne o pojemności 1,5 ml typu Eppendorf (P.P.H.U. Limarko)

3.2. Metody.

3.2.1. Metoda otrzymywania sensora tlenowego tris 4,7-difenylo-1,10-fenantrolino dichlorku rutenu (II)(Ru(DPP)₃Cl₂).

Syntezę wykonano w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego AMG. Reakcję prowadzono w atmosferze argonu wg zmodyfikowanej metody Watts'a i Crosb'ego /105/. Mieszaninę 0,5 mmola (104 mg) chlorku rutenu (III), 0,25 ml wody i 3 ml glikolu etylenowego ogrzano do 120°C – do rozpuszczenia soli. Następnie dodano 1,5 mmola (500 mg) difenylofenantroliny i ogrzewano we wrzeniu pod chłodnicą zwrotną w reaktorze mikrofalowym *Plazmatronika* przez 5 minut. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej intensywnie czerwoną mieszaninę zadano 30 ml

chloroformu i odmyto nasyconym roztworem NaCl (40 ml). Warstwę organiczną oddzielono, zagęszczono do sucha i pozostałość przekryształizowano z mieszaniny etanol-woda (2:1). Otrzymano 475 mg (wydajność 75 %) produktu w postaci kryształów o intensywnie pomarańczowym zabarwieniu.

Analiza elementarna - obliczono dla $C_{72}H_{48}Cl_2N_6Ru \times 5 H_2O$: C, 68,67; H, 4,64; N, 6,67. Otrzymano: C, 65,90; H, 4,25; N, 6,10.

3.2.2. Pomiary spektrofotometryczne.

Pomiary spektrofotometryczne sensora tlenowego tris 4,7-difenylo-1,10-fenantrolino dichlorku rutenu (II) $(Ru(DPP)_3Cl_2)$ i fluoresceiny przeprowadzono za pomocą spektrofotometrów ND-1000 firmy NanoDrop Technologies USA oraz Jasco SSE-343 V530 UV-Vis Spectrophotometer

3.2.3. Pomiary fluorometryczne.

Pomiary fluorometryczne etanolowych roztworów fluoresceiny i sensora tlenowego tris 4,7-difenylo-1,10-fenantrolino dichlorku rutenu (II) $(Ru(DPP)_3Cl_2)$ wykonano za pomocą spektrofluorymetru LS 50B firmy PerkinElmer.

3.2.4. Opłaszczanie studzienek 96-dołkowej płytki titracyjnej biosensorem $Ru(DPP)_3Cl_2$.

Zsyntetyzowany $Ru(DPP)_3Cl_2$ zgodnie z procedurą opisaną przez Wodnicką i wsp., adsorbowano na żelu krzemionkowym Davisil™ przez odparowanie (0,9 mg $Ru(DPP)_3Cl_2/g$ żelu krzemionkowego) /107/. Aby uniknąć bezpośredniego kontaktu drobnoustrojów z sensorem zaadsorbowanym na żelu krzemionkowym zatapiano go w gumie silikonowej Lactite® Nuva Sil® 5091 w stosunku 2 % w/w i bezpośrednio nakładano do dołków płytki titracyjnej firmy Med Lab lub Greiner Bio-one. Po naniesieniu sensora płytki kondycjonowano 2-3 dni w 37°C w warunkach kontrolowanej wilgotności. Po tym czasie płytki używano do badań. Silikon uniemożliwia bezpośredni kontakt drobnoustrojów z sensorem, ale jednocześnie pozwala przenikać molekułom tlenu.

3.2.5. Oznaczanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków chemicznych.

3.2.5.1. Metoda seryjnych rozcieńczeń.

3.2.5.1.1. Określanie gęstości hodowli *Escherichia coli*, *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae*.

W celu określenia ilości komórek w hodowli szczepów bakterii i grzybów sporządzano rozcieńczenia hodowli w postępie geometrycznym, a następnie odpowiednie rozcieńczenia wysiewano w objętości 0,1ml na podłoże stałe i wcierano głaszczką w podłoże. Po 12 godzinnej inkubacji płytek w cieplarni w temperaturze 37°C (bakterie) i 48 godzin (grzyby) liczono kolonie bakterii i grzybów i określano ilość komórek w 1 ml wyjściowej zawiesiny - CFU/ml (CFU-ang. Colony Forming Units).

3.2.5.1.2. Oznaczanie aktywności antybakteryjnej DMSO.

W dołkach płytki titracyjnej umieszczano 100 µl roztworów DMSO o stężeniach: 4, 10, 16, 20, 26, 30, 36 i 40 %. Do dołków dodawano 100 µl hodowli bakteryjnej o mianie ok. 10⁵ CFU/ml. W tym celu 18 godzinną hodowlę bakteryjną rozcieńczano 1000-krotnie za pomocą bulionu Muellera-Hintona. Płytki titracyjne inkubowano w cieplarni w temperaturze 37°C. Po 24 godzinnej inkubacji odczytywano wartości MIC (ang. minimum inhibitory concentration). Jednocześnie inkubowano kontrolę jałowości i żyźności podłoża.

3.2.5.1.3. Oznaczanie przeciwbakteryjnego wpływu różnych substancji chemicznych na komórki *Escherichia coli*.

Używając 96-dołkowych płytek titracyjnych sporządzono w postępie geometrycznym roztwory ampicyliny (w zakresie stężeń od 128 µg/ml do 0,0625 µg/ml), trimetoprimu/sulfametaksazolu (o stężeniach od 64/320 µg/ml do 0,0312/0,156 µg/ml), jonów niklu (o stężeniach od 10 mM do 0,25 mM), jonów miedzi (od stężenia 4 mM do stężenia 0,125 mM) i jonów cynku (w zakresie stężeń od 8 mM-0,25 mM). Do dołków dodano po 100 µl hodowli bakteryjnej o gęstości inokulum ok. 10⁵ CFU/ml uzyskane przez 1000-krotne rozcieńczenie 18 godzinnej hodowli w bulionie Muellera-Hintona. Badane

próby inkubowano w cieplarni w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po inkubacji odczytywano wartość MIC. Równolegle inkubowano kontrole jałowości i żywności podłoża.

3.2.5.1.4. Oznaczanie aktywności antybakteryjnej nowosyntetyzowanych związków chemicznych.

Używając 96-dołkowych płytek titracyjnych sporządzono w postępie geometrycznym roztwory homopolimeru polisiloksanowego z grupą N-N' dialkiloimidazolową IV- rzędowanego bromkiem oktylu (w zakresie stężeń od 0,5 % do 0,00025 %), 2-Hydroksyloiminoimidazolino-O-sulfonianu 3,5,6,7-tetrahydrospiro[imidazo[2,1-c][1,2,4]triazolo-2,4'-morfolino]-2-iniowego (o stężeniach od 0,135 % do 0,0000675 %). Do dołków dodano po 100 µl hodowli bakteryjnej o inokulum ok. 10⁵ CFU/ml uzyskane przez 1000-krotne rozcieńczenie 18 godzinnej hodowli w bulionie Muellera-Hintona. Badane próby inkubowano w cieplarni w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po inkubacji odczytywano wartość MIC. Równolegle inkubowano kontrole jałowości i żywności podłoża.

3.2.5.1.5. Oznaczanie właściwości przeciwgrzybiczych nystatyny.

W 96-dołkowych płytkach titracyjnych sporządzano w postępie geometrycznym roztwory nystatyny o stężeniach od 128 µg/ml do 0,0625 µg/ml, do których dodawano 100 µl hodowli grzybów *Candida albicans* lub *Saccharomyces cerevisiae* o gęstości inokulum ok. 10³ CFU/ml. Próby inkubowano w 37°C przez 48 godzin. Po inkubacji odczytywano wartości MIC. Jednocześnie inkubowano kontrole jałowości i żywności podłoża.

3.2.5.2. Monitorowanie wzrostu hodowli drobnoustrojów z wykorzystaniem fluorescencyjnej respirometrii optycznej.

Z 18 godzinnej hodowli bakterii i grzybów, które odświeżano przez 10 krotne rozcieńczenie i inkubację przez 2-3 godziny przed badaniem, sporządzano hodowle o znanych gęstościach CFU/ml. Tak przygotowane rozcieńczone hodowle wprowadzano w ilości 160 µl do studzienek płytki titracyjnej zawierającej biosensor Ru(DPP)₃Cl₂. Na

powierzchnię badanych roztworów nanoszono 60 μ l oleju mineralnego. Płytkę umieszczano na stoliku platformy pomiarowej.

3.2.5.3. Pomiary wpływu różnych substancji chemicznych na bakterie metodą fluorescencyjnej respirometrii optycznej.

Do dołków płytek titracyjnych pokrytych biosensorem tlenowym wprowadzono po 80 μ l roztworów: DMSO (stężenia: 4, 10, 16, 20, 26, 30, 36 i 40 %), ampicyliny (4, 8, 16, 32, 64, 128 μ g/ml), trimetoprimu/sulfametaksazolu (2/10, 4/20, 8/40, 16/80, 32/160 μ g/ml), jonów metali ciężkich - niklu (1,25, 2,5, 5, 10 mM), miedzi (0,25, 0,5, 1, 2, 4 mM), cynku (0,5, 1, 2, 4, 8 mM), homopolimeru polisiloksanowego z grupą N-N' dialkiloimidazolową IV- rzędownego bromkiem oktylu (0,0005, 0,001, 0,002, 0,004 %) i 2-Hydroksyloiminoimidazolino-O-sulfonian 3,5,6,7-tetrahydrospiro[imidazo[2,1c][1,2,4]triazolo-2,4'-morfolino]-2-inyowy (0,085, 0,017, 0,034, 0,0675, 0,135 %). Następnie do dołków zawierających badane związki chemiczne dodawano 80 μ l bakterii *Escherichia coli* o gęstości ok. 10^6 CFU/ml. Na powierzchnię roztworów nanoszono 60 μ l oleju mineralnego i płytkę umieszczano na stoliku platformy pomiarowej.

Zakres stężeń związków do badań respirometrycznych określano w oparciu o równolegle przeprowadzane oznaczenia z wykorzystaniem metody seryjnych rozcieńczeń. Pomiary prowadzono w temperaturze 27°C lub 37°C.

3.2.5.4. Pomiary wpływu nystatyny na komórki grzybów z zastosowaniem sensora $\text{Ru}(\text{DPP})_3\text{Cl}_2$.

Na płytce z biosensorem tlenowym nanoszono odpowiednie roztwory nystatyny o stężeniach od 8 do 0,03125 μ g/ml. Następnie dodawano 80 μ l rozcieńczonych hodowli grzybów o gęstościach ok. 10^6 CFU/ml. W tym celu 18 godziną hodowlę drożdży rozcieńczano bulionem Sabourauda i inkubowano przez 2-3 godziny w 37°C. Na powierzchnię roztworów nanoszono 60 μ l oleju mineralnego i płytkę umieszczano na stoliku platformy pomiarowej i wykonywano pomiary fluorometryczne.

Zakres stężeń badanych związków określano w oparciu o wcześniej przeprowadzone badania z wykorzystaniem metody seryjnych rozcieńczeń.

Analizy wpływów nystatyny przeprowadzono w temperaturze 37°C

3.3. Pomiary sygnału fluorescencji biosensora $\text{Ru}(\text{DPP})_3\text{Cl}_2$.

Sygnal fluorescencji biosensora rejestrowano za pomocą zautomatyzowanej platformy pomiarowej, której schemat przedstawia rysunek 5 (wyniki punkt 4.1). Odpowiednie dołki płytki titracyjnej zawierające analizowane próbki były orientowane w płaszczyźnie dwuwymiarowej X,Y za pomocą dwóch szyn oraz dwóch silników krokowych. Silniki orientują płytkę z dokładnością do 0,012 mm za pomocą sterownika silników krokowych typu SSK-3D z firmy Akcesoria CNC sterowanego przez komputer poszczególne elementy wchodzące w skład tego modułu są wymienione w dodatku nr 1. Umożliwia to tym samym umieszczenie dowolnego dołka w strumieniu wiązki światła wzbudzającego. Odpowiednie wzbudzenie biosensora zapewnia moduł optyczny, który obejmuje: źródło światła, układ soczewek formujących wiązkę, zestaw filtrów i zwierciadło dichroiczne. Emitowane z próbki światło po przejściu przez zwierciadło dichroiczne i filtr interferencyjny pada na fotopowielacz H5783 firmy Hamamatsu charakteryzujący się zakresem odpowiedzi spektralnej od 300 do 900 nm (dodatek nr 3). Impulsy napięciowe z fotopowielacza, których ilość jest proporcjonalna do natężenia światła fluorescencji, rejestruje licznik pojedynczych fotonów SR 400 firmy Stanford Research Systems (dodatek nr 4). Zarejestrowane wyniki zliczania pojedynczych fotonów są przekazywane do komputera gdzie i zapisywane w postaci pliku tekstowego, a następnie przenoszone do programu Microsoft Excel. Za pomocą programu dokonywana jest obróbka danych i generuje się krzywe wzrostu hodowli.

Pomiary prowadzone są zgodnie z programem komputerowym, który określa sekwencję wykonywania pomiarów. Program kontroluje moc świecenia źródła światła (10 % natężenia), ilość pomiarów i sekwencję odczytu kolejnych dołków. Rejestrację sygnału fluorescencji z każdego dołka powtarzano 5 lub 10 krotnie, w zależności od prowadzonych eksperymentów.

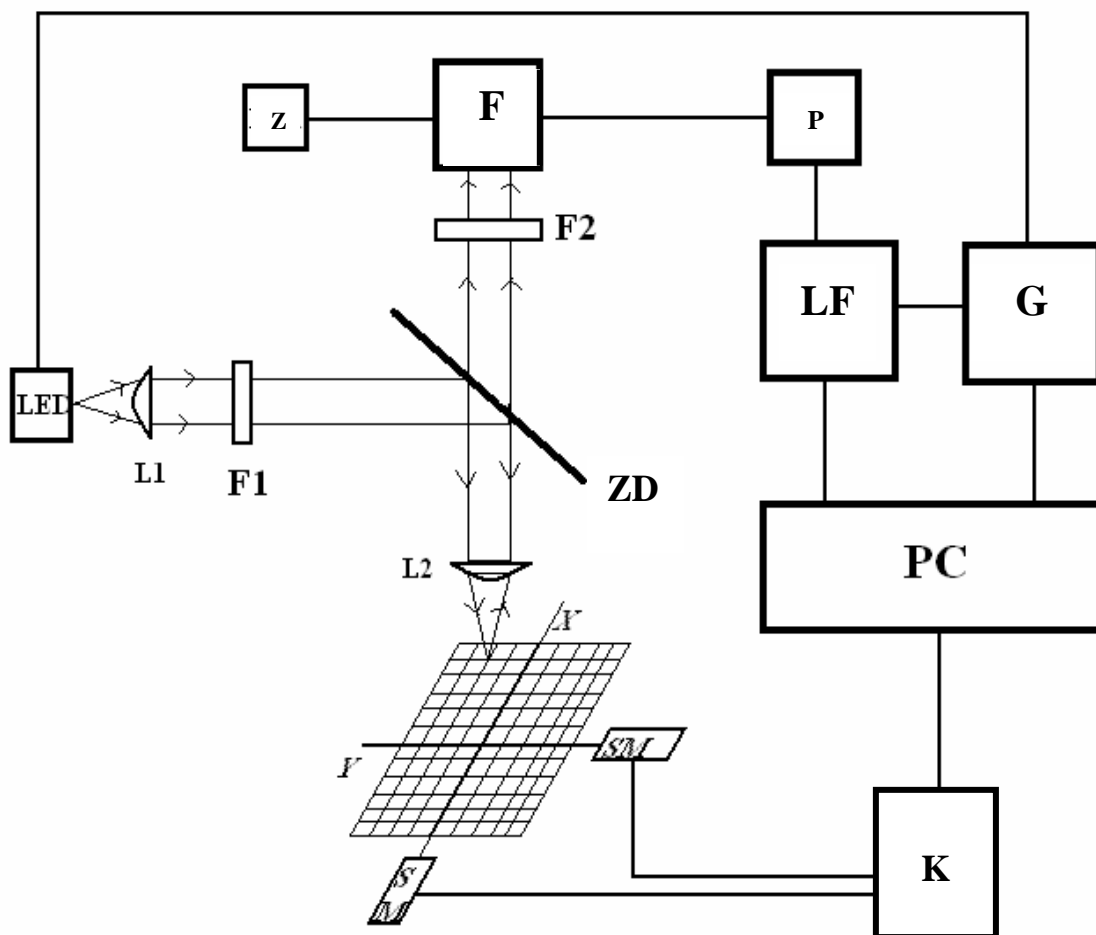
W eksperymentach, gdzie zachodziła potrzeba termostatowania próbek lub wyznaczania wpływu temperatury na szybkość wzrostu hodowli drobnoustrojów, stałą temperaturę próbki uzyskiwano za pomocą układu grzewczego, którego temperatura była kontrolowana przez regulator temperatury SCL210E3/B firmy ESTECI Treviso-Italy. Elementem ogrzewającym była folia grzewcza 12VDC o grubości $0,115 \pm 0,02\text{mm}$ i wymiarach 110x77 mm o mocy 12 W.

4. Wyniki i dyskusja

4.1. Konstrukcja platformy pomiarowej do pomiarów metodą fluorescencyjnej respirometrii optycznej.

Zaproponowana ostatnio nowa metoda badania wpływu związków chemicznych na drobnoustroje [107, 63, 62] wykorzystuje pomiary fotoluminescencji biosensora tlenowrażliwego, który emituje światło o natężeniu zależnym od stężenia tlenu w badanej próbce. Podejmuje się próby konstrukcji odpowiednich platform pomiarowych przeznaczonych do tego typu pomiarów [107, 63]. Również jednym z celów tej pracy jest konstrukcja bardzo czułego, w pełni zautomatyzowanego układu do pomiarów metodą fluorescencyjnej respirometrii optycznej, opartego na zliczaniu fotonów światła emitowanego przez biosensor tlenowy.

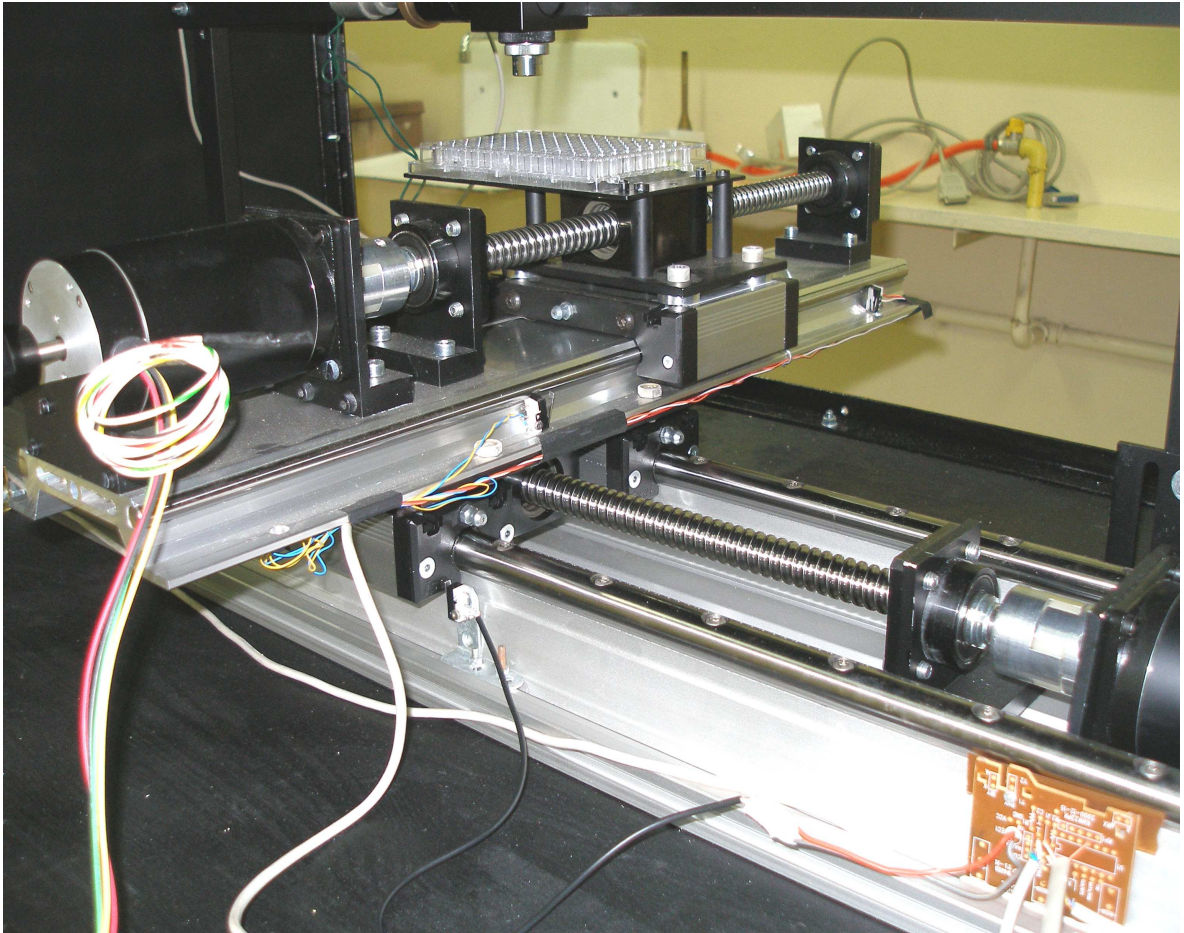
Z równania Sterna- Volmera (wstęp punkt 1.2.1.) wynika, że informację o przebiegu gaszenia fluorescencji można uzyskać albo w oparciu o pomiary natężenia światła albo też wyznaczając czasy życia fluorescencji. W każdym przypadku można wyznaczyć stałą K_d , jeśli znane są czasy życia lub natężenia fluorescencji w obecności i bez obecności wygaszacza oraz stężenie wygaszacza. Oznacza to możliwość stosowania do pomiarów respirometrii optycznej dwóch rodzajów układów pomiarowych, jednego rejestrującego natężenie emitowanego światła, i drugiego pozwalającego wyznaczyć czasy życia fluorescencji. W tym drugim przypadku pociąga to za sobą konieczność użycia drogich i skomplikowanych aparatów z wykorzystaniem szybkich technik impulsowych, bądź fluorymetru fazowego [45]. Konstruowany przez nas układ pomiarowy zapewnia możliwości pomiaru fluorescencji w obu reżimach, jednak wyznaczanie czasu życia wielu analizowanych próbek w krótkim czasie za pomocą licznika fotonów, wchodzącego w skład układu pomiarowego, nie jest optymalnym rozwiązaniem. Wymagałoby to ponadto szybkiego impulsowego źródła światła, o krótkim czasie błysku, ponieważ czas życia zsyntetyzowanego przez nas i stosowanego w eksperymentach biosensora tlenowego wynosi około 3 μ s. W związku z tym konstruowany układ pomiarowy przeznaczony będzie przede wszystkim do pomiarów respirometrycznych w oparciu o pomiar natężenia fluorescencji emitowanego przez badane próbki. Na rysunku nr 5 przedstawiono schemat platformy pomiarowej.



Rys. 5. Schemat układu pomiarowego do pomiarów aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków chemicznych metodą fluorescencyjnej respirometrii optycznej. LED – świecąca dioda, L1, 2 – soczewki, F1, 2 – filtry optyczne, ZD - zwierciadło dichroiczne, F – fotopowielacz, Z – zasilacz fotopowielacza, P – przedwzmacniacz, LF – licznik fotonów, G – generator impulsów, PC – komputer osobisty, K – kontroler silników krokowych, SM – silniki krokowe.

Badane mikrohodowle bakteryjne umieszcza się w standardowej płytce titracyjnej o ilości 96 dołków, co zapewnia równoczesną analizę dużej ilości próbek. Układ dwóch silników krokowych, umożliwiających ruch stolika platformy w płaszczyźnie XY, pozwala umieścić badane próbki w wiązce światła wzbudzającego fluorescencję.

Użyty w tym przypadku kontroler SSK-3D pracy silników umożliwia orientację każdego dołka z dokładnością do 0,012 mm. Wymienione elementy stanowią składniki mechanicznego modułu układu pomiarowego, którego funkcjonowanie tzn. kolejność odczytu próbek zależna jest od programu komputerowego. Ruch stolika pomiarowego wraz z płytką titracyjną w płaszczyźnie X,Y zapewniają dwie wzajemnie prostopadłe suwnice. (rys. 6).

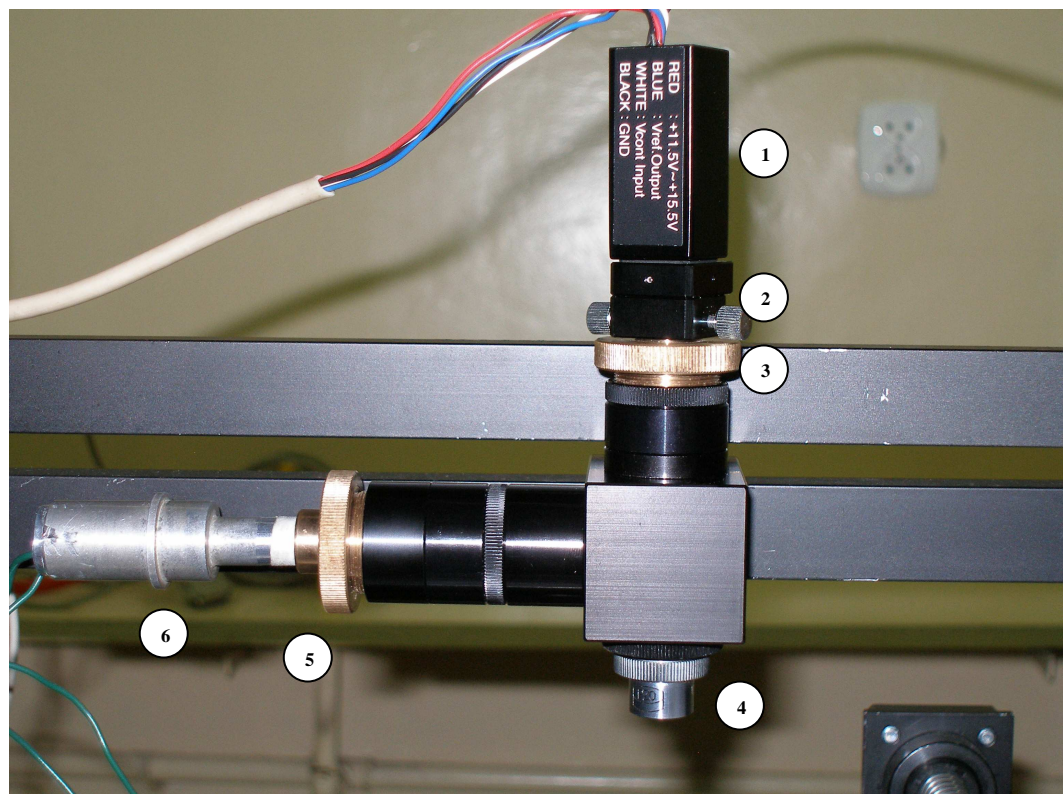


Rys. 6. Mechanizm orientujący próbki. Widoczne są szyny dolna i górna, silniki krokowe ze sprzęgłami poruszającymi śruby toczne przechodzące przez łożyskowane tuleje bloczków, wózek dolny, na którym jest zamocowana szyna górna, wózek górny, na którym jest zamocowany stolik z płytką 96-dołkową. Ruch wózka dolnego i górnego ograniczają wyłączniki krańcowe.

Dolna suwnica składa się z aluminiowej szyny ILF-7 i silnika krokowego MS160 o momencie obrotowym 160 Nxcmm firmy Iselautomation GmbH & Co. Silnik krokowy napędza śrubę toczoną (wrzeciono ślimakowe) o długości 668 mm i średnicy \varnothing 16 mm osadzonego w łożyskach kulowych. Łożyska te zamontowane są w oprawach blokowych połączonych z szyną ILF-7. Silnik krokowy połączony jest z wrzecionem ślimakowym za pomocą sprzęgła kłowego WK30/40. Ruch obrotowy wrzeciona ślimakowego poprzez bloczek z łożyskowaną tuleją przenoszony jest na postępowy ruch sanek IWS-1 do szyny ILF-7 przesuwających się po prowadnicach szyny. Na wózku znajduje się druga szyna o długości 496 mm typu MLF-3 firmy Iselautomation GmbH & Co., zorientowana prostopadle w stosunku do szyny ILF-7. Również w tym przypadku, podobnie jak w przypadku suwnicy pierwszej, silnik krokowy MS160 przez obrót śruby tocznej o długości 368 mm powoduje ruch po prowadnicach szyny łożyskowego bloczka z sankami WS3. Na sankach umieszczony jest stolik służący do mocowania płytki titracyjnej.

Parametry elementów mechanicznych zastosowanych w mechanizmie orientującym próbkę pozwalają ustawić płytkę analityczną z dokładnością do 0,01 mm. Ruch obu wózków dla szyn ILF-7 i MLF-3 ograniczony jest przez odpowiednio zamocowane wyłączniki krańcowe. Spis elementów mechanizmu orientującego próbkę oraz ich charakterystykę zawiera dodatek nr 1.

Wzbudzenie fluorescencji próbek zapewnia moduł optyczny (rys. 7), w którym źródłem światła jest dioda LED działająca w odpowiednim układzie impulsowym, bądź też stabilizowany laser zielony (532 nm) firmy Scitec z modulacją TTL o częstotliwości 30 KHz (przewidziane do współpracy z biosensorem tlenowym G20N-1).

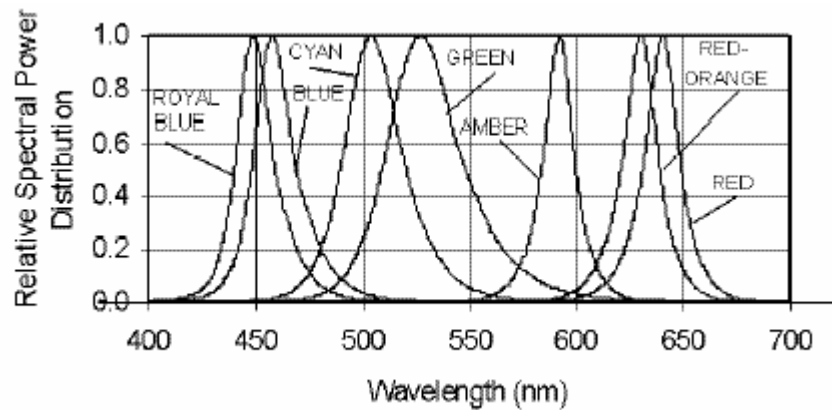


Rys. 7. Moduł optyczny z fotopowielaczem. 1 - fotopowielacz, 2 - adapter blokowy, 3, 5 – mosiężne złączki dla fotopowielacza i diody LED, 4 - obiektyw mikroskopowy, 6 - dioda LED.

W zależności od użytego biosensora jako źródło światła stosować można diodę impulsową lub laser tak, aby długość fali emitowana przez źródło światła odpowiadała maksimum absorpcji biosensora. W przypadku gdy do analizy używano biosensora tris 4,7-difenylo-1,10-fenantrolino dichloru rutenu (II) ($\text{Ru}(\text{DPP})_3\text{Cl}_2$) jako źródła światła

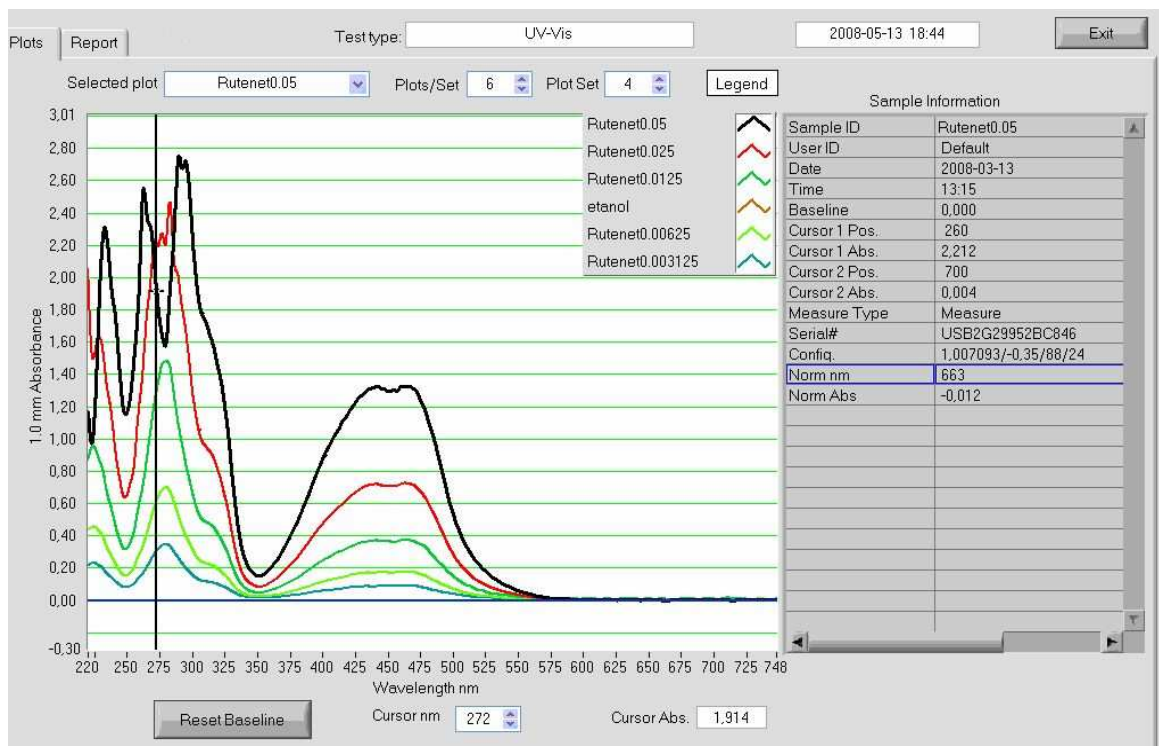
4. WYNIKI I DYSKUSJA

zastosowano niebieską diodę LXHL-NB98 firmy Luxeon z maksimum emisji dla $\lambda = 460$ nm (rys. 8)



Rys. 8. Widmo emisji świecącej diody LED LXHL-NB98 (BLUE). Rysunek pochodzi z internetowej strony producenta Luxeon.

Wybór diody LXHL-NB98 jako źródła światła wynika z analizy widma absorpcji biosensora $\text{Ru}(\text{DPP})_3\text{Cl}_2$ (rys. 9).

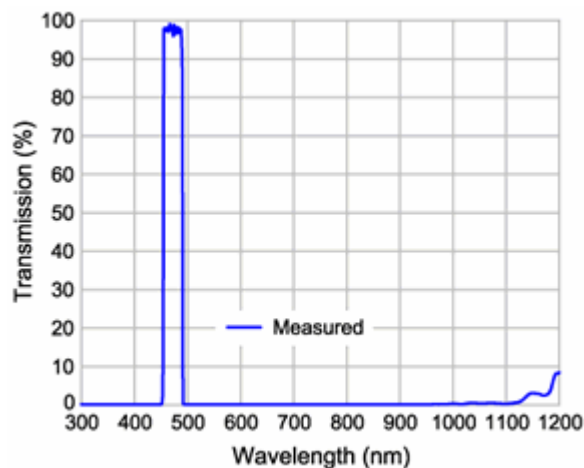


Rys. 9. Widmo absorpcji etanolowych roztworów $\text{Ru}(\text{DPP})_3\text{Cl}_2$ o stężeniach 0,05, 0,025, 0,125, 0,0625, 0,03125 % zarejestrowane za pomocą spektrofotometru ND-1000 firmy NanoDrop Technologies USA.

Widmo absorpcji $\text{Ru}(\text{DPP})_3\text{Cl}_2$ charakteryzuje się występowaniem 2 pasm absorpcji. Jedno z nich, krótkofalowe, zlokalizowane jest w obszarze ultrafioletu, drugie w zakresie widzialnym z maksimum 440-475 nm. Widma te są zgodne z widmami absorpcji przedstawionymi wcześniej przez Watts'a i Crosby'ego /105/. Ze względów praktycznych bardziej celowe jest wykorzystanie do wzbudzania fluorescencji długofalowego widma absorpcji sensora. Światło z impulsowej diody LXHL- NB98 po przejściu przez soczewkę L1 (rys. 5) przekształcane jest w równoległą wiązkę światła, pada na filtr interferencyjny F1 a następnie zwierciadło dichroiczne i układ soczewek L2 (obiektyw mikroskopu), które skupiają wiązkę światła w dołku płytki titracyjnej.

Zachowanie równoległości promieni światła ma istotne znaczenie ze względu na fakt, że zarówno funkcjonowanie filtra F1, jak i zwierciadła dichroicznego w istotny sposób zależą od równoległości promieni optycznych (odstępstwa od równoległości nie powinny przekraczać 5°).

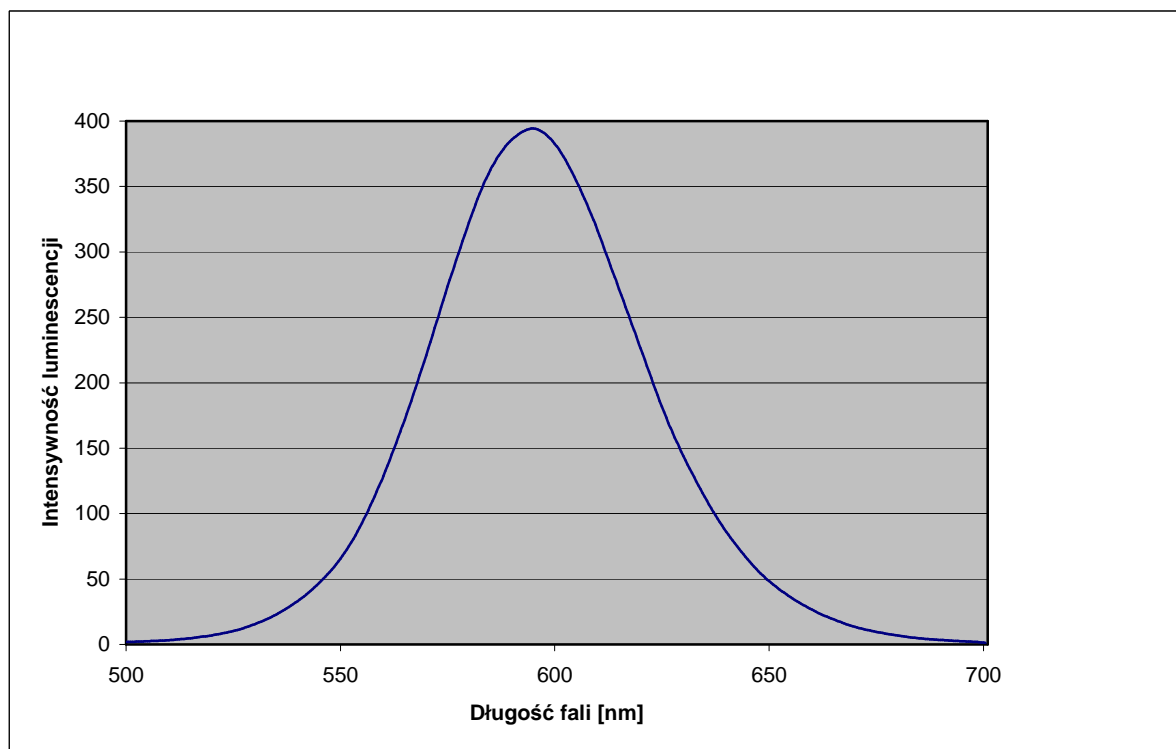
Zadaniem filtra interferencyjnego F1 jest usunięcie zbędnych długości fali światła emitowanego przez diodę. Zastosowany w układzie filtr interferencyjny to filtr Brightline FF01-472/30-25 firmy Semrock, którego widmo transmisji przedstawia rysunek 10.



Rys. 10. Widmo transmisji filtra interferencyjnego Brightline FF01-472/30-25 firmy Semrock. Wartość 472 określa położenie centralnej długości fali światła przepuszczanego przez filtr a parametr 30 szerokość pasma transmisji. Średnica filtra jest równa 25 mm.

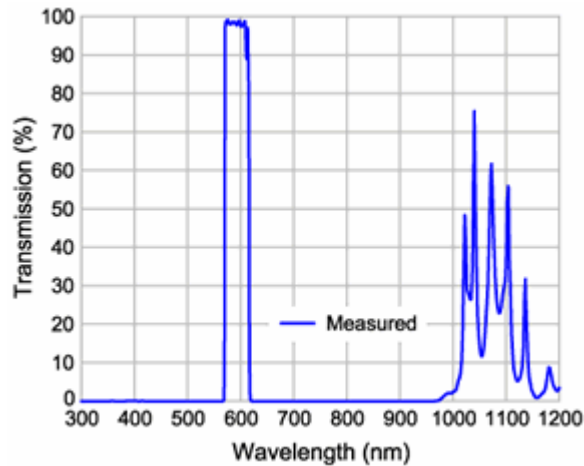
Emitowane przez próbkę światło fluorescencji ponownie przechodzi przez soczewki obiektywu L2 (rys. 5), a następnie po przejściu przez zwierciadło dichroiczne pada na filtr interferencyjny F2 i ostatecznie na fotopowielacz.

Filtr interferencyjny F2 w tym przypadku powoduje eliminację światła, którego długość fali znajduje się poza maksimum emisji widma fluorescencji.



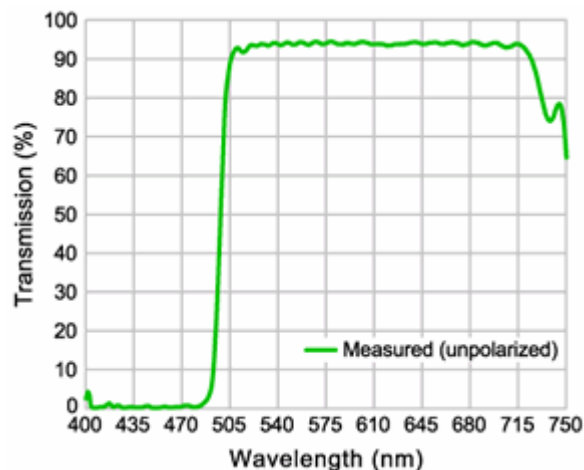
Rys. 11. Widmo fluorescencji 0,002% etanolowego roztworu Ru(DPP)₃Cl₂ wzbudzanego światłem o długości fali 465 nm, zarejestrowanego za pomocą spektrofluorymetru LE 50B firmy Perkin Elmer.

Widmo fluorescencji biosensora przedstawione na rysunku 11 wykazuje maksimum emisji w rejonie 595-600 nm. W oparciu o przedstawione widmo fluorescencji optymalne wydaje się zastosowanie jako filtru dla emisji filtru interferencyjnego Brightline FF01-593/40-25 firmy Semrock, którego widmo transmitancji przedstawiono na rysunku 12.



Rys. 12. Widmo transmitancji filtra interferencyjnego Brightline FF01-593/40-25 firmy Semrock.

Bardzo istotnym elementem układu optycznego jest zwierciadło dichroiczne (ang. beamsplitter) FF495-Di02-25x36 firmy Semrock, zorientowane w stosunku do padającej wiązki światła pod kątem 45° . Jego zadaniem, z jednej strony jest odbicie wiązki światła wzbudzającego w kierunku soczewek obiektywu i badanej próbki, z drugiej zaś przepuszczenie emitowanego światła fluorescencji w kierunku filtra interferencyjnego F2 i fotopowielacza.



Rys. 13. Widmo transmitancji zwierciadła dichroicznego FF495-Di02-25x36 firmy Semrock.

Z charakterystyki widmowej zwierciadła FF495-Di02-25x36 przedstawionego na rysunku 13 wynika, że zwierciadło to eliminuje z wiązki światła padającego na fotopowielacz wszystkie długości fal krótsze niż 495 nm. W ten sposób usuwa ze światła rejestrowanego przez fotopowielacz krótsze długości fali pochodzące ze światła wzbudzającego, które ulega odbiciu i rozproszeniu na różnych elementach układu

optycznego i płytki titracyjnej. Skojarzone działanie filtra dla emisji F2 i zwierciadła dichroicznego ogranicza ilość światła stanowiącego tło w pomiarze.

W module detekcji zastosowano jako element rejestrujący emitowane światło fluorescencji fotopowielacz H5783 firmy Hamamatsu. Fotopowielacz jest najczulszym znanym detektorem kwantów światła, który rejestruje pojedyncze fotony. Moc światła dla pojedynczych kwantów o $\lambda=550$ nm padających na powierzchnię 1 mm^2 w ciągu 1 sekundy jest równa $3,6 \times 10^{-19} \text{ W/mm}^2$ /74/. Stosunek sygnału do szumu, przy natężeniu padającego światła równym 2×10^5 fotonów/s, jest w przypadku fotopowielacza odpowiednio o ok. 10 i 100 razy większy w porównaniu z fotodiodą lawinową i fotodiodą /40/. W fotopowielaczu kwanty światła padając na fotokatodę powodują emisję elektronów, które powielane na kolejnych dynodach, dają mierzalny impuls napięcia na wyjściu z anody. W ten sposób poszczególne kwanty światła zliczane są jako sekwencja impulsów napięciowych w układzie pomiarowym. Fotopowielacz H5783 charakteryzuje się szerokim zakresem odpowiedzi spektralnej od 300 do 900 nm (dodatek nr 3), co pozwala na używanie go do pomiarów z wykorzystaniem wielu biosensorów różniących się charakterystyką spektralną emitowanego światła fluorescencji.

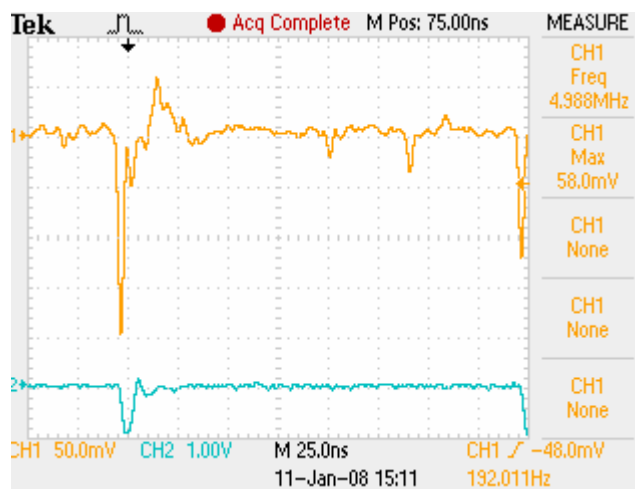
Wydajność zliczania fotonów światła przez fotopowielacz zależy od napięcia regulującego wzmacnienie fotopowielacza (dodatek nr 3). Dlatego też skonstruowano specjalny zasilacz do fotopowielacza, który ponadto, dzięki wbudowanemu zabezpieczeniu prądowemu, zabezpiecza fotopowielacz przed uszkodzeniem spowodowanym nadmiarem światła padającego na fotopowielacz. Pojedynczy impuls wychodzący z fotopowielacza jest rejestrowany przez licznik pojedynczych fotonów SR 400 (SR - Stanford Research) przedstawiony na rysunku 14. Jeżeli zachodzi taka potrzeba słabe sygnały mogą być dodatkowo wzmacniane za pomocą szerokopasmowego (0 – 350 MHz) przedwzmacniacza SR 445A firmy Stanford Research.



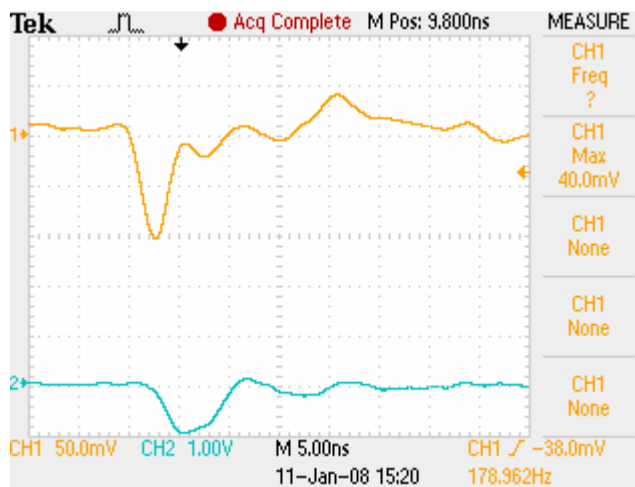
Rys. 14. Licznik pojedynczych fotonów SR 400 firmy Stanford Research.

Licznik pojedynczych fotonów SR 400 posiada dwa niezależne kanały zliczania, co umożliwia jednoczesną rejestrację dwóch niezależnych procesów. Licznik może działać w kilku trybach pracy, umożliwia również pomiar metodą „time-resolved”. Wyposażony jest w dyskryminator, który pozwala na wyeliminowanie sygnałów poniżej zadanej wartości progowej. Pozwala to na ograniczenie szumów stanowiących tło. Szczegółową charakterystykę licznika fotonów zawiera dodatek nr 4.

Na rysunkach 15 i 16 przedstawiono impulsy napięcia z fotopowielacza zarejestrowane za pomocą oscyloskopu z pamięcią Tektronics TDS 2014.



Rys. 15. Sygnał na wyjściu z fotopowielacza (krzywe górne) oraz impuls napięcia rejestrowany przez licznik fotonów RS-400 (krzywa dolna) zarejestrowane za pomocą oscyloskopu z pamięcią Tektronics TDS 2014.



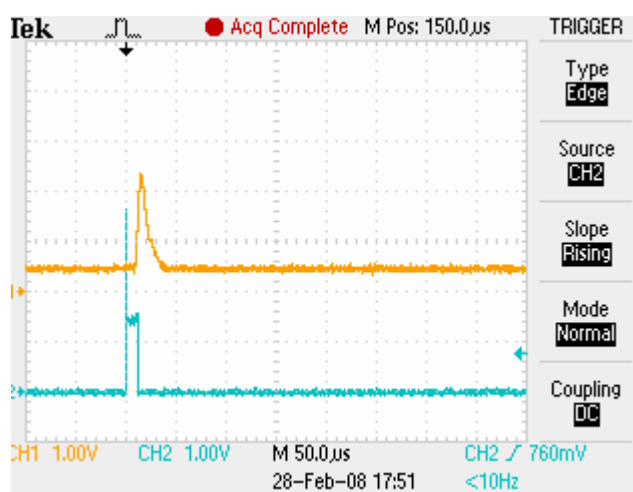
Rys. 16. Kształt impulsów napięcia z fotopowielacza (krzywa górna) i impulsu zliczanego przez licznik fotonów (krzywa dolna). Aby lepiej pokazać charakter zmian napięcia pięciokrotnie zmniejszono podstawę czasu w oscyloskopie.

Impuls z fotopowielacza (górne krzywe na rysunkach 15 i 16) ma charakterystyczny kształt, w którym w ślad za właściwym impulsem napięcia pojawiają się mniejsze zmiany napięcia tzw. „dzwonienie”. Amplituda tych zmian jest jednak mniejsza niż właściwego impulsu napięciowego z fotopowielacza i nie wpływa na ilość zliczanych fotonów. Dolne krzywe na rysunku 15 i 16 przedstawiają impulsy zliczane przez licznik zarejestrowane za pomocą oscyloskopu podłączonego do portu P1 licznika fotonów.

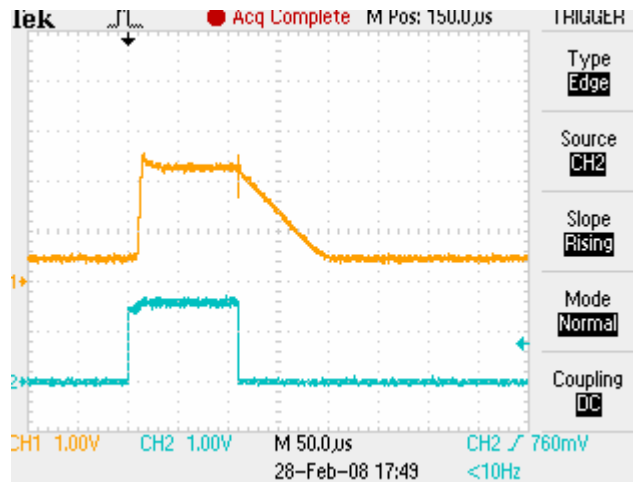
Z rysunku 15 wynika ponad to (krzywa górna), że fotopowielacz generuje również impulsy napięcia mniejsze niż właściwe impulsy wywołane kwantami światła i rejestrowane przez licznik fotonów. Impulsy te mogą być między innymi wywołane termoemisją elektronów z kolejnych dynod fotopowielacza, a nie być efektem fotoemisji z katody. Mając mniejsze napięcia niż impulsy generowane przez emisję elektronów z katody przez kwanty światła, mogą być wyeliminowane za pomocą dyskryminatora (krzywa dolna na rysunku 15).

Źródło światła zastosowane w konstruowanej platformie pomiarowej działa w reżimie impulsowym, a nie w sposób ciągły. Pozwala to na ograniczenie ewentualnych niekorzystnych procesów zachodzących w badanej próbce pod wpływem światła (efekt fotodynamiczny). Specjalnie skonstruowany generator impulsów generuje impulsy napięcia o regulowanym czasie trwania i wysokości. Pozwalają one na kontrolowanie czasu błysku świecącej diody LED oraz intensywności światła wzbudzenia.

Rysunki 17 i 18 przedstawiają impulsy napięcia wzbudzającego świecenie diody (krzywa dolna) i zmiany natężenia światła emitowanego przez tę diodę zarejestrowanego za pomocą szybkiej fotodiody BPW 34.



Rys. 17. Przebieg zmian natężenia światła emitowanego przez diodę pod wpływem przyłożonego impulsu napięcia. Czas trwania impulsu 10 μs.



Rys. 18. Zmiana natężenia światła emitowanego przez diodę pod wpływem prostokątnego impulsu napięcia. Czas trwania impulsu 110 μ s.

W oparciu o te pomiary można było napisać program sterujący pracą generatora impulsów światła i jego współdziałaniem z licznikiem fotonów. Dotyczy to w szczególności generowania impulsów trigerujących, które zapoczątkowują proces zliczania fotonów przez licznik fotonów. Program określa również wielkość opóźnienia zliczania fotonów w stosunku do impulsu wzbudzającego i czas otwarcia bramki (czas zliczania fotonów). Z rysunku 17 i 18 wynika, że przyłożone napięcie do świecącej diody będącej źródłem światła powoduje, że dioda emituje światło z pewnym opóźnieniem w stosunku do napięcia wzbudzającego. Z kolei po wyłączeniu napięcia zasilającego diodę, zanik świecenia diody trwa przez dłuższy czas porównywalny (przy krótkich impulsach) z czasem impulsu powodującego świecenie diody. W związku z tym celowe było wprowadzenie opóźnienia w rozpoczęciu procesu zliczania fotonów przez licznik w stosunku do impulsu wywołującego świecenie diody. W momencie pojawienia się czoła impulsu zasilającego diodę, generowany jest również impuls wyzwalający proces zliczania fotonów. Licznik fotonów pozwala zaprogramować wielkość opóźnienia zliczania fotonów w stosunku do pojawienia się impulsu trigerującego. W ten sposób można wyeliminować fluktuacje natężenia światła emitowanego przez diodę występujące w chwili włączenia diody. Równocześnie, aby uniknąć błędów wynikających ze zmian natężenia światła emitowanego przez diodę po wyłączeniu impulsu zasilającego, należało tak dobrać czas zliczania, aby odpowiadał on stabilnej pracy źródła światła. Warunek ten jest spełniony w środkowym przedziale emisji odpowiadającym maksymalnemu wypełnieniu impulsu

4. WYNIKI I DYSKUSJA

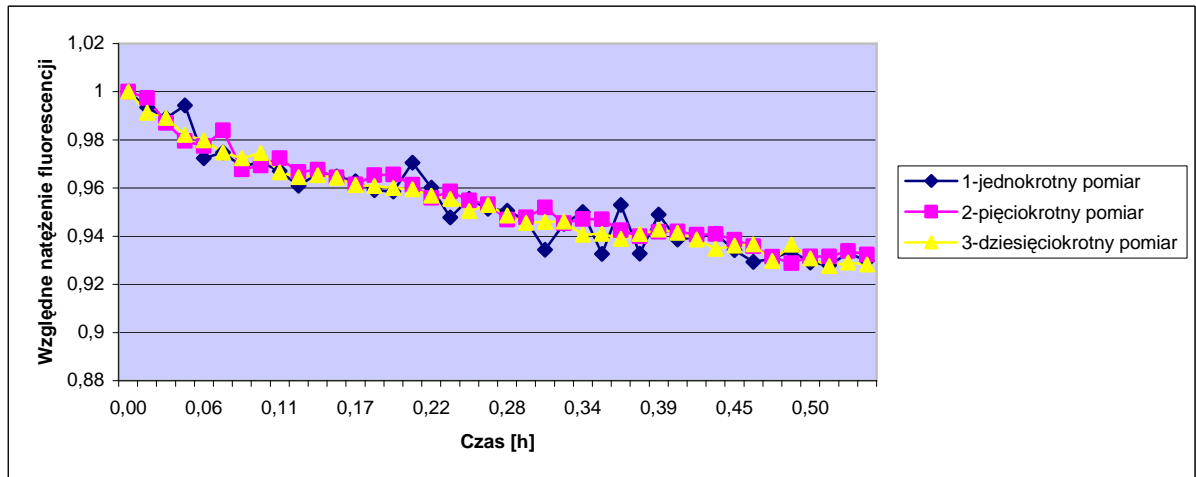
wzbudzającego. Przykładowe parametry ustawienia generatora impulsów i licznika fotonów stosowane w pomiarach przedstawia tabela 2.

Tabela 2. Parametry ustawienia generatora impulsów i licznika fotonów.

X [mm]	Y [mm]	Jasność %	Czas [ms]	Powtórzenie	Okres [ms]	Prefix	Zwłoka [s]	Bramka [s]	Wynik
21	85,7	10	1500	10	2000	A	0,201	0,5	
29,9	85,7	10	1500	10	2000	A	0,201	0,5	

Parametry przedstawione w tabeli oznaczają: X i Y to parametry wyznaczające położenie próbki w płaszczyźnie X i Y; jasność - wielkość mówiąca o natężeniu źródła światła wyrażona w procentach maksymalnego natężenia emitowanego przez diodę; czas- to czas świecenia diody; powtórzenie-krotność pobudzenia diody do świecenia i zliczania fotonów z próbki; zwłoka- 0,201s- opóźnienie między wystąpieniem impulsu trigerującego, który towarzyszy pojawieniu się czoła impulsu wzbudzającego świecenie a początkiem zliczania fotonów przez licznik; bramka- przedział czasowy, w którym zliczane są fotony.

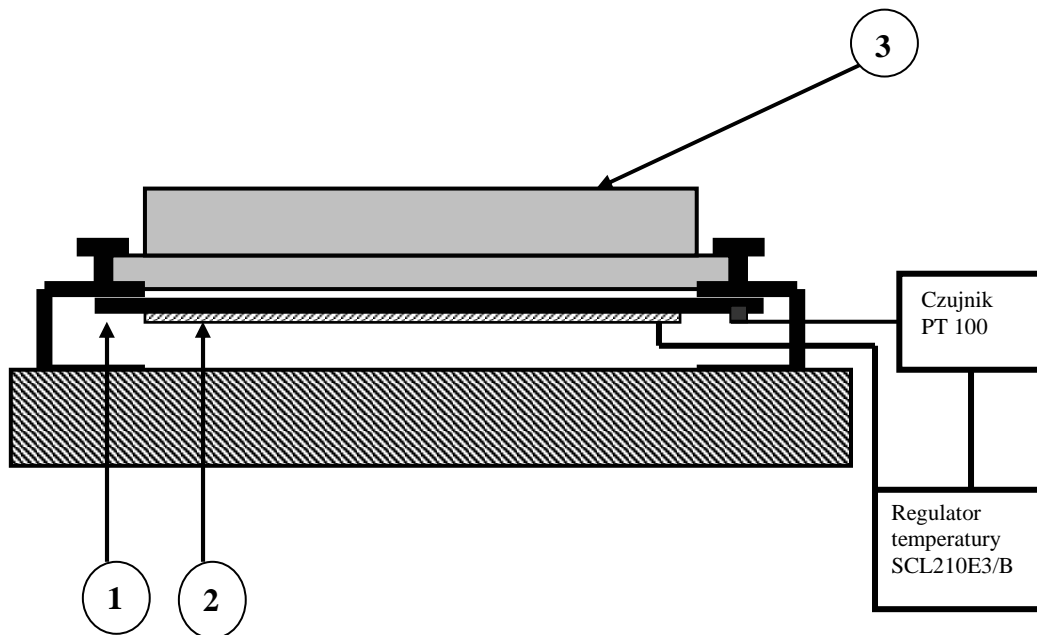
Bardzo ważnym czynnikiem, który ma istotne znaczenie dla precyzji wykonywanych pomiarów jest ilość powtórzeń zliczania fotonów, dla każdej z analizowanych próbek. Ilość fotonów emitowanych przez źródło światła pod wpływem przyłożonego napięcia oraz ilość kwantów rejestrowanych przez fotopowielacz podlegają przypadkowym fluktuacjom w czasie. Wydłużenie czasu pomiaru (zwiększenie ilości powtórzeń) zmniejsza błąd popełniony w czasie pomiaru. Ilustrację tego stanowią analizy fluktuacji liczby rejestrowanych impulsów w zależności od liczby powtórzeń pomiaru przedstawione na rysunku 19.



Rys. 19. Zależność zmian względnego natężenia fluorescencji od czasu. Krzywe 1, 2, 3 różnią się ilością powtórzeń pojedynczego pomiaru.

Krzywą 1 na rysunku 19 charakteryzuje duży rozrzut liczby rejestrowanych impulsów. Zwiększenie liczby powtórzeń powoduje odpowiednie zmniejszenie fluktuacji. W związku z tym w pomiarach, w zależności od prowadzonych eksperymentów, stosowano 5 lub 10 powtórzeń pojedynczego pomiaru.

Jednym z parametrów wpływających na wzrost drobnoustrojów jest temperatura, może ona wpływać na szybkość wzrostu hodowli bakteryjnych, jak również może modyfikować wrażliwość na chemioterapeutyki /89/. W takich przypadkach zachodzi potrzeba kontrolowania temperatury badanych próbek. Aby uzyskać możliwość stabilizowania i kontrolowania temperatury skonstruowano termostatowany stolik pomiarowy. W tym celu użyto samoprzylepnej foli grzewczej FG o mocy 12V/12W podłączonej od wyjścia przekaźnikowego SPDT8(3)A/250V regulatora temperatury SCL210E3/B ze stykiem przełącznym (kontrola ON/OFF). Jako czujnika temperatury użyto czujnika PT100 przyłączonego do wyjścia termometrycznego regulatora temperatury SCL210E3/B (szczegóły opisujące parametry regulatora temperatury zawiera dodatek nr 5).



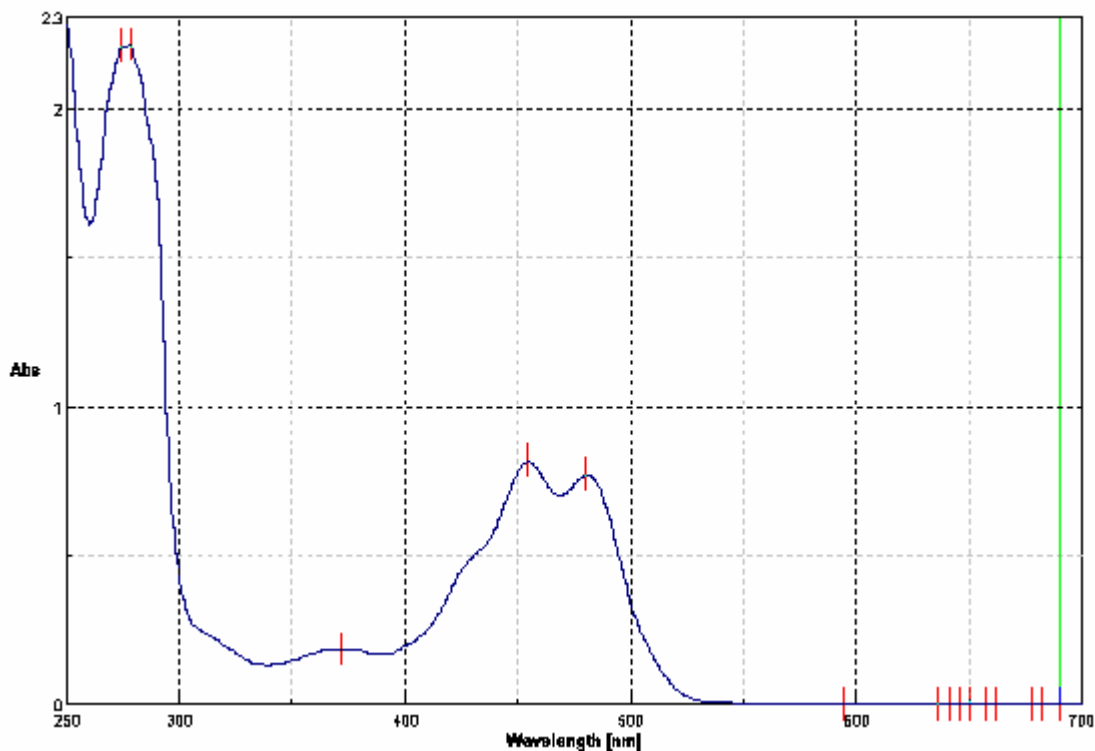
Rys. 20. Schemat przedstawiający moduł termostatu do ogrzewania próbek. 1 - płytki ze stali nierdzewnej, 2 - folia grzewcza, 3 - płytki titracyjnej

Na stoliku pomiarowym (rys. 20) zamontowano w odpowiednich klamrach płytkę ze stali nierdzewnej z przyklejoną do niej samoprzylepną folią grzewczą. Stalowa płytki równomiernie ogrzewa powietrze pod płytką titracyjną zawierającą mikrohodowle bakteryjne. Fluktuacje temperatury w dołkach nie przekraczają $0,1^{\circ}\text{C}$. Temperatura stalowej płytki mierzona jest za pomocą czujnika PT100. Na tak przygotowanym stoliku umieszczana jest płytki titracyjnej.

Skonstruowana platforma pomiarowa umożliwia w pełni zautomatyzowaną analizę wielu próbek w sekwencji ustalonej przez program komputerowy. Program ten nie tylko decyduje, które próbki będą analizowane i w jakiej kolejności, a więc decyduje o ruchu płytki w płaszczyźnie XY zależnej od pracy silników krokowych, lecz także o liczbie powtórzeń i odstępach czasu między kolejnymi powtórzeniami. Program ten pozwala również regulować natężenie źródła światła w impulsie, czas trwania impulsu świetlnego i ilość kolejnych błysków. Decyduje wreszcie o tym, kiedy zaczyna się zliczanie pojedynczych impulsów po wystąpieniu impulsu trigerującego, który wyzwała błysk lampy i zapoczątkowuje zliczanie fotonów przez licznik. Ostatecznie program zapewnia komunikowanie się komputera z licznikiem fotonów i transmisję danych z licznika do komputera. Ścisła kontrola temperatury stolika pomiarowego umożliwia precyzyjną kontrolę warunków prowadzenia hodowli drobnoustrojów.

4.2. Ocena czułości układu pomiarowego.

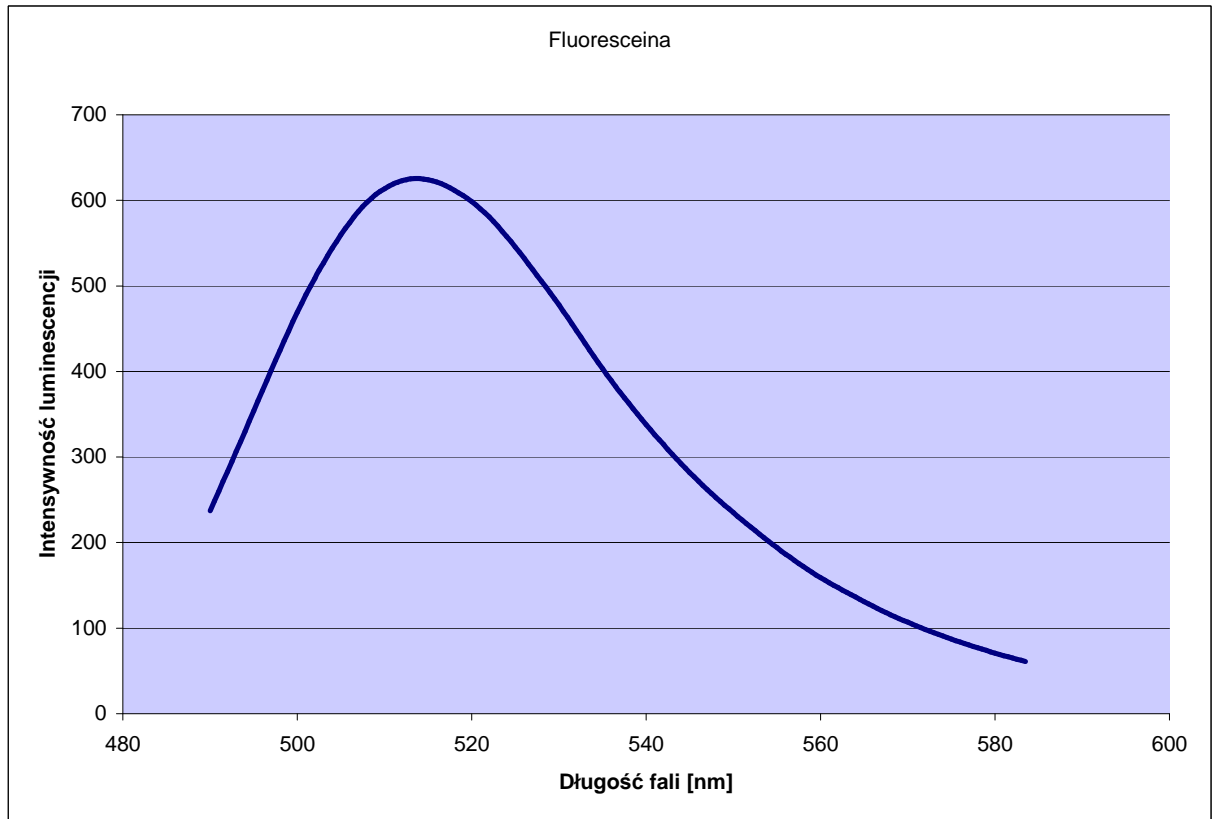
Do wstępnej charakterystyki układu pomiarowego użyto fluoresceiny. Fluoresceina jest jedną z najbardziej znanych substancji fluoryzujących, z wydajnością kwantową osiągającą w wodnych roztworach wodorotlenku sodu wartość 0,92 /71/. Wybór fluoresceiny podyktowany był również tym, że układ pomiarowy zastosowany do pomiarów natężenia fluorescencji fluoresceiny mógł wykorzystywać te same elementy optyczne jak ten zastosowany do pomiarów respirometrii optycznej z wykorzystaniem biosensora tlenowego $\text{Ru}(\text{DPP})_3\text{Cl}_2$ (konstrukcja platformy pomiarowej punkt 4.1.) Istotnie widmo absorpcji fluoresceiny, przedstawione na rysunku 21, wykazuje obecność długofalowych maksimów absorpcji przy długościach fali około 450 i 480 nm.



Rys. 21. Widmo absorpcji etanolowego roztworu fluoresceiny zarejestrowane za pomocą aparatu Jasco SSE-343 V530 UV-Vis Spectrophotometer.

Można, więc użyć jako filtru dla światła wzbudzającego, podobnie jak to było w przypadku biosensora tlenowego, filtru Brightline FF01-472/30-25 firmy Semrock przepuszczającego światło o długości 472 nm (rys. 10). Źródłem światła wzbudzającego może być dioda LXHL-NB98 firmy Luxeon (rys. 8).

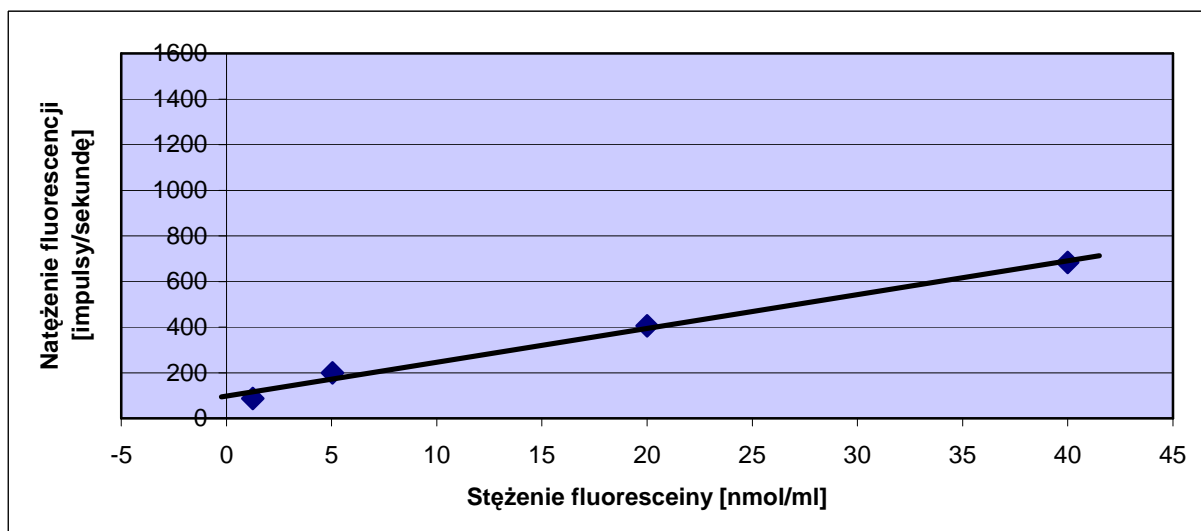
Fluoresceina emituje szerokie pasmo emisji, z maksimum około 510-515 nm, opadające łagodnie w części długofalowej (rys. 22).



Rys. 22. Widmo emisji 0,002 % etanolowego roztworu fluoresceiny zarejestrowane za pomocą spektrofluorymetru LE 50B firmy Perkin Elmer.

Uzasadnia to zastosowanie do pomiarów fluorescencji fluoresceiny zwierciadła dichroicznego FF495-Di02-25x36 i filtra dla emisji Brightline FF01-593/40-25 firmy Semrock, których widma transmitancji przedstawiają odpowiednio rysunki 8 i 7 w rozdziale 4.1.

W celu określenia czułości układu pomiarowego wykonano pomiary natężenia fluorescencji etanolowych roztworów fluoresceiny o stężeniach 1,26-40 nmol/ml co odpowiada 63 pmol-2 nmol fluoresceiny w dołku pomiarowym.



Rys. 23. Wykres zależności natężenia fluorescencji etanolowych roztworów fluoresceiny od stężenia.

Z rysunku 23 wynika, że układ pomiarowy posiada granicę wykrywalności na poziomie około 60 pikomoli fluoresceiny w dołku pomiarowym.

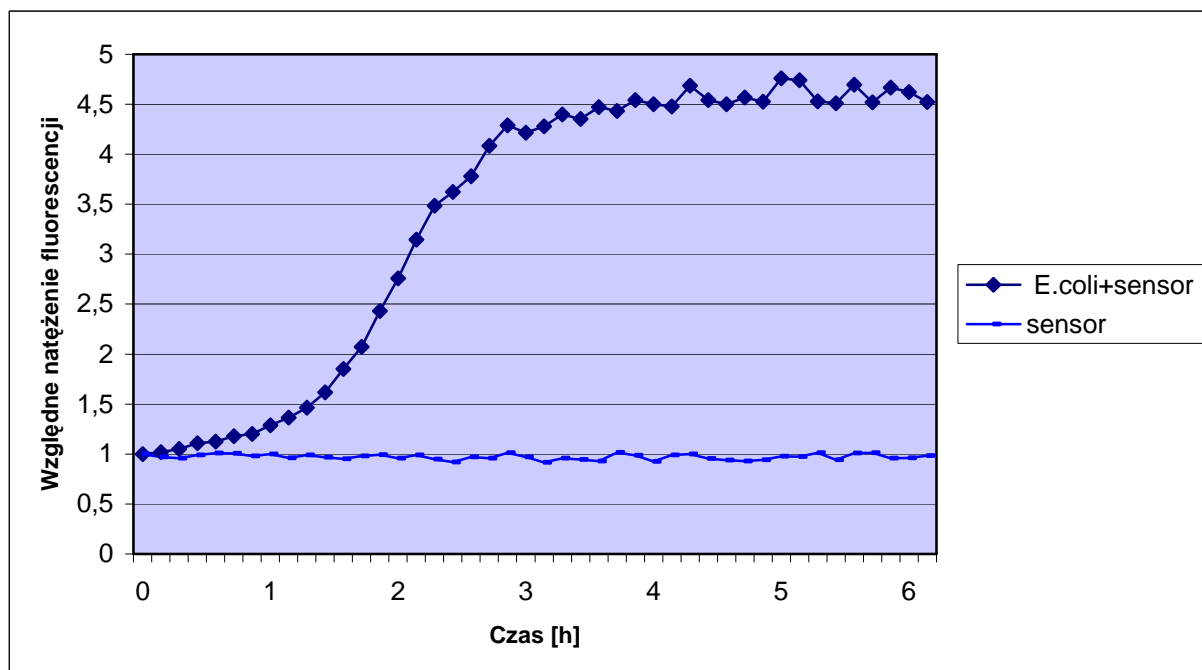
4.3. Wyniki prób biologicznych.

4.3.1. Monitorowanie wzrostu hodowli bakterii za pomocą pomiarów respirometrycznych z wykorzystaniem biosensora tlenowego.

Wstępna charakterystyka platformy pomiarowej wykazała, że stosowany układ pomiarowy jest bardzo czuły i umożliwia rejestrację światła fluorescencji fluoresceiny z progiem detekcji około 60 pikomoli w próbce o objętości 50 μ l. Kolejnym krokiem w ocenie przydatności platformy pomiarowej do analizy wzrostu drobnoustrojów w hodowlach, jest analiza zmian fluorescencji biosensora tlenowego wywołanych aktywnością metaboliczną bakterii. W tym celu do dołków płytki titracyjnej wprowadzano biosensor tris 4,7-difenylo-1,10-fenantrolino dichlorek rutenu (II) ($\text{Ru}(\text{DPP})_3\text{Cl}_2$) zatopiony w krzemionce silikonowej (materiały i metody punkt 3.2.4), a także zawiesinę bakterii. Zatopienie sensora w matrycy silikonowej umożliwia dyfuzję tlenu z analizowanej próbki do biosensora, uniemożliwia natomiast bezpośredni kontakt drobnoustrojów z biosensorem eliminując tym samym potencjalny toksyczny efekt biosensora na bakterie. Na powierzchnię roztworu znajdującego się w dołku pomiarowym płytki titracyjnej,

nawarstwiano ciekłą parafinę, której zadaniem było odcięcie dostępu tlenu do badanej próbki.

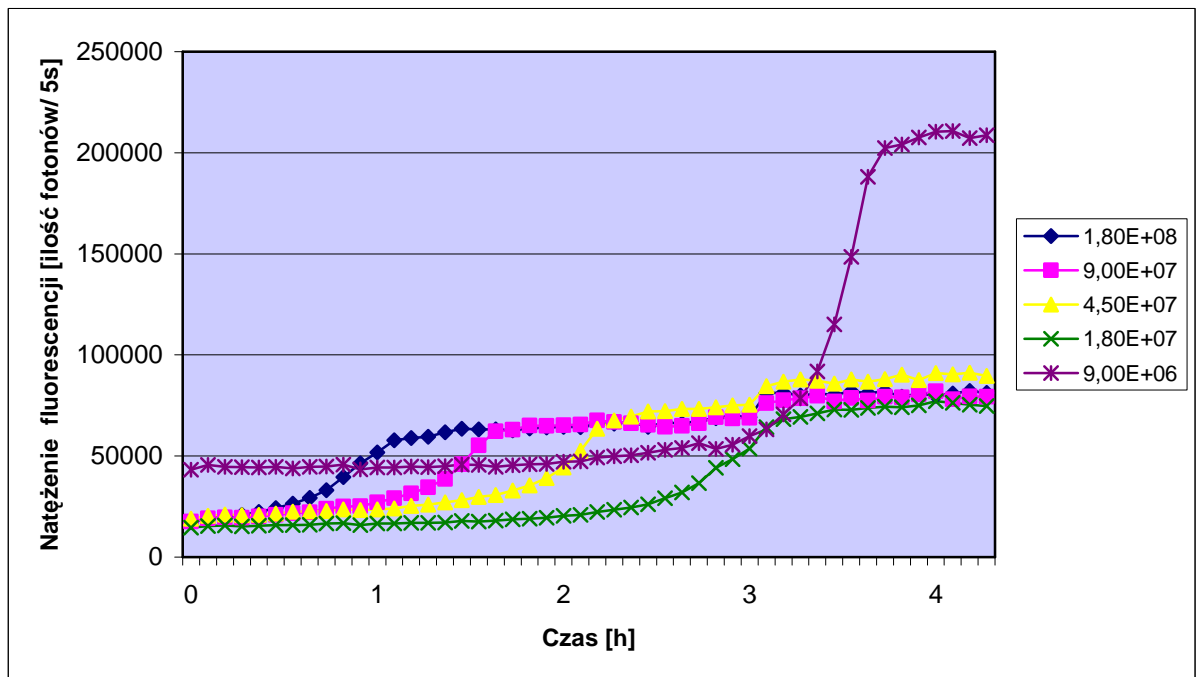
Na rysunku 24 przedstawiono zmiany natężenia fluorescencji w czasie dla próbki zawierającej bakterie *Escherichia coli* i biosensor. Pomiar wykonywano w temperaturze 27°C. Równocześnie wykonano pomiary natężenia fluorescencji próbki zawierającej sam biosensor.



Rys. 24. Zależność względnego natężenia fluorescencji od czasu dla próbki zawierającej biosensor i bakterie *Escherichia coli* ATCC 8739 w temperaturze 27°C. Kontrolę stanowią pomiary samego biosensora.

Z rysunku 24 wynika, że natężenie fluorescencji biosensora tlenowego w czasie inkubacji z bakteriami wzrasta, podczas gdy fluorescencja samego biosensora pozostaje stała. Niskie początkowe wartości natężenia fluorescencji biosensora spowodowane są procesem gaszenia fluorescencji w próbce przez tlen cząsteczkowy. Zużywanie tlenu (wygaszacz fluorescencji) przez rosnące bakterie zmniejsza efektywność procesu wygaszania fluorescencji i w efekcie powoduje wzrost natężenia fluorescencji biosensora. Krzywa zmian fluorescencji ma charakter sigmoidalny typowy dla wzrostu bakterii w hodowlach. Eksperyment ten świadczy o tym, że biosensor obecny w próbce nie wywiera toksycznego wpływu na bakterie, nie hamuje wzrostu bakterii w hodowli i że zmiana natężenia fluorescencji może być miarą ilości zużytego tlenu. Dostarcza tym samym

informacji o aktywności metabolicznej drobnoustrojów i przebiegu hodowli bakterii. W kontrolnych doświadczeniach stwierdzono, że zmianom natężenia fluorescencji towarzyszy wzrost gęstości optycznej hodowli. Można zatem przypuszczać, że użycie do eksperymentu hodowli o mniejszej wyjściowej gęstości hodowli (liczbie komórek w zawiesinie) powinno spowodować, że zmiany natężenia fluorescencji będą miały podobny sigmoidalny charakter, lecz będą przesunięte w czasie. W celu weryfikacji tej sugestii wykonano eksperymenty, w których wyjściowa zawiesina bakterii miała gęstość od 10^6 do 10^8 CFU/ml (rys. 25).



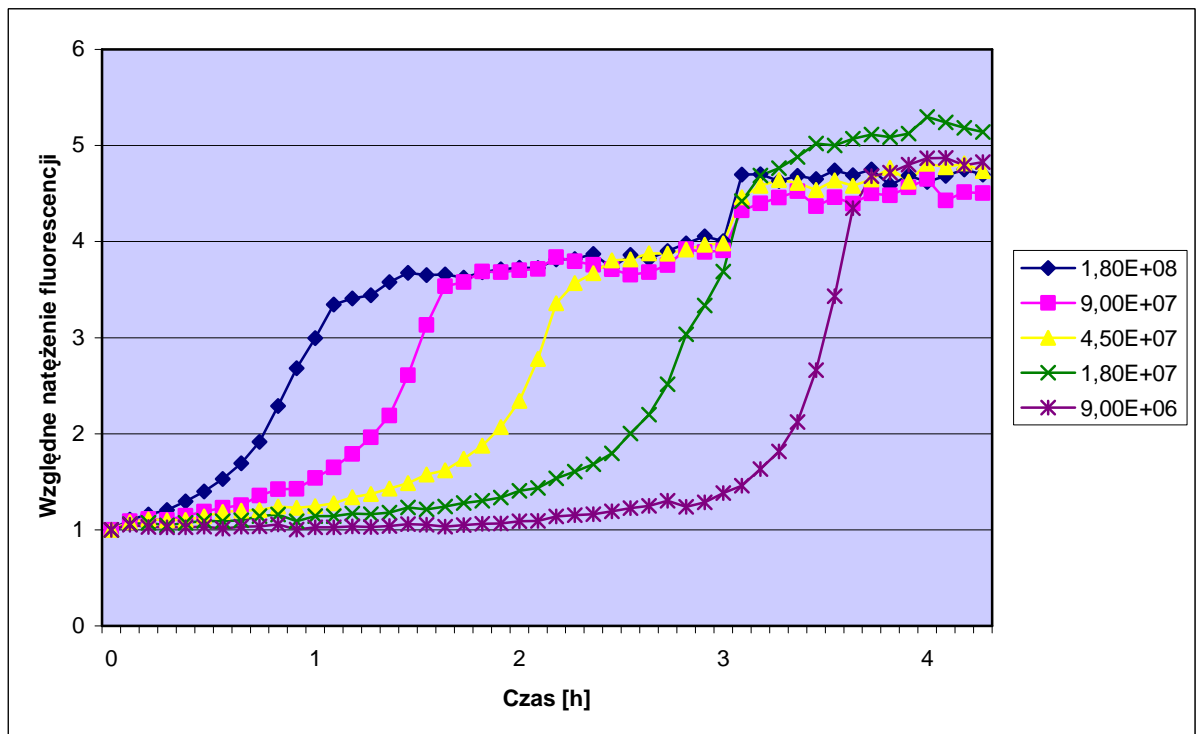
Rys. 25. Zależność natężenia fluorescencji od czasu dla próbek o różnej początkowej gęstości hodowli. W legendzie zaznaczono wyjściowe miana hodowli bakterii *Escherichia coli* ATCC 8739 w badanych próbkach wyrażone w CFU/ml. Hodowlę prowadzono w temperaturze 27°C.

Wszystkie analizowane próbki wykazują sigmoidalny charakter zmian natężenia fluorescencji w czasie. W każdym przypadku, niezależnie od wyjściowej gęstości hodowli bakterii, wszystkie próbki osiągnęły plateau, co oznacza, że osiągnęły one w każdym przypadku fazę stacjonarną. Jednak w zależności od początkowej gęstości bakterii czas osiągnięcia maksymalnego poziomu fluorescencji dla fazy stacjonarnej był różny. Hodowla o gęstości $1,80E+08$ osiągnęła maksimum już po 1 godzinie, podczas gdy najbardziej rozcieńczona potrzebowała około 4 godzin do uzyskania fazy stacjonarnej.

Jedna z krzywych na wykresie różni się od pozostałych. Próbka ta o najmniejszej gęstości wyjściowej hodowli bakterii posiada początkowe wartości natężenia fluorescencji zbliżone do końcowych ustabilizowanych wartości natężenia fluorescencji pozostałych

próbek. Pochodzenie tego faktu można przypisać różnicy w ilości sensora obecnego w dołku płytki titaracyjnej. Ma to związek z tym, że zawiesina sensora $\text{Ru}(\text{DPP})_3\text{Cl}_2$ opłaszczanego na krzemionce i zatopionego w silikonie, wykazuje dużą lepkość, co utrudnia rozpipetowanie do dołków pomiarowych płytki titaracyjnej. Większa ilość biosensora w dołku pomiarowym powoduje podwyższenie wyjściowego natężenia fluorescencji próbki i w efekcie wyższą końcową wartość wyników uzyskiwanych przez hodowlę.

W celu uniezależnienia wyników pomiarów od różnic w wielkości sygnału zależnych od ilości sensora w dołkach przeprowadzono normalizację wyników. W tym celu wszystkie wartości fluorescencji dla poszczególnych krzywych zostały podzielone przez wartości wyjściowe fluorescencji. Znormalizowane krzywe przedstawia wykres na rys 26.

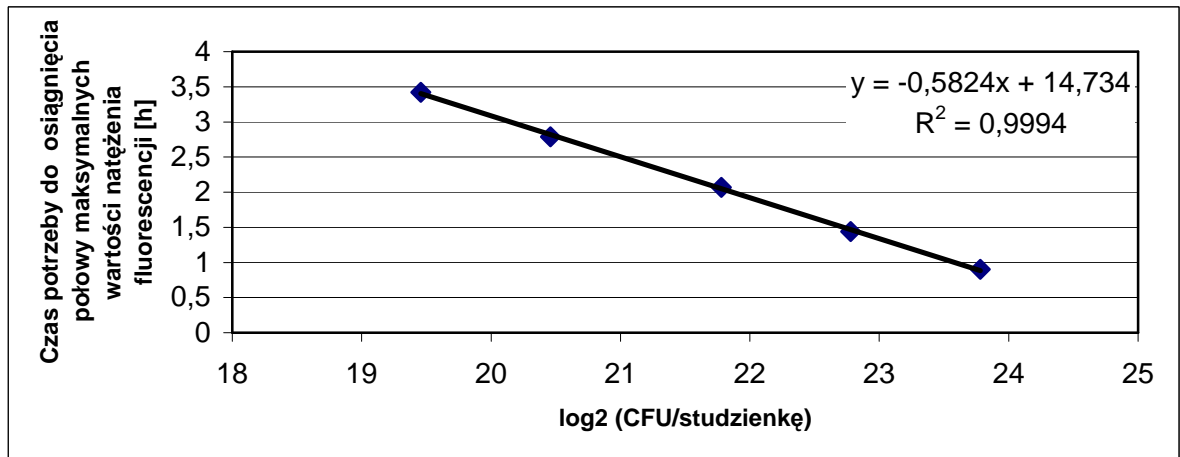


Rys. 26. Zależność względnego natężenia fluorescencji od czasu dla badanych próbek po przeprowadzeniu normalizacji wyników. W legendzie zaznaczono wyjściowe stężenia bakterii *Escherichia coli* w CFU/ml. Pomiary prowadzono w temperaturze 27°C.

Wszystkie krzywe zmian natężenia fluorescencji w czasie mają podobny sigmoidalny charakter osiągając podobny poziom końcowych wartości maksymalnych, różnią się jedynie położeniem punktów przegięcia. Im mniejsza jest początkowa gęstość hodowli bakterii tym dłuższy jest czas do osiągnięcia poziomu maksymalnego.

Do charakterystyki przebiegu każdej z tych hodowli można użyć dowolnego parametru wziętego z sigmoidalnych krzywych zmian fluorescencji w czasie. Może to być

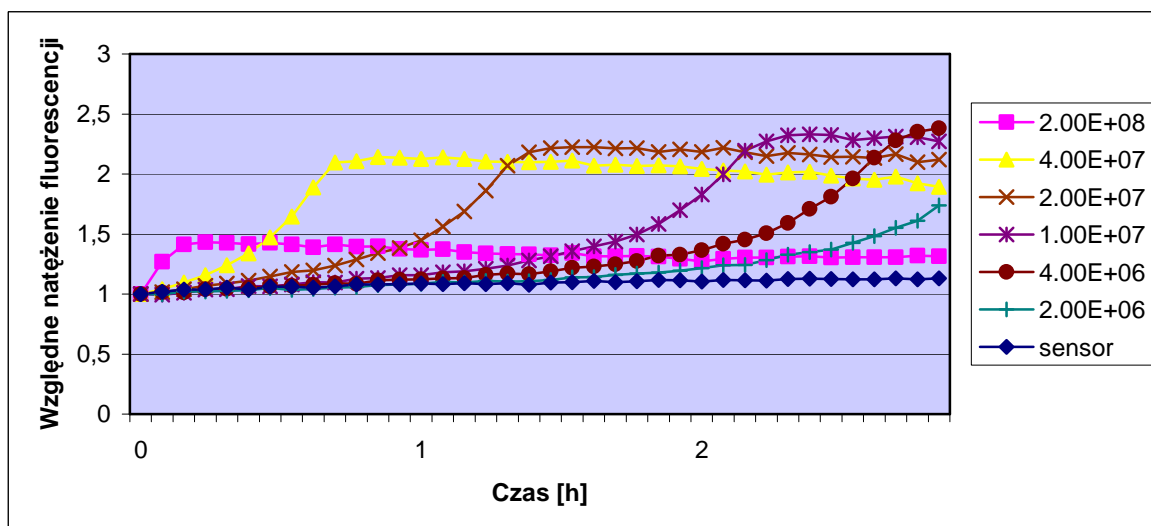
na przykład punkt przegięcia krzywych odpowiadających połowie przyrostu natężenia fluorescencji, lub inny dowolny parametr otrzymany w wyniku przecięcia sigmoidalnych krzywych z prostą równoległą do osi odciętych, przecinającą oś rzędnych w dowolnym punkcie. Na rysunku 27 przedstawiono zależność czasu niezbędnego do osiągnięcia połowy maksymalnej wartości fluorescencji od \log_2 z wyjściowego stężenia hodowli (CFU/studzienkę).



Rys. 27. Zależność czasu niezbędnego do osiągnięcia połowy maksymalnego sygnału fluorescencji od \log_2 (CFU *Escherichia coli*/studzienkę) w temperaturze 27°C.

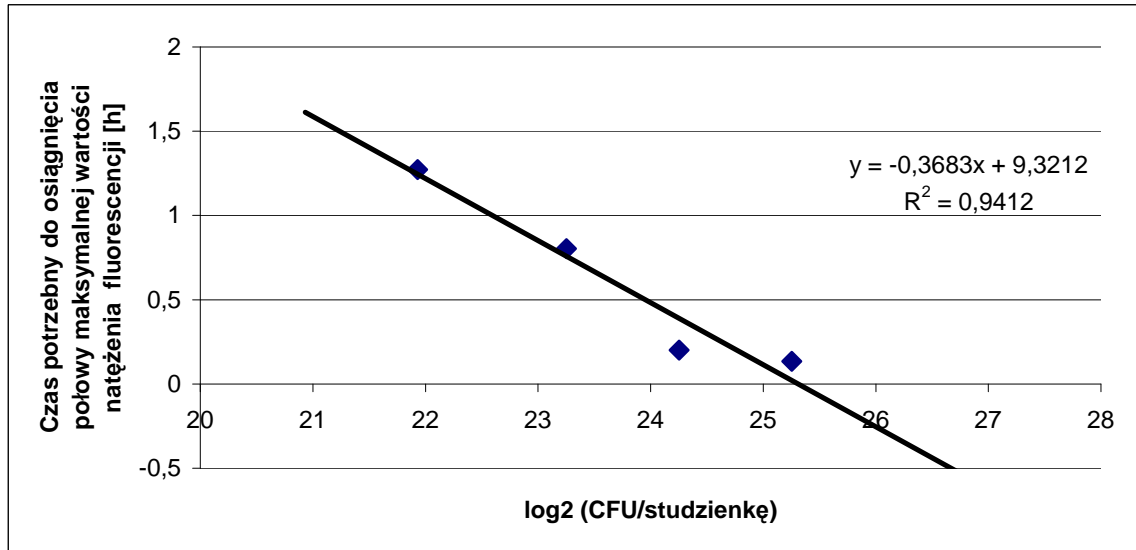
Rysunek 27 przedstawia liniową zależność czasu potrzebnego do osiągnięcia połowy maksymalnych wartości natężenia fluorescencji od \log_2 z wyjściowych gęstości hodowli bakteryjnych, którą opisuje równanie $y = -0,5824x + 14,734$. Oba parametry występujące w równaniu charakteryzują hodowlę. Parametr „a” wyznacza czas generacji dla hodowli bakterii. Natomiast parametr „b” określa czas potrzebny do osiągnięcia połowy maksymalnej wartości fluorescencji przez najmniejsze stężenie bakterii (1 komórkę). W analizowanym przypadku w temperaturze 27°C podział komórek następuje, co 35 minut, natomiast w optymalnych warunkach czas ten jest krótszy i wynosi ok. 30 minut /62/. Najbardziej rozcieńczona hodowla uzyskałaby połowę maksymalnego natężenia fluorescencji po upływie około 15 godzin. Ponadto równanie to pozwala obliczyć ilość bakterii po upływie określonego czasu, jeśli znany jest czas potrzebny do osiągnięcia połowy maksymalnej wartości fluorescencji.

Aby stwierdzić jak na szybkość zmiany natężenia fluorescencji hodowli bakteryjnych i szybkość podziałów bakterii w tych hodowlach wpływa temperatura, wykonano pomiary respirometryczne w temperaturach 32 i 37°C (rys. 28 i 29).



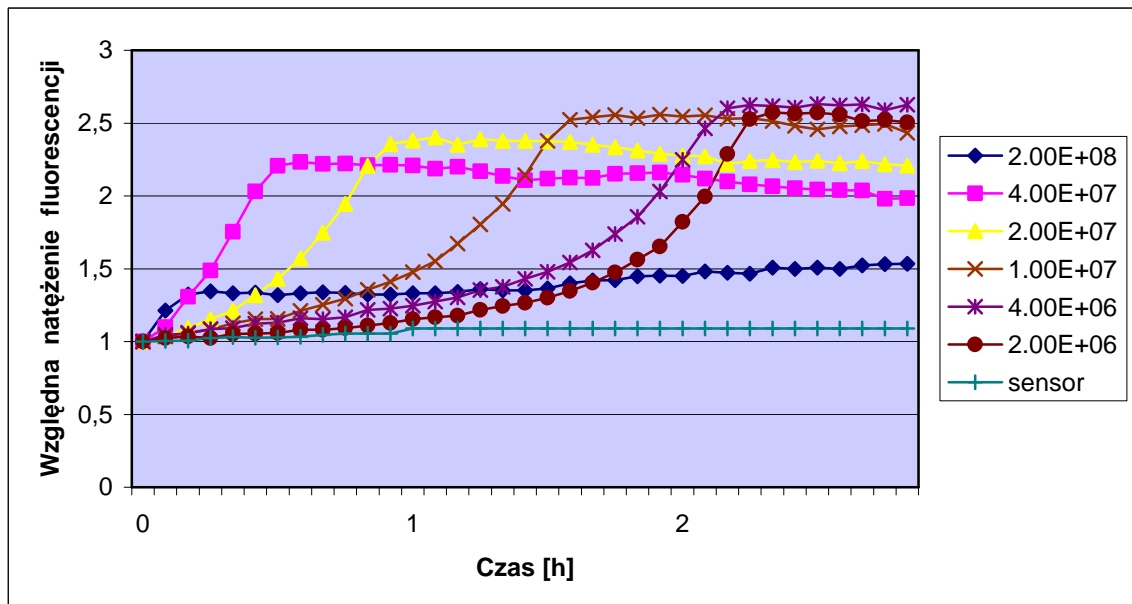
Rys. 28. Zależność względnego natężenia fluorescencji od czasu dla hodowli bakteryjnych o różnych początkowych gęstościach hodowli. W legendzie podano wyjściowe stężenia bakterii *Escherichia coli* ATCC 8739 w CFU/ml. Pomiary przeprowadzono w temperaturze 32°C.

Rysunek 28 przedstawia zmiany natężenia fluorescencji hodowli bakteryjnych o różnych gęstościach rejestrowane w temperaturze 32°C. Charakter zmian natężenia fluorescencji jest podobny do uzyskanych w temperaturze 27°C. Mają one sigmoidalny kształt i osiągają punkty przegięcia krzywych w różnym czasie, zależnym od gęstości wyjściowych hodowli bakteryjnych. Wyjątek stanowi krzywa uzyskana dla hodowli o wyjściowej gęstości 2×10^8 CFU/ml, która osiąga maksymalną wartość natężenia fluorescencji najwcześniej. Zmiana fluorescencji jest w tym przypadku najniższa, spowodowane jest to faktem, że hodowla ta, o największej gęstości wyjściowej, szybko zużywa dostępny tlen i znajduje się w końcowej fazie zmian fluorescencji (krzywa zmian fluorescencji dla tej hodowli znajduje się powyżej punktu przegięcia). Czas generacji, wyznaczony w oparciu o liniową zależność opisaną równaniem $y = -0,3683x + 9,3212$, i przedstawioną na rysunku 29, wynosi 22 minuty.

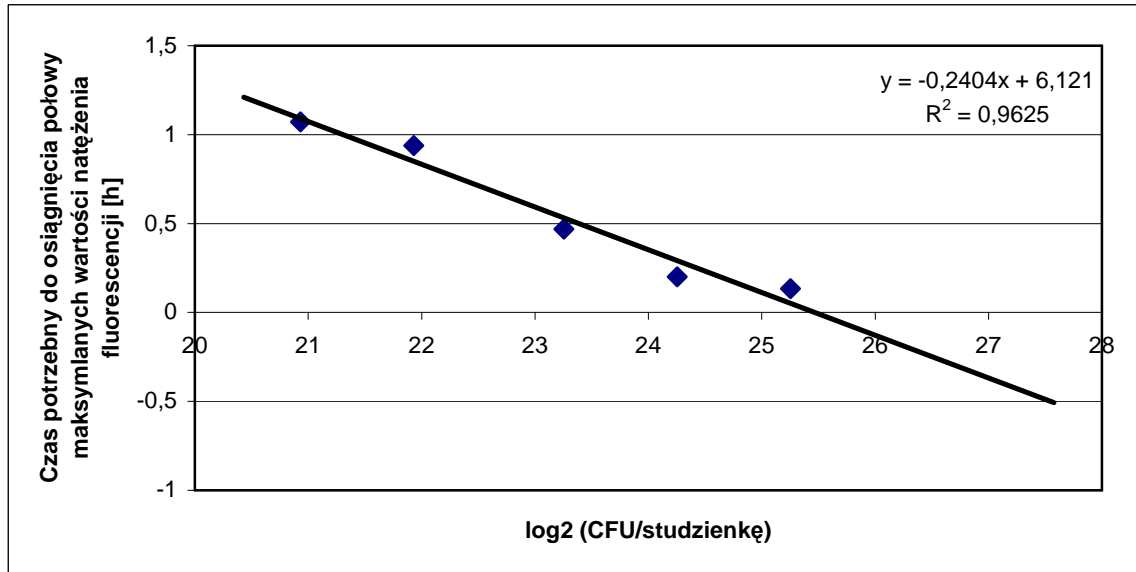


Rys. 29. Zależność czasu niezbędnego do osiągnięcia połowy maksymalnego sygnału od \log_2 (CFU *Escherichia coli* ATCC 8739 /studzienkę) w temperaturze 32°C.

Wyniki analogicznych pomiarów wykonane w temperaturze 37°C, przedstawiono na rysunkach 30 i 31. Czas generacji dla hodowli bakteryjnych w 37°C jest równy około 14 minut.

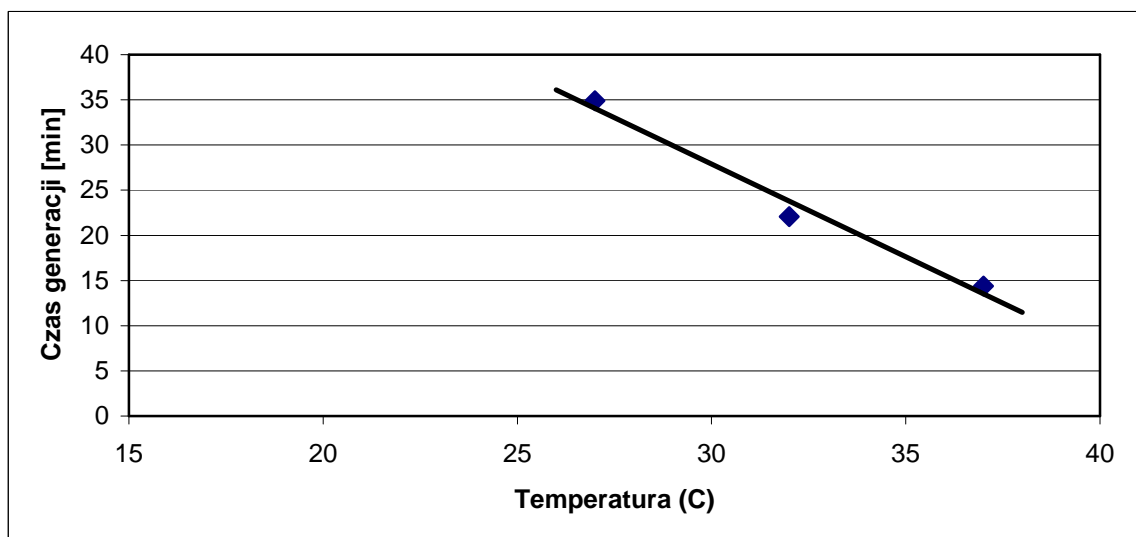


Rys. 30. Zależność względnego natężenia fluorescencji od czasu dla hodowli bakteryjnych o różnych początkowych gęstościach. W legendzie podano wyjściowe stężenia bakterii *Escherichia coli* ATCC 8739 w CFU/ml. Badanie przeprowadzono w temperaturze 37°C.



Rys. 31. Zależność czasu niezbędnego do osiągnięcia połowy maksymalnego sygnału od \log_2 (CFU *Escherichia coli*/studzienkę) w temperaturze 37°C.

Z analiz wpływu temperatury na hodowle bakterii wykonanych metodą fluorescencyjnej respirometrii optycznej wynika, że zgodnie z oczekiwaniami wzrost temperatury zwiększa szybkość wzrostu hodowli bakteryjnych, skracając czas między podziałami. Czas generacji, jak wynika z rysunku 32, jest w przedziale temperatur 27-37°C liniową funkcją temperatury.



Rys. 32. Zależność czasu generacji od temperatury dla hodowli *Escherichia coli* ATCC 8739.

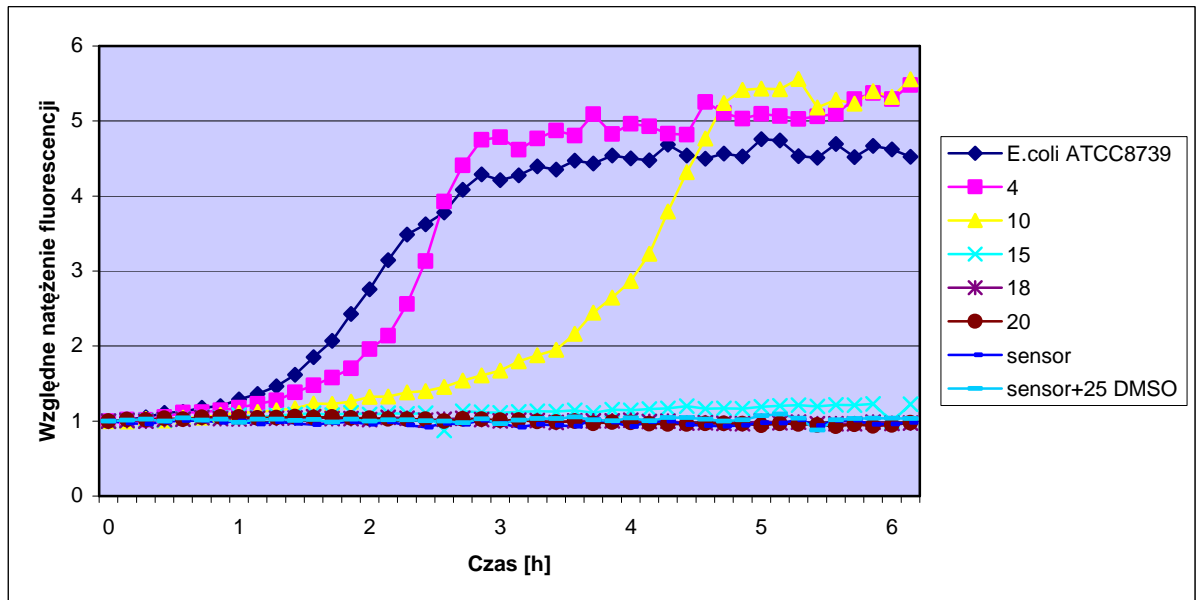
Z omówionych relacji wynika, że istnieje ścisła korelacja pomiędzy ilością zużytego tlenu a intensywnością metaboliczną komórek *Escherichia coli*. Zmiana warunków hodowli, w tym temperatury, składu podłoża, dodanie środków bakteriobójczych znajdzie odbicie w postaci różnej szybkości zmian fluorescencji i w efekcie różnych wartości współczynnika nachylania prostej zależności parametru charakteryzującego hodowlę od \log_2 z CFU, czyli czasu generacji. W związku z tym można przypuszczać, że analizy wykonane z użyciem fluorescencyjnej respirometrii optycznej znajdą szerokie zastosowanie do testowania warunków hodowli, różnych podłoży, określania właściwości antybakteryjnych związków chemicznych, zarówno w rutynowej diagnostyce jak i w badaniach naukowych. Dodatkowym atutem metody respirometrii optycznej jest, jak wykazano w trakcie wstępnych badań, że sam sensor nie posiada właściwości antybakteryjnych i nie hamuje wzrostu bakterii, a w późniejszych, że nie wchodzi w interakcje z badanymi związkami chemicznymi. Najistotniejszą jednak zaletą metody respirometrii optycznej jest to, że metoda ta nie powoduje destrukcji próbki w czasie pomiaru, umożliwia wielokrotną analizę tej samej próbki w różnym czasie, umożliwia zatem ciągłą analizę hodowli bakteryjnej bez ingerencji w analizowany system.

Aby ocenić przydatność nowej metody wykorzystującej pomiary fluorescencji do badań drobnoustrojów przeprowadzono doświadczenia z użyciem środków antybakteryjnych. Jednocześnie wyniki pomiarów respirometrycznych porównano z wynikami uzyskanymi metodą seryjnych rozcieńczeń.

4.3.2. Wpływ dimetylosulfotlenku na bakterie *Escherichia coli*.

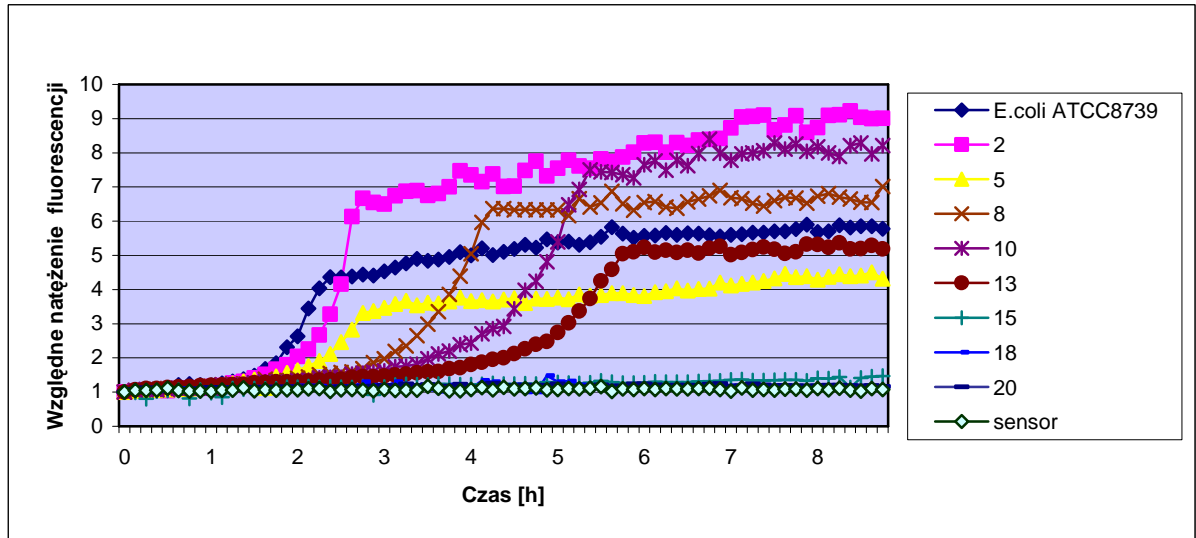
Pierwszym związkiem, którego właściwości przeciwdrobnoustrojowe analizowano za pomocą fluorescencyjnej respirometrii optycznej i skonstruowanego układu pomiarowego, był dimetylosulfotlenek (DMSO). Związku tego używaliśmy jako rozpuszczalnika w badaniach przeciwbakteryjnych właściwości nowosyntetyzowanych związków chemicznych [76, 82, 41, 75, 83]. Było to konieczne w przypadku badań związków trudno rozpuszczalnych w wodzie. Z naszych wcześniejszych badań wynika jednak, że sam DMSO w wyższych stężeniach wywiera toksyczny wpływ na drobnoustroje. Dlatego też celowe jest określenie, w jakim zakresie stężeń DMSO może być stosowany do przygotowania próbek do określania wartości MIC nowosyntetyzowanych związków chemicznych. Zbyt wysokie stężenia DMSO mogłyby wpływać na wartość MIC badanego związku. Mechanizm toksycznego działania DMSO na bakterie nie jest znany, wiadomo

jednak, że jest on „zmiataczem” rodników hydroksylowych i znosi działanie menadionu, którego wpływ realizuje się przez generowanie nadtlenków /65/. Na rysunku 33 przedstawiono wyniki eksperymentów, w których analizowano wpływ różnych stężeń DMSO na bakterie *Escherichia coli*.



Rys. 33. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji hodowli *Escherichia coli* ATCC 8739 od czasu dla różnych stężeń DMSO w hodowli. Dane zamieszczone w legendzie zawierają procentowe stężenia roztworów DMSO. Pomiary prowadzono w temperaturze 27°C.

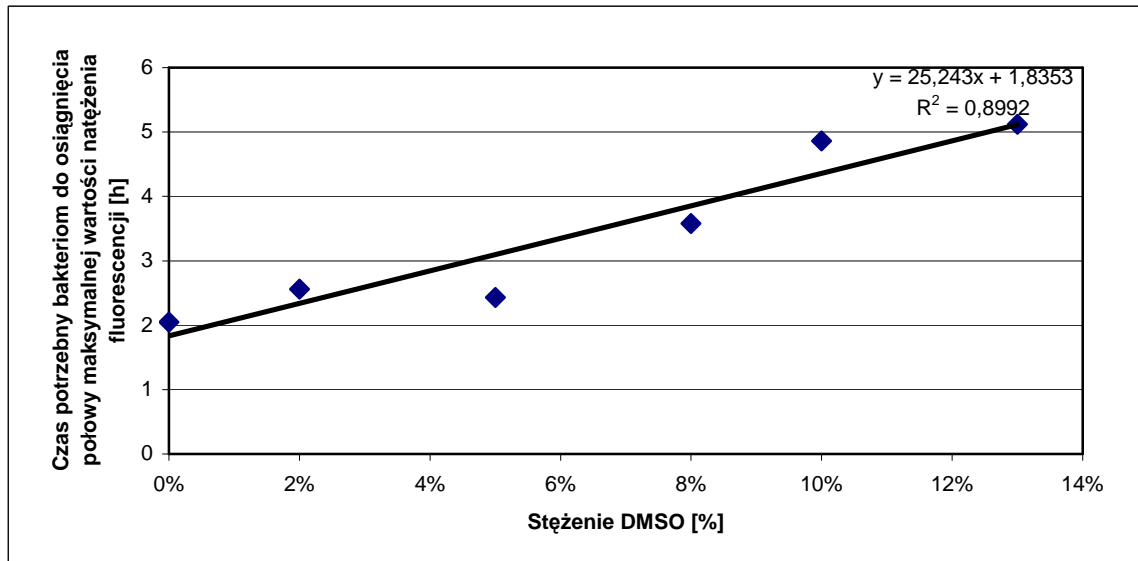
Z rysunku wynika, że toksyczne stężenie DMSO dla bakterii to stężenie wyższe od 10 %. Stężenia 15, 18 i 20 % DMSO w hodowli bakteryjnej hamują przyrost natężenia fluorescencji hodowli. Wykazano również, że sam DMSO w stężeniu 25 % nie wpływa na fluorescencję sensora. Interesujące jest, że w zakresie niskich stężeń DMSO (4 i 10 %) obserwuje się wzrost hodowli bakteryjnych, które osiągają maksymalne wartości fluorescencji zbliżone do natężeń fluorescencji hodowli bakterii bez DMSO. Jednak w tym przypadku niekorzystny wpływ DMSO przejawia się w przesunięciu czasowym krzywych wzrostu tych hodowli bakteryjnych. Aby dokładniej określić zakres stężeń DMSO niekorzystnie wpływających na drobnoustroje, wykonano pomiary z wykorzystaniem fluorescencyjnej respirometrii optycznej hodowli bakterii w obecności szerokiego zakresu stężeń DMSO (rys. 34).



Rys. 34. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji hodowli *Escherichia coli* ATCC 8739 od czasu dla różnych stężeń DMSO w hodowli. Dane zamieszczone w legendzie do rysunku zawierają stężenia roztworów DMSO wyrażone w procentach. Warunki eksperymentu były podobne jak przy pomiarach przedstawionych na rysunku 29.

Rysunek 34 pozwala uściślić, że hamujące wzrost hodowli bakteryjnych są stężenia DMSO wyższe od 13 %. Krzywa zmian natężenia fluorescencji dla hodowli zawierającej 13 % DMSO ma typowy sigmoidalny charakter i osiąga wartości maksymalne podobnie jak hodowla bakterii bez DMSO. Najbardziej interesujący wydaje się fakt, że niekorzystny wpływ w zakresie małych stężeń DMSO zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia DMSO. Krzywe natężenia fluorescencji uzyskane dla hodowli w obecności 2, 5, 8, 10 i 13 % DMSO zachowują ten sam sigmoidalny charakter, lecz w miarę wzrostu stężenia DMSO są coraz bardziej przesunięte w czasie. Opóźnienie jest to tym większe, im większe jest stężenie DMSO.

Aby stwierdzić, jaki typ zależności zachodzi między czasem, przy którym względne natężenie fluorescencji osiąga połowę maksymalnej wartości natężenia fluorescencji (można tu użyć każdego innego arbitralnie przyjętego parametru charakteryzującego hodowlę bakterii odczytanego z wykresu) a stężeniem DMSO, sporządzono wykres, który przedstawia rysunek 35.



Rys. 35. Wykres zależności czasu potrzebnego do osiągnięcia połowy maksymalnej wartości natężenia fluorescencji od stężenia DMSO.

Wykres na rysunku 35 przedstawia liniową zależność parametru charakterystycznego dla hodowli od stężenia DMSO. Z wykresu wynika, że wraz ze wzrostem stężenia DMSO w próbce z bakteriami wydłużeniu ulega proporcjonalnie czas potrzebny bakteriom do osiągnięcia połowy maksymalnej wartości natężenia fluorescencji.

Aby porównać wyniki analiz wpływu DMSO na drobnoustroje uzyskane metodą fluorescencyjnej respirometrii optycznej z wynikami oznaczeń MIC (minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów) wykonanych metodą klasyczną, wyznaczono stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów metodą seryjnych rozcieńczeń. Do eksperymentów użyto dwóch szczepów bakterii: *Escherichia coli* ATCC 8739 oraz *Escherichia coli* 6002 (tabela 3).

4. WYNIKI I DYSKUSJA

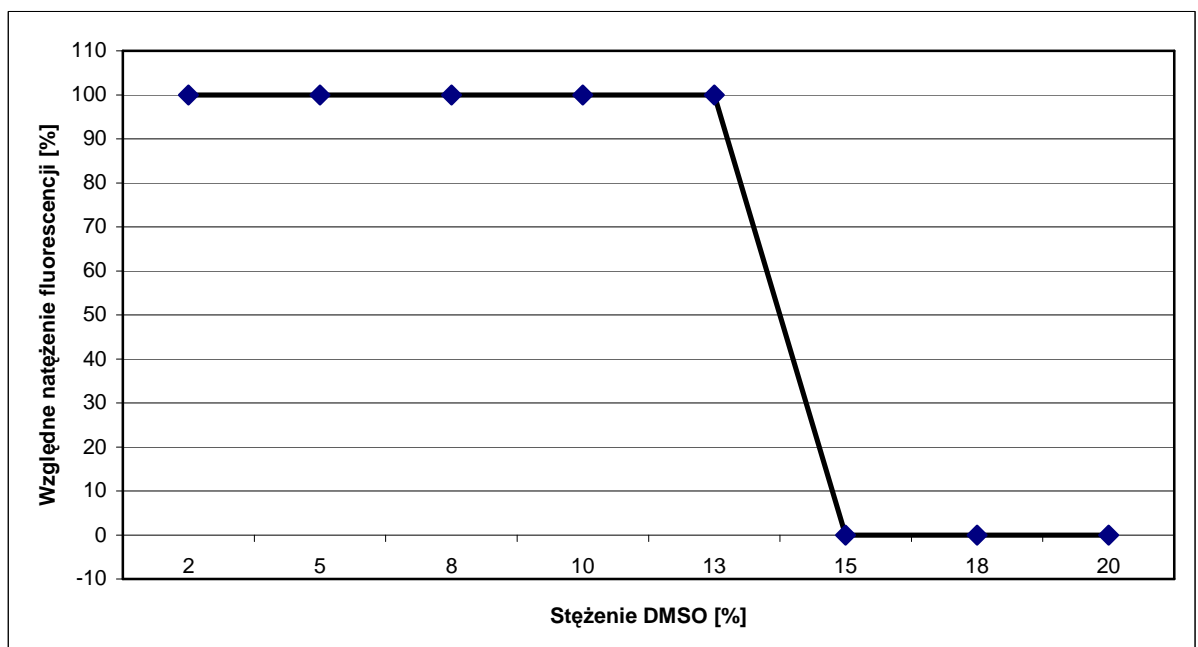
Tabela 3. Wyznaczanie minimalnego stężenia DMSO hamującego wzrost dla dwóch szczepów *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Escherichia coli* 6002.

SZCZEP BAKTERII	STĘŻENIE DMSO [%]						
	20	15	13	10	8	5	2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	- MIC	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> 6002	-	- MIC	+	+	+	+	+

„+”- wzrost bakterii w próbce

„-”- brak wzrostu bakterii w próbce

Z tabeli 2 wynika, że oba szczepy bakterii wykazują podobną wrażliwość na DMSO, rosną w obecności 13 % DMSO. Wartość MIC jest równa 15 %. Próba wyznaczenia MIC dla DMSO w oparciu o pomiary fluorescencyjnej respirometrii optycznej daje wartości identyczne z wartościami MIC wyznaczonymi metodą seryjnych rozcieńczeń (rys. 36).



Rys. 36. Wykres zależności maksymalnej względnej wartości fluorescencji uzyskanej przez hodowle bakteryjne od stężenia DMSO. Maksymalną wartość natężenia fluorescencji osiągniętą przez rosnące hodowle bakteryjne przyjęto za 100 %.

Z analiz wpływu DMSO na bakterie wykonanych metodą tradycyjną i metodą fluorescencyjnej respirometrii optycznej wynika, że obie metody pozwalają uzyskać tę samą wartość MIC. Natomiast metoda respirometrii optycznej dostarcza znacznie więcej informacji w porównaniu z metodą tradycyjną, zwłaszcza gdy dotyczy to toksycznego wpływu małych stężeń DMSO na bakterie. Ponadto zastosowanie metody fluorescencyjnej respirometrii optycznej powoduje znaczne skrócenie czasu eksperymentu. Wartości określające MIC można uzyskać już po upływie 4 godzin. Natomiast zwiększając wyjściowe stężenie bakterii w hodowli można ten wynik uzyskać ze znacznym skróceniem czasu badania do 1-2 godzin (rys. 30).

4.3.3. Analiza wpływu ampicyliny na komórki *Escherichia coli*.

Jednym z najważniejszych zastosowań pomiarów MIC jest określanie najniższego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów dla antybiotyków. W oparciu o uzyskane wartości MIC ocenia się czy dany szczep jest wrażliwy na antybiotyk i podejmuje się decyzje o sposobie leczenia pacjenta. Również wprowadzanie nowych chemioterapeutyków do użytku w medycynie poprzedzone musi być badaniami wpływu tych związków na drobnoustroje. Celowe jest więc wykonywanie prób przydatności zastosowania respirometrii optycznej do określania wartości MIC dla antybiotyków. Jako przykład mogą służyć badania wpływu ampicyliny (antybiotyku z grupy β -laktamów) na dwa szczepy bakterii różniące się wrażliwością na antybiotyk. Te dwa szczepy to: *Escherichia coli* ATCC 8739 oraz *Escherichia coli* 6002. Wartości MIC określone metodą seryjnych rozcieńczeń przedstawia tabela 4.

4. WYNIKI I DYSKUSJA

Tabela 4. Wyznaczanie wartości MIC ampicyliny dla dwóch szczepów *Escherichia coli* różniących się wrażliwością na ten antybiotyk.

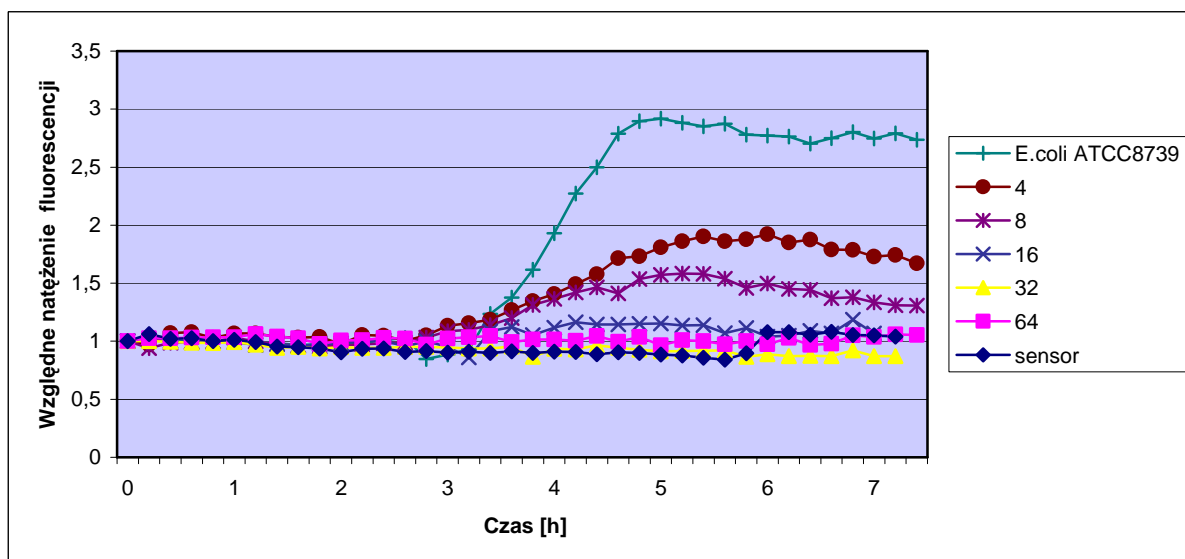
SZCZEP BAKTERII	STĘŻENIE AMPICYLINY [$\mu\text{g/ml}$]											
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0125
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> 6002	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

„+”- wzrost bakterii w próbce

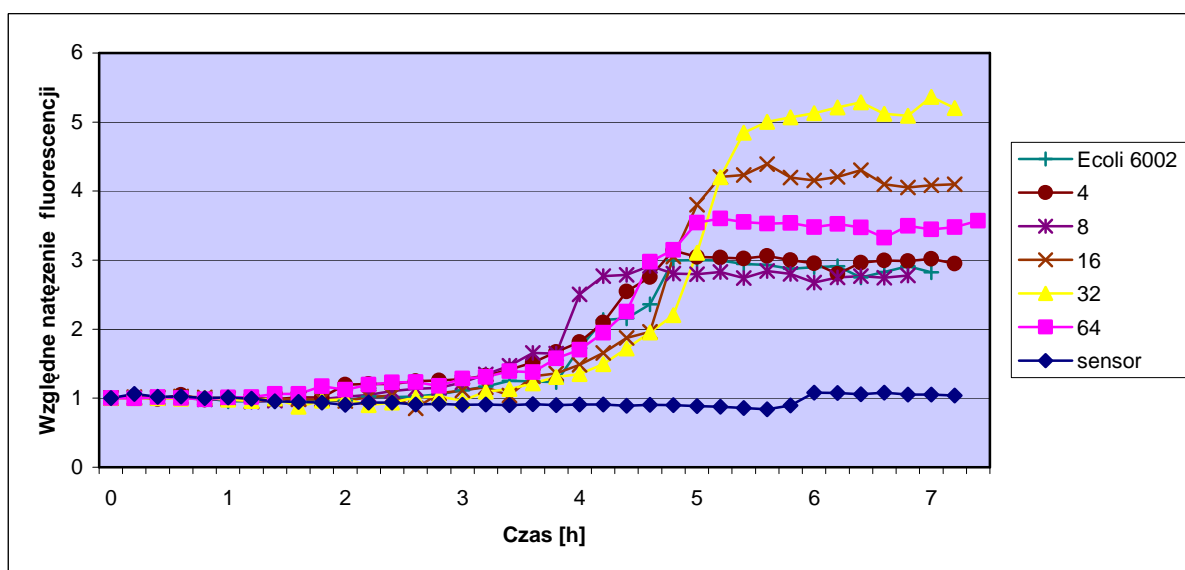
„-”- brak wzrostu bakterii w próbce

Wyniki przedstawione w tabeli 3 pozwalają stwierdzić wzrost szczepu *Escherichia coli* 6002 w całym zakresie stosowanych stężeń ampicyliny, to jest do 64 $\mu\text{g/ml}$ włącznie. Jest to zatem szczep odporny zgodnie z zaleceniami CLSI (z ang. Clinical and Laboratory Standards Institute). Natomiast w przypadku szczepu *Escherichia coli* ATCC 8739 stwierdzono, że najmniejsze stężenie hamujące ma wartość 16 $\mu\text{g/ml}$, i według zaleceń CLSI uważać należy ten szczep za średniowrażliwy.

Na rysunkach 37 i 38 przedstawiono wyniki pomiarów respirometrycznych dla obu szczepów bakteryjnych.



Rys. 37. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji hodowli bakteryjnych *E.coli* ATCC 8739 od czasu dla różnych stężeń ampicyliny w próbce. W legendzie podano stężenia ampicyliny wyrażone w $\mu\text{g/ml}$. Pomiary wykonywano w temperaturze 27°C .



Rys. 38. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji hodowli bakteryjnych *E.coli* 6002 od czasu dla różnych stężeń ampicyliny w badanej próbce. W legendzie podano stężenia ampicyliny wyrażone w $\mu\text{g/ml}$. Pomiary wykonywano w 27°C

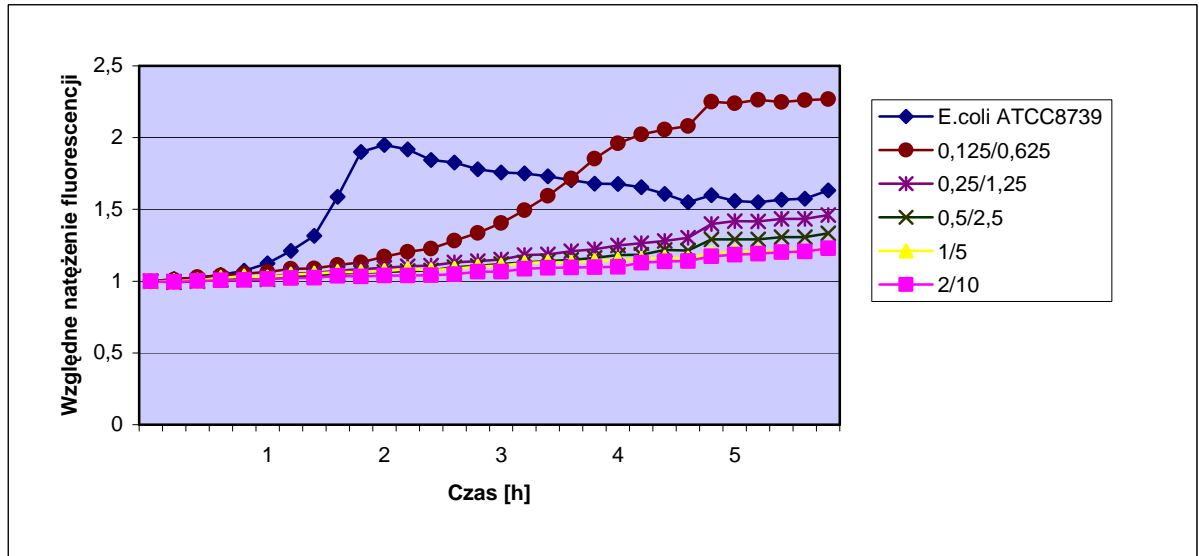
Rysunek 37 pozwala stwierdzić, że bakterie szczepu ATCC 8739 rosną w obecności ampicyliny o stężeniach 4 i 8 $\mu\text{g/ml}$. Stężenia ampicyliny 16, 32 i 64 $\mu\text{g/ml}$ powodują zahamowanie wzrostu bakterii. Świadczy to o tym, że wartości MIC dla ampicyliny

wyznaczone za pomocą metody respirometrii optycznej przez pomiar fluorescencji zgadzają się z wartościami MIC wyznaczonymi metodą tradycyjną. Z rysunku 37 wynika również, że w przeciwieństwie do DMSO (rys. 33, 34 i 35) hodowle bakteryjne w obecności ampicyliny o stężeniach 4 i 8 $\mu\text{g/ml}$ nie powodują znaczącego przesunięcia krzywych zmian fluorescencji w czasie. Interesującym aspektem tych analiz jest fakt, że amplitudy wartości natężenia fluorescencji osiągane przez hodowle bakterii w obecności ampicyliny o stężeniach 4 i 8 $\mu\text{g/ml}$, są niższe od wartości natężenia fluorescencji osiąganych przez hodowle bakterii w pożywce bez antybiotyku. Efekt ten jest tym większy im wyższe jest stężenie antybiotyku. Można by sądzić zatem, że wielkość amplitudy zmian natężenia fluorescencji w pomiarach respirometrycznych może być kolejnym parametrem służącym do analizy wpływu związków chemicznych na drobnoustroje. Takiej sugestii nie potwierdzają jednak analizy krzywych na rysunkach 34 (DMSO) i 38. W świetle dalszych analiz założenie to wydaje się błędne.

Istotną różnicą, jaką wykazuje szczep *Escherichia coli* 6002 w stosunku do szczepu wrażliwego, jest brak zahamowania wzrostu w obecności wszystkich badanych stężeń antybiotyku (rys. 38). Wszystkie krzywe zmian fluorescencji bakterii hodowanych w obecności stężeń od 4 do 64 $\mu\text{g/ml}$ osiągają maksymalne wartości fluorescencji po czasie około 5 godzin. Wynik ten jest zatem zgodny z doświadczalnie określoną wartością MIC dla szczepu *Escherichia coli* 6002 wyznaczoną metodą tradycyjną (tabela 3).

4.3.4. Wpływ ko-timoksazolu (trimetoprimu/sulfametaksazolu) na bakterie *Escherichia coli*.

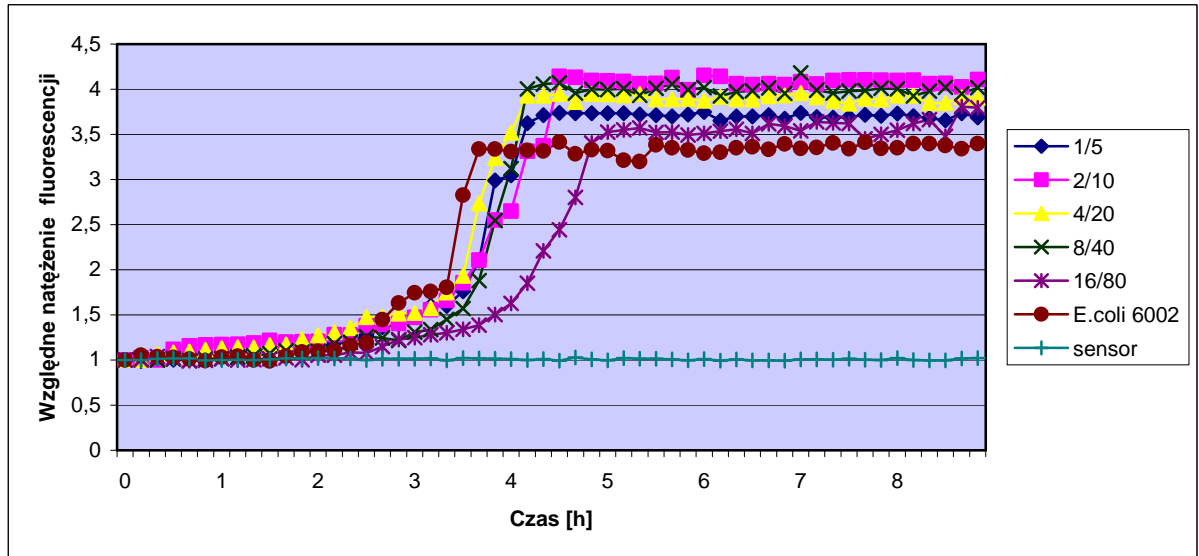
Kolejnym przykładem wykorzystania respirometrii optycznej mogą być analizy wpływu innego chemioterapeutyku (ko-timoksazolu), który działa na bakterie jako antymetabolit. Ko-timoksazol jest mieszaniną dwóch chemioterapeutyków trimetoprimu i sulfametaksazolu i w takiej postaci jest stosowany klinicznie. Oba wymienione związki działają synergistycznie, hamując powstawianie kwasu tetrahydrofoliowego. Sulfametaksazol będąc analogiem PABA (kwas p-aminobenzoowy) hamuje syntezę dihydropterynianu, podczas gdy trimetoprim działa na reduktazę kwasu dihydrofoliowego. Do analizy wpływu ko-timoksazolu na bakterie wykorzystano dwa szczepy: *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Escherichia coli* 6002.



Rys. 39. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji hodowli bakteryjnej *E.coli* ATCC 8739 do czasu dla różnych stężeń ko-timoksazolu. W legendzie podano stężenia ko-timoksazolu wyrażone w $\mu\text{g/ml}$.

Z wykresu przedstawionego na rysunku 40 wynika, że ko-timoksazol o stężeniach 0,126/0,625, 0,25/1,25 i 0,5/2,5 pozwala na wzrost bakterii w obecności chemioterapeutyku. Jednak wraz ze wzrostem stężenia chemioterapeutyku następuje bardzo znaczące spowolnienie szybkości wzrostu. Efekt ten jest silnie widoczny zwłaszcza w odniesieniu do stężeń ko-timoksazolu równych 0,25/1,25 i 0,5/2,5. Stężenia 1/5 oraz 2/10, dla których krzywe się pokrywają, praktycznie oznaczają zahamowanie wzrostu. Na podstawie zależności przedstawionych na rysunku 39 można przyjąć, że wartość MIC ko-timoksazolu wyznaczona dla szczep *E.coli* ATCC 8739 jest równa 1/5 $\mu\text{g/ml}$.

W przeciwieństwie do *E.coli* ATCC 8739, której krzywe wzrostu przedstawiono na rysunku 39, *E.coli* 6002 wykazuje oporność na wszystkie stosowane stężenia ko-timoksazolu (rys. 40).



Rys. 40. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji hodowli *E.coli* 6002 do czasu dla różnych stężeń ko-timoksazolu. W legendzie przedstawiono stężenia ko-timoksazolu wyrażone w $\mu\text{g/ml}$.

Czasowe zależności krzywych wzrostu *E. coli* 6002 w obecności ko-timoksazolu o stężeniach: 1/5, 2/10, 4/20 i 8/40 $\mu\text{g/ml}$ zbliżone są do przebiegu krzywej dla hodowli bakterii bez działania antybiotyku. Jedynie w obecności najwyższego stężenia 16/80 $\mu\text{g/ml}$ krzywa wzrostu jest znacząco przesunięta w czasie. Z analizy krzywych wynika zatem, że szczep *E.coli* 6002 wykazuje oporność na ko-timoksazol w całym zakresie badanych stężeń. Aby stwierdzić czy wyniki pomiarów wrażliwości obu badanych szczepów *Escherichia coli* na kotimoksazol (trimetoprim/sulfametaksazol) wykonanych metodą respirometryczną są zgodne z zaleceniami CLSI wyznaczono wartości MIC metodą seryjnych rozcieńczeń. Wyniki przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Wyniki oznaczania MIC ko-timoksazolu (trimetoprimu/sulfametaksazolu) dla dwóch szczepów *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Escherichia coli* 6002.

SZCZEP BAKTERII	STĘŻENIE KO-TIMOKSAZOLU [$\mu\text{g/ml}$]											
	32/160	16/80	8/40	4/20	2/10	1/5	0,5/ 2,5	0,25/ 1,25	0,125/ 0,625	0,0625/ 0,3125	0,03125/ 0,156	0,0156/ 0,078
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> 6002	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

„+”- wzrost bakterii w próbce

„-”- brak wzrostu bakterii w próbce

Z tabeli 4 wynika, że wartości MIC dla *E.coli* ATCC 8739 wynosi 1/5 $\mu\text{g/ml}$, natomiast wartości MIC dla *E. coli* 6002 nie można wyznaczyć, gdyż jest to szczep oporny w całym zakresie badanych stężeń chemioterapeutyków. Istnieje zatem całkowita zgodność oznaczeń wzrostu bakterii w obecności ko-timoksazolu wykonanych metodą seryjnych rozcieńczeń i z zastosowaniem fluorescencyjnej respirometrii optycznej.

4.3.5. Wpływ metali ciężkich na wzrost bakterii *Escherichia coli*.

Interesującym zastosowaniem respirometrii optycznej mogą być analizy toksycznego działania jonów metali ciężkich na drobnoustroje. Stanowi to przedmiot badań mikrobiologii środowiskowej. Ma również istotne znaczenie dla badań medycznych i toksykologicznych.

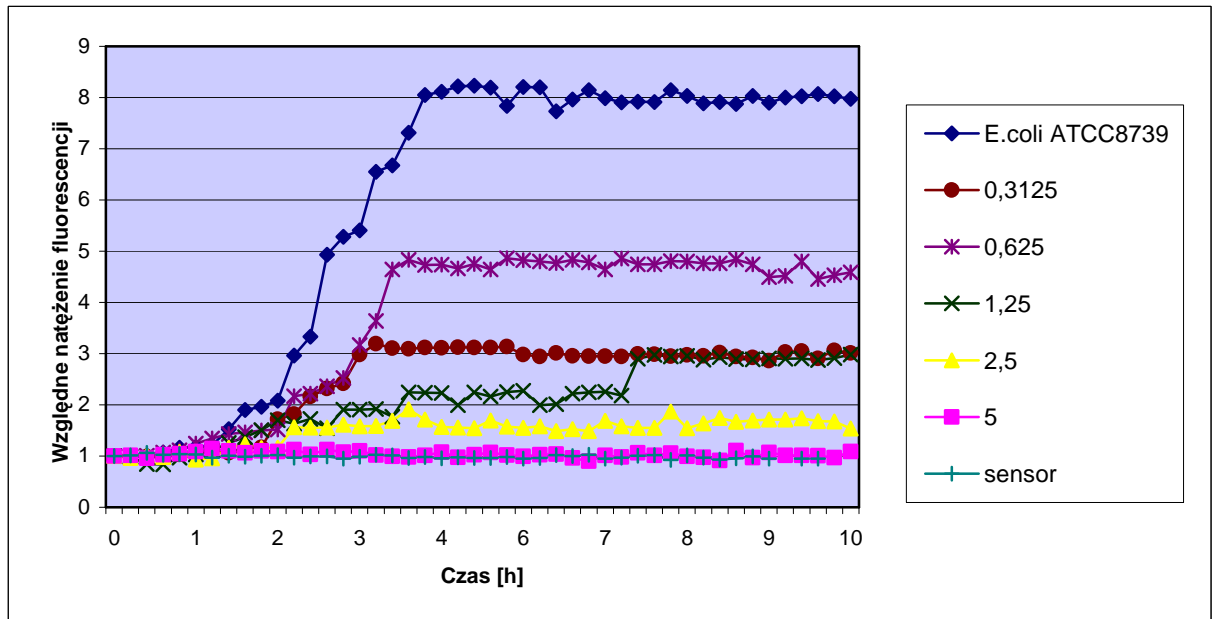
Analiza toksycznego wpływu metali ciężkich na drobnoustroje nabiera nowego znaczenia w świetle wielu doniesień wskazujących na rolę zanieczyszczeń środowiska w rozprzestrzenianiu oporności na antybiotyki. Z badań tych wynika, że geny warunkujące oporność na metale ciężkie i antybiotyki występują wspólnie w różnego rodzaju mobilnych elementach genetycznych np.: plazmidach, integronach. Już wczesne prace Summers i wsp.

4. WYNIKI I DYSKUSJA

wykazały, że oporność na rtęć i antybiotyki była wspólnie przenoszona, między różnymi rodzajami bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* /cytowane za 6/. Genetyczny związek (wspólna lokalizacja) genów warunkujących oporność na metale ciężkie i antybiotyki powoduje, że obecność metali w środowisku życia drobnoustrojów wywiera presję selekcyjną (ko-selekcję) zwiększającą szanse przeżycia szczepów w obecności antybiotyków.

Aby ocenić toksyczny wpływ jonów metali ciężkich na drobnoustroje przeprowadzono analizy wzrostu hodowli bakteryjnych w obecności jonów niklu, miedzi i cynku.

Wyniki pomiarów respirometrycznych wpływu jonów niklu na szczep *E. coli* przedstawiono na rysunku 41



Rys. 41. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji od czasu dla hodowli szczepu *E.coli* ATCC 8739 w obecności różnych stężeń jonów niklu. W legendzie podano odpowiednie mikromolarne stężenia jonów niklu. Pomiary przeprowadzono w temperaturze 27°C.

Krzywe przedstawione na rysunku 41 pozwalają stwierdzić, że szczep *E.coli* ATCC 8739 wykazuje wzrost w obecności 0,31-2,5 mM stężeń jonów niklu. Jedynie dla stężenia 5 mM obserwuje się całkowite zahamowanie wzrostu, a krzywa zmian fluorescencji w czasie pokrywa się z krzywą zmian dla sensora. Krzywe wzrostu wykazują podobne zależności czasowe, różnią się natomiast maksimum natężenia fluorescencji. W tabeli 6 przedstawiono wartości MIC wyznaczone metodą seryjnych rozcieńczeń.

Tabela 6. Wyznaczanie wartości MIC jonów niklu dla szczepów *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Escherichia coli* 6002 metodą seryjnych rozcieńczeń.

SZCZEP BAKTERII	STĘŻENIE JONÓW NIKLU [mM]				
	5	2,5	1,25	0,625	0,125
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	–	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> 6002	–	+	+	+	+

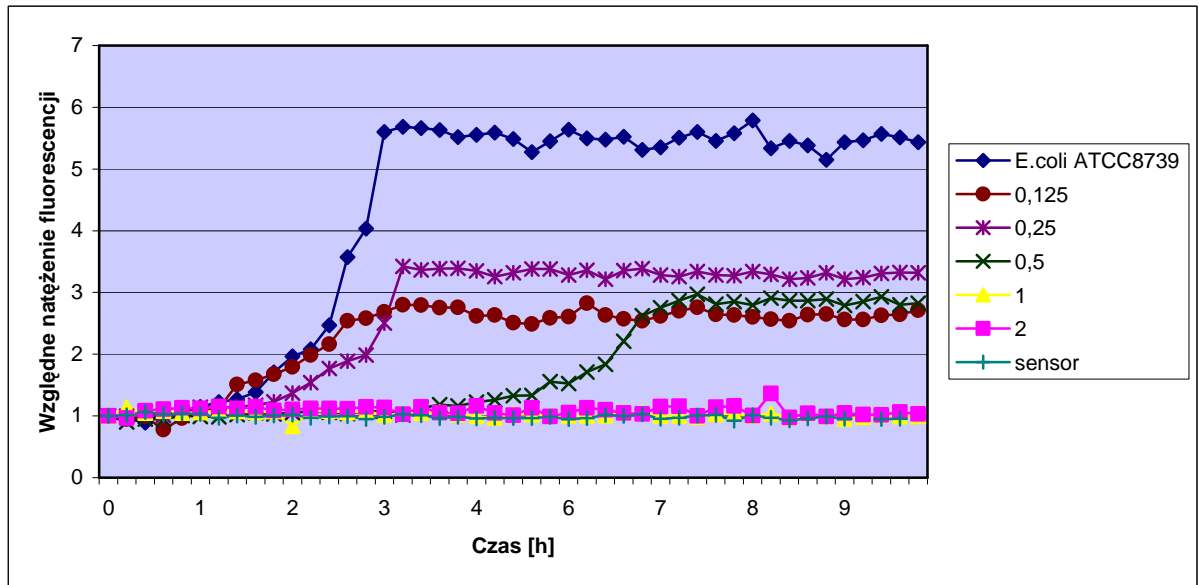
„+”- wzrost bakterii w próbce

„–”- brak wzrostu bakterii w próbce

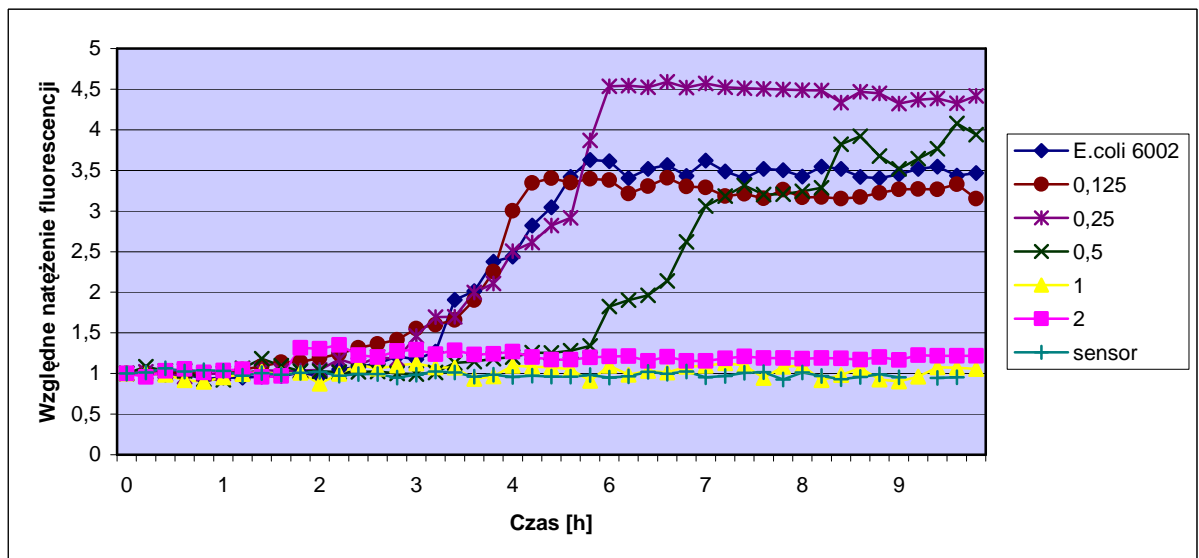
W oparciu o wyniki przedstawione w tabeli 5 można stwierdzić, że wzrost drobnoustrojów jest zahamowany 5 mM stężeniem niklu. Istnieje całkowita zgodność oznaczeń wartości MIC dla jonów niklu wyznaczonych metodą seryjnych rozcieńczeń i metody fluorescencyjnej respirometrii optycznej. Fakt, że amplituda natężenia fluorescencji krzywej wzrostu w obecności 0,63 mM jest niemal dwukrotnie większa od amplitudy zmian natężenia fluorescencji bakterii hodowanych w obecności 0,31 milimolarnych stężeń jonów niklu świadczy, że nie istnieje związek między stężeniem jonów niklu działających toksycznie na bakterie, a końcowym maksymalnym natężeniem fluorescencji hodowli. Papkovsky i wsp. badając wpływ jonów niklu na bakterie uzyskali wartości EC_{50} (z ang. 50 % effective concentration) dla *Pseudomonas fluorescens* przy stężeniu 0,045 mM, natomiast dla *E. coli* DH5 α na poziomie 0,67 mM /62/. Nies podaje, że dla szczepu *Escherichia coli* w temperaturze 30°C wartość MIC dla jonów niklu jest równa 1mM /59/.

W podobny sposób analizowano wpływ jonów miedzi (rys. 42 i 43).

4. WYNIKI I DYSKUSJA



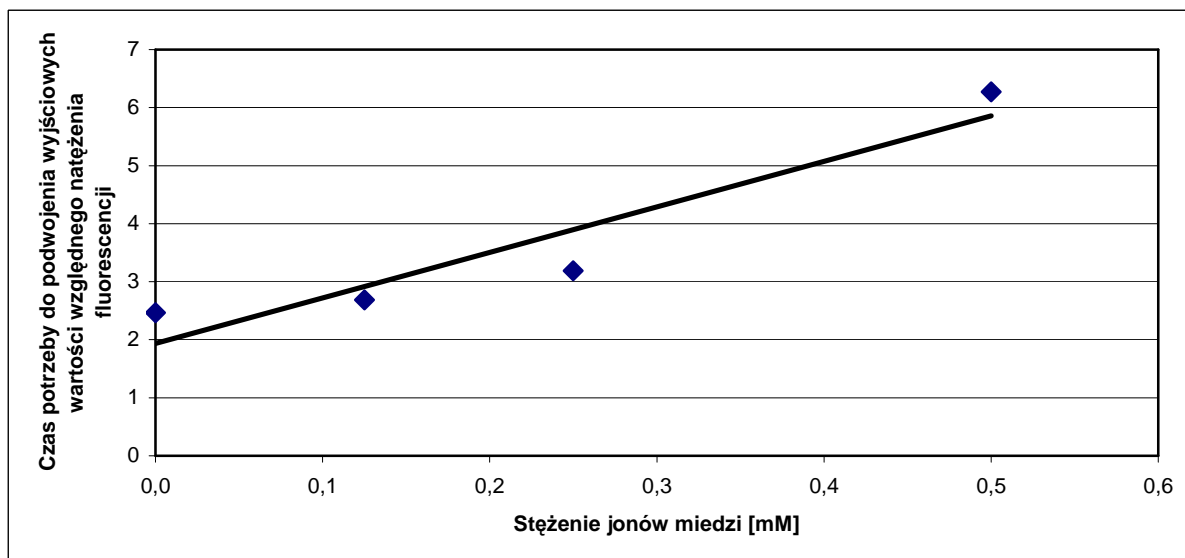
Rys. 42. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji hodowli bakterii *E. coli* ATCC 8739 od czasu dla różnych stężeń jonów miedzi. W legendzie podano odpowiednie stężenia jonów miedzi wyrażone w mM. Pomiary przeprowadzono w temperaturze 27°C.



Rys. 43. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji hodowli bakterii *E. coli* 6002 od czasu dla różnych stężeń jonów miedzi. W legendzie podano odpowiednie stężenia jonów miedzi wyrażone w mM. Pomiary przeprowadzono w temperaturze 27°C.

Rysunki 42 i 43 przedstawiają krzywe zmian względnego natężenia fluorescencji *E. coli* ATCC 8739 i *E. coli* 6002 w obecności jonów miedzi o stężeniach, 0,125, 0,25, 0,5, 1 i 2 mM. Krzywe wzrostu mają typowy sigmoidalny charakter i wskazują, że rosnące stężenia jonów miedzi wywierają hamujący wpływ na wzrost hodowli bakteryjnych, który

objawia się w postaci czasowych przesunięć krzywych wzrostu. Przesunięcia te są liniową funkcją stężenia jonów miedzi (rys. 44).



Rys. 44. Zależność czasu potrzebną do podwojenia wyjściowej wartości natężenia fluorescencji dla hodowli bakteryjnej *E.coli* ATCC 8739 od stężenia jonów miedzi. Wykres sporządzono w oparciu o krzywe z rysunku 42.

1 i 2 mM stężenia jonów miedzi powodują całkowite zahamowanie wzrostu hodowli. Oznaczenie hamującego wpływu jonów miedzi na bakterie wykonane metodą tradycyjną (metoda seryjnych rozcieńczeń) potwierdzają wnioski z oznaczeń respirometrycznych (tabela 7).

Tabela 7. Wyznaczanie MIC jonów miedzi dla dwóch szczepów *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Escherichia coli* 6002 metodą seryjnych rozcieńczeń.

SZCZEP BAKTERII	STĘŻENIE JONÓW MIEDZI [mM]				
	2	1	0,5	0,25	0,125
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> 6002	-	-	+	+	+

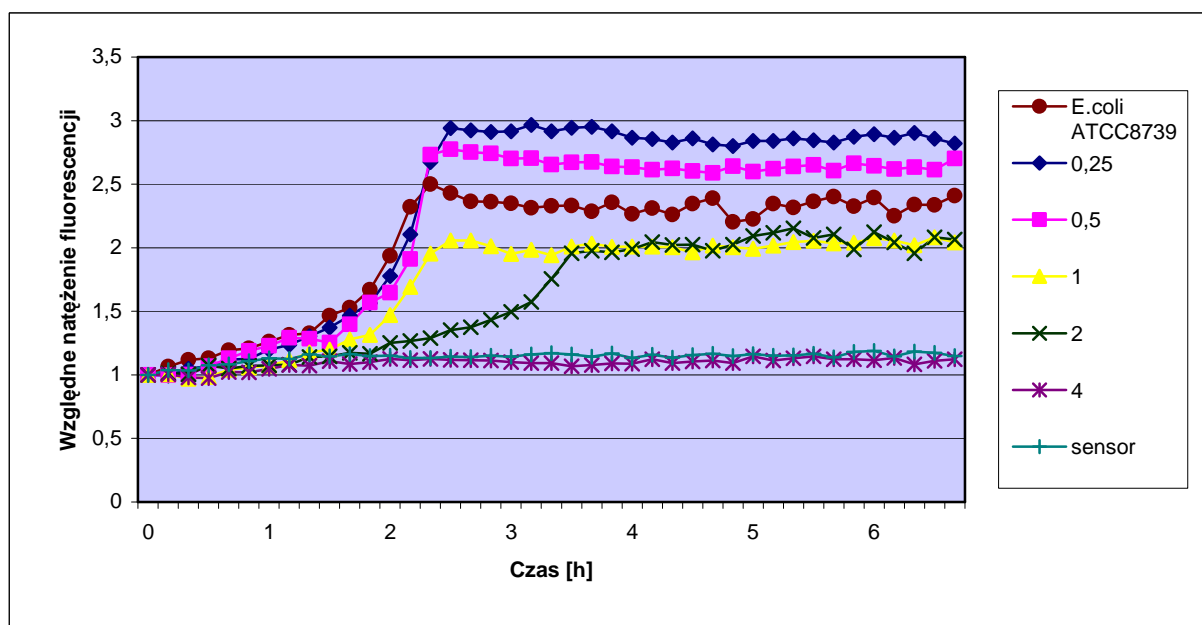
„+”- wzrost bakterii w próbce

„-”- brak wzrostu bakterii w próbce

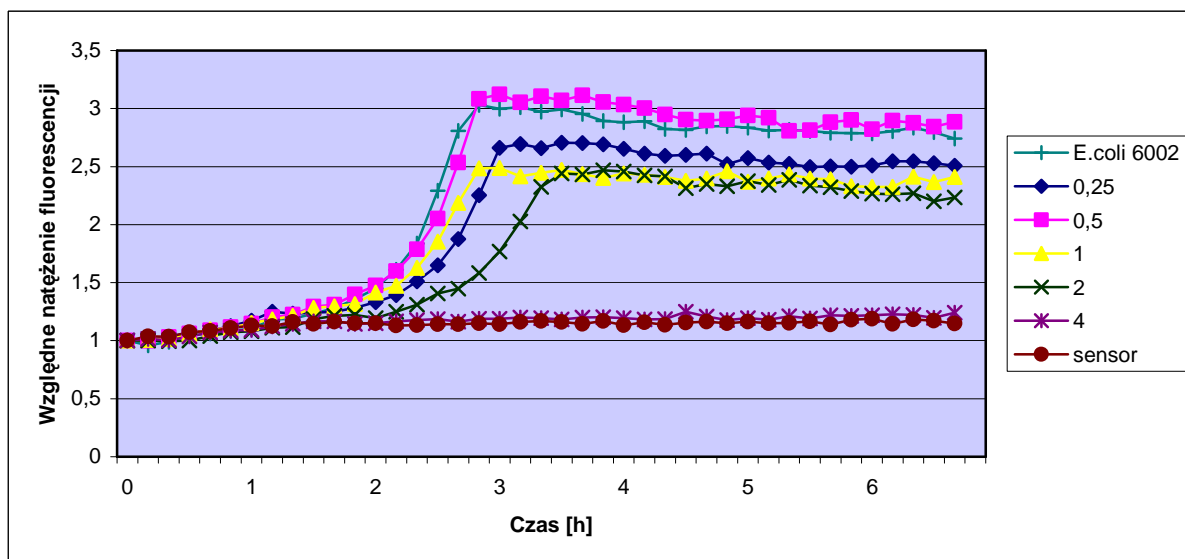
Papkovsky i wsp. analizując wpływ jonów miedzi na *Pseudomonas fluorescens* i *E. coli* DH5 α uzyskali wartości EC₅₀ odpowiednio 0,18 mM i 0,82 mM /62/.

Analiza krzywych zmian fluorescencji hodowli bakteryjnych rosnących w obecności jonów miedzi (rys. 43 i 44) nie pozwala stwierdzić by istniał związek między hamującym stężeniem jonów miedzi, a wartością amplitudy względnego natężenia fluorescencji dla analizowanych hodowli bakteryjnych.

Analogiczne pomiary kinetyki wzrostu hodowli bakteryjnych rosnących w obecności jonów cynku o stężeniu od 0,25 do 4 milimola przedstawiono na rysunkach 46 i 47.

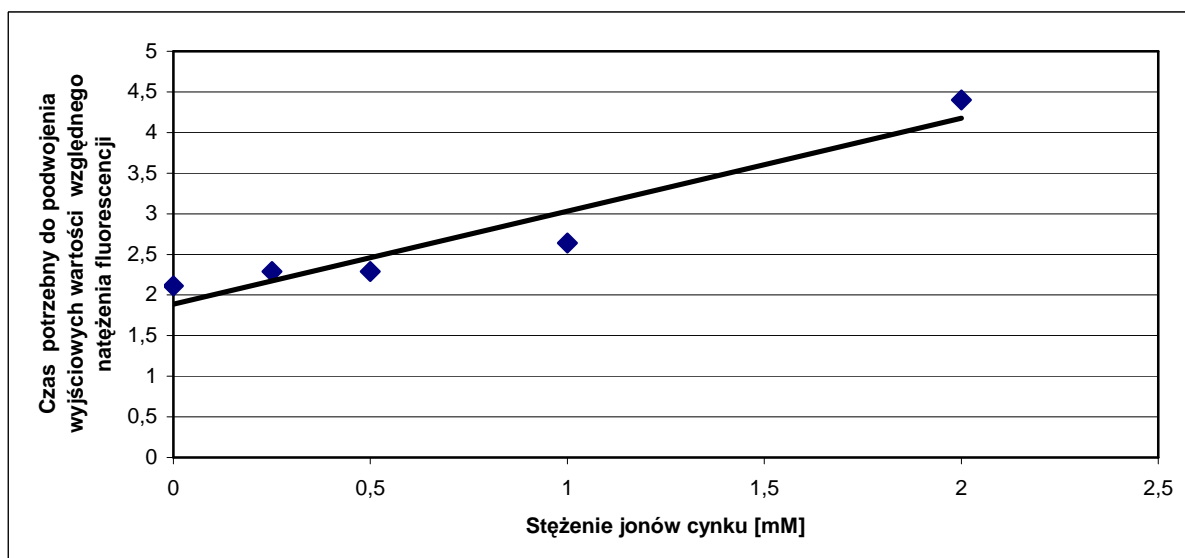


Rys. 45. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji hodowli *E. coli* ATCC 8739 od czasu dla różnych stężeń jonów cynku. W legendzie podano odpowiednie stężenia jonów cynku wyrażone w mM. Pomiary wykonano w temperaturze 27°C.



Rys. 46. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji hodowli *E.coli* 6002 od czasu dla różnych stężeń jonów cynku. W legendzie podano odpowiednie stężenia jonów cynku wyrażone w mM. Pomiary przeprowadzono w temperaturze 27°C.

Analiza wpływu cynku na wzrost hodowli *E. coli* ATCC 8739 i *E. coli* 6002 wskazuje, że jony cynku w zakresie stężeń 0,25-2 mM powodują spowolnienie wzrostu bakterii. Zmniejszenie szybkości wzrostu hodowli jest, podobnie jak w przypadku jonów miedzi, proporcjonalne do stężenia jonów cynku (rys. 47).



Rys. 47. Zależność czasu potrzebnego do podwojenia wyjściowych wartości względnego natężenia fluorescencji dla hodowli bakteryjnej *E.coli* ATCC 8739 od stężenia jonów cynku.

4 mM stężenie cynku powoduje całkowite zahamowanie wzrostu. Jest to wynik identyczny z wartością MIC wyznaczoną metodą seryjnych rozcieńczeń.

Tabela 8. Wyznaczanie MIC jonów cynku dla dwóch szczepów *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Escherichia coli* 6002 metodą seryjnych rozcieńczeń.

SZCZEPY BAKTERII	STĘŻENIE JONÓW CYNKU[mM]				
	4	2	1	0,5	0,25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	–	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> 6002	–	+	+	+	+

„+”- wzrost bakterii w próbce

„–”- brak wzrostu bakterii w próbce

Wartość EC_{50} wyznaczone przez Papkowskiego i wsp. dla *Pseudomonas fluorescens* i *E.coli* DH5 α były równe 0,0061 mM i 0,14mM /62/.

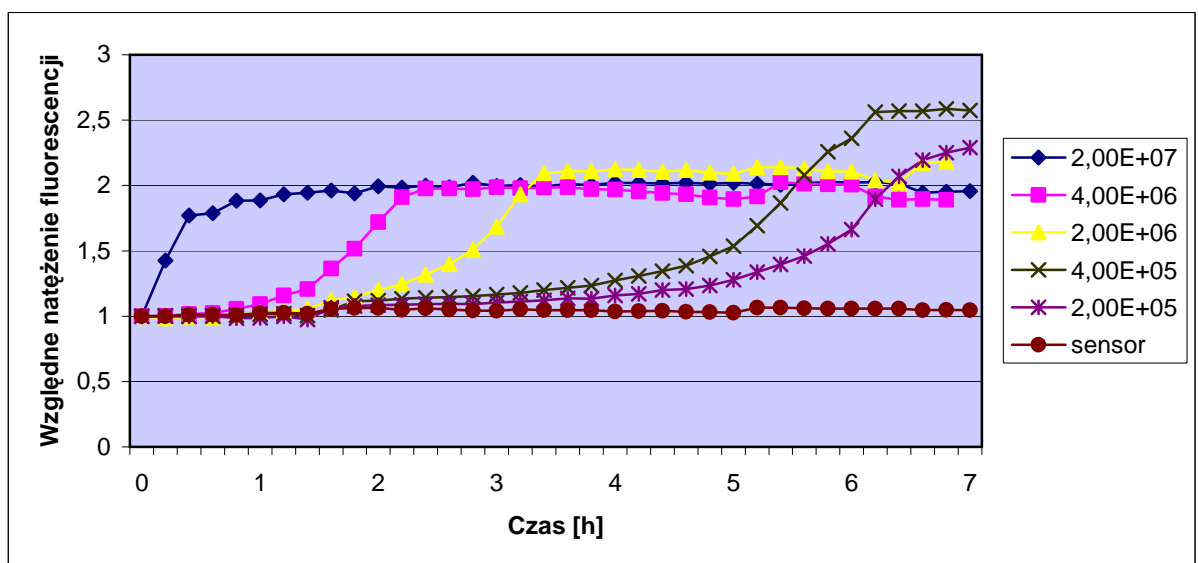
Badania wpływu metali ciężkich na bakterie wykonane za pomocą dwóch metod, metodą seryjnych rozcieńczeń i metodą fluorescencyjnej respirometrii optycznej, dają identyczne wartości MIC. Pozwalają one uszeregować toksyczność badanych metali w kolejności Ni>Zn>Cu.

4.3.6. Monitorowanie wzrostu hodowli komórek eukariotycznych za pomocą pomiarów respirometrycznych z wykorzystaniem biosensora tlenowego.

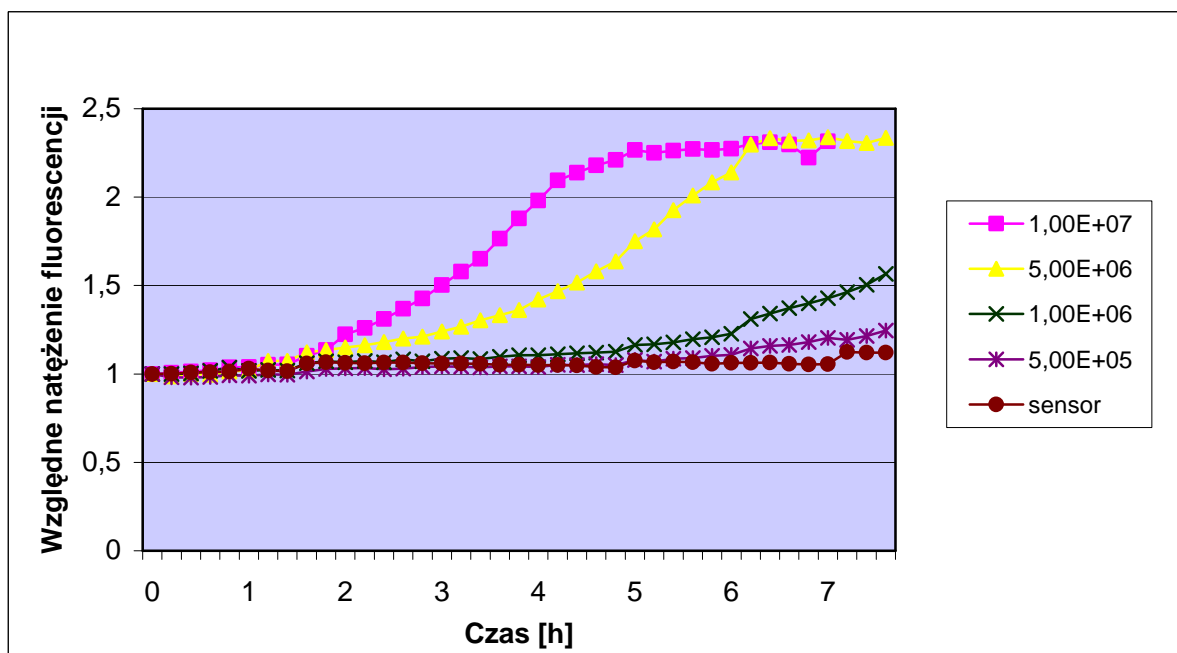
Analizy kinetyki wzrostu hodowli bakteryjnych i wpływu związków przeciwdrobnoustrojowych na bakterie wykazały przydatność fluorescencyjnej respirometrii optycznej, wykorzystującej biosensory tlenowe, jako nowej i bardzo efektywnej techniki badawczej o szerokich zastosowaniach w biotechnologii, farmacji i medycynie. Celowe było również wykazanie, że respirometria optyczna może być stosowana nie tylko do analiz organizmów prokariotycznych, ale i bardziej złożonych komórek eukariotycznych. Komórki te wykazują szereg strukturalnych i funkcjonalnych różnic w porównaniu z komórkami bakterii, różnią się szybkością metabolizmu i wykazują wrażliwość na szereg związków cytotoksycznych, nie działających na bakterie. Jako przykład wybrano komórki *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae* i substancję toksyczną - nystatynę. Nystatyna jest produktem *Streptomyces album* i *Streptomyces nursei*, stosowanym w miejscowym leczeniu candidiozy jamy ustnej, gardła, przewodu

pokarmowego i narządów płciowych /8/. Nystatyna (tetraen) to antybiotyk należący do grupy antybiotyków polienowych, u którego w części hydrofobowej molekuly występują 4 wiązania podwójne. Łącząc się ze sterolami błony komórek organizmów eukariotycznych, nystatyna upośledza funkcjonowanie błony cytoplazmatycznej /46/.

Rysunki 48 i 49, odnoszące się odpowiednio do eukariotów *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae* świadczą, o tym że podobnie jak to miało miejsce w przypadku bakterii, krzywe wzrostu mają ten sam sigmoidalny charakter, różnią się natomiast znacząco szybkością wzrostu.



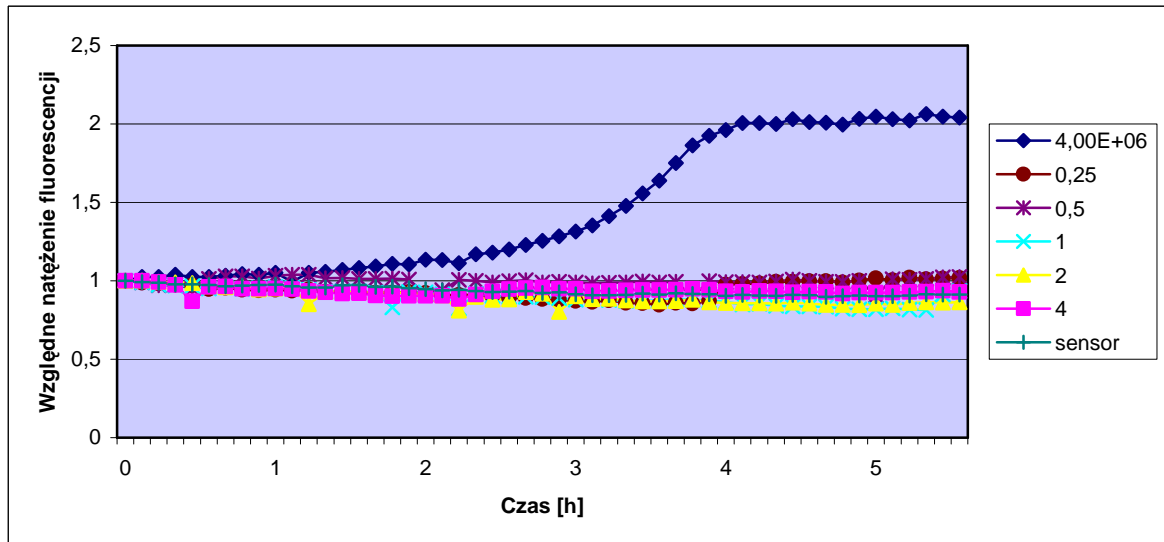
Rys. 48. Zależność względnego natężenia fluorescencji od czasu dla badanych próbek zawierających różne wyjściowe gęstości hodowli *Candida albicans* wyrażone w CFU/ml. Badania przeprowadzono w temperaturze 37°C.



Rys. 49. Zależność względnego natężenia fluorescencji od czasu dla badanych próbek zawierających różne wyjściowe gęstości hodowli *Saccharomyces cerevisiae* wyrażone w CFU/ml. Badania przeprowadzono w temperaturze 37°C.

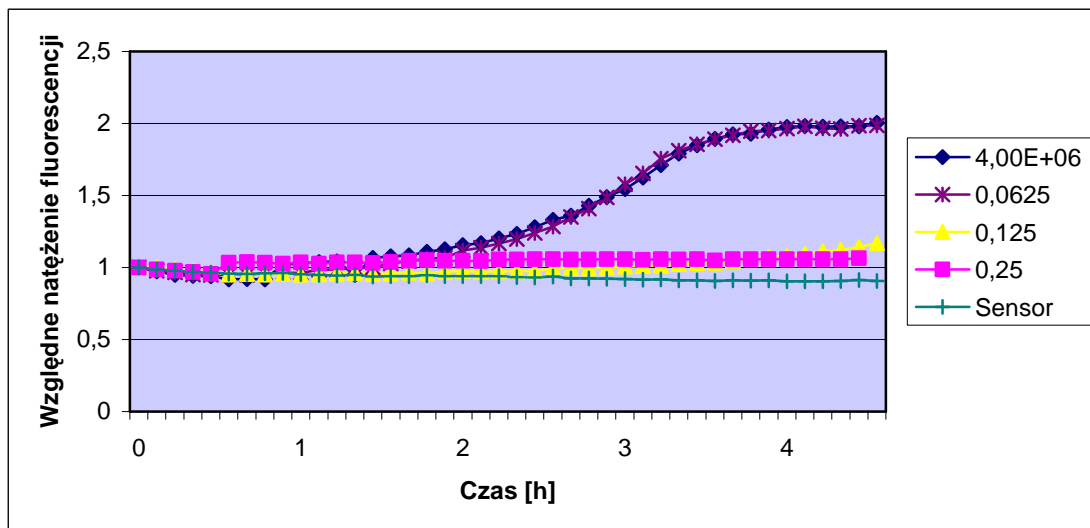
Porównanie krzywych wzrostu hodowli grzybów na rysunkach 48 i 49 z krzywymi wzrostu hodowli bakterii w temperaturze 37°C (rys. 30) świadczy, o tym że szybkość wzrostu komórek bakteryjnych jest kilkakrotnie większa od szybkości wzrostu komórek grzybów. Jedną z istotnych zalet metody fluorescencyjnej respirometrii optycznej w odniesieniu do bakterii było skrócenie czasu analizy (oznaczania MIC) z 24 godzin do nawet około 3-4 godzin. Interesujące było by stwierdzenie, czy również w przypadku eukariotycznych komórek drożdży możliwe jest znaczne skrócenie czasu analizy.

W klasycznej metodzie oznaczania cytotoksycznej aktywności związków przeciw grzybiczych wymagany czas inkubacji wynosi 48 godzin dla *Candida* spp., a nawet 72 godziny dla *Cryptococcus neoformans* /80/. We wstępnym eksperymencie dotyczącym wpływu nystatyny na hodowlę *Candida albicans* wykazano (rys. 50), że nystatyna we wszystkich stosowanych stężeniach (0,25-4 µg/ml) wydaje się hamować wzrost drożdżaka. Mogłoby to oznaczać, że wartość MIC równa jest 0,25 lub mniejsza.



Rys. 50. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji od czasu dla hodowli *Candida albicans* zawierających różne stężenia nystatyny w hodowli. Dane zamieszczone w legendzie zawierają stężenia roztworów nystatyny wyrażone w $\mu\text{g/ml}$. Pomiary prowadzono w temperaturze 37°C . Wyjściowe inokulum *Candida albicans* było 4×10^6 CFU/ml.

Wykonano więc kolejny eksperyment, w którym użyto mniejszych stężeń nystatyny w zakresie $0,0625$ - $0,25 \mu\text{g/ml}$ (rys. 51).



Rys. 51. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji od czasu dla hodowli *Candida albicans* o różnych stężeniach nystatyny w hodowli. Dane zamieszczone w legendzie zawierają stężenia roztworów nystatyny wyrażone w $\mu\text{g/ml}$. Pomiary prowadzono w temperaturze 37°C . Wyjściowa gęstość hodowli była równa 4×10^6 CFU/ml

Z doświadczenia tego wynika, że szybkość wzrostu *Candida albicans* w obecności nystatyny o stężeniu $0,0625 \mu\text{g/ml}$, jest taka sama jak szybkość wzrostu drożdży bez

4. WYNIKI I DYSKUSJA

antybiotyku (krzywe się pokrywają). Wartość MIC w takim przypadku powinna być równa 0,125 µg/ml nystatyny. Uzasadnioną wątpliwość budzi jednak fakt, że końcowe punkty krzywej odnoszącej się do stężenia 0,125 µg/ml nystatyny w hodowli mogą sugerować, że hodowla ta po upływie czterech godzin dopiero rozpoczyna fazę wzrostu. W konsekwencji wartość MIC powinna być większa od 0,125 µg/ml. Zatem, aby wyznaczyć stężenia hamujące wzrost *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae* wykonano kontrolne doświadczenie metodą seryjnych rozcieńczeń, w którym czas inkubacji wynosił 48 godzin. Wartości MIC uzyskane w ten sposób zawiera tabela 9.

Tabela 9. Wyznaczanie stężenia hamującego wzrost *Candida albicans* ATCC 10231 i *Saccharomyces cerevisiae*. Czas inkubacji 48 godzin.

GATUNEK GRZYBA	STĘŻENIE NYSTATYNY (µg/ml)											
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0315
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+	+

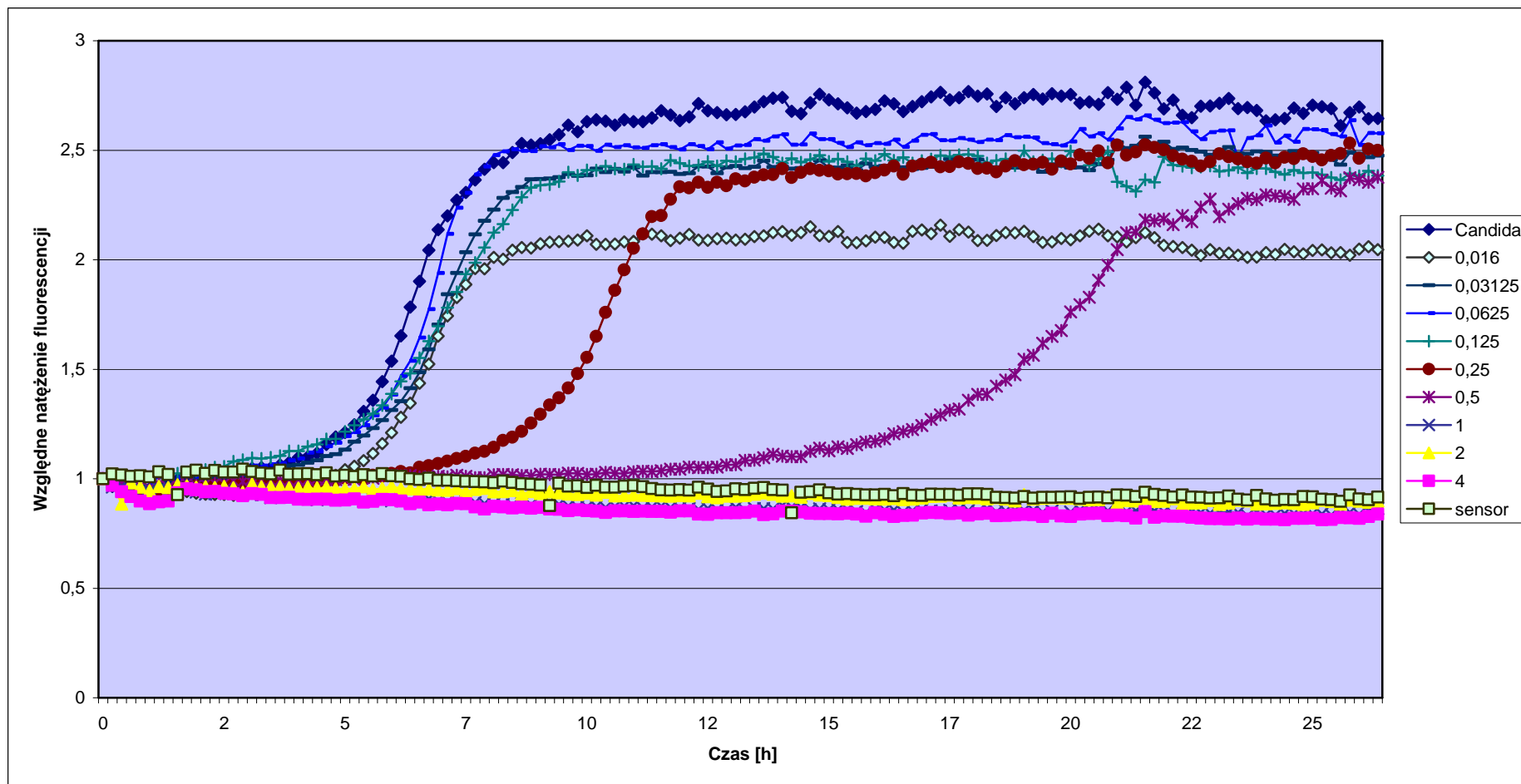
„-“ -brak wzrostu grzybów

„+” -wzrost grzybów

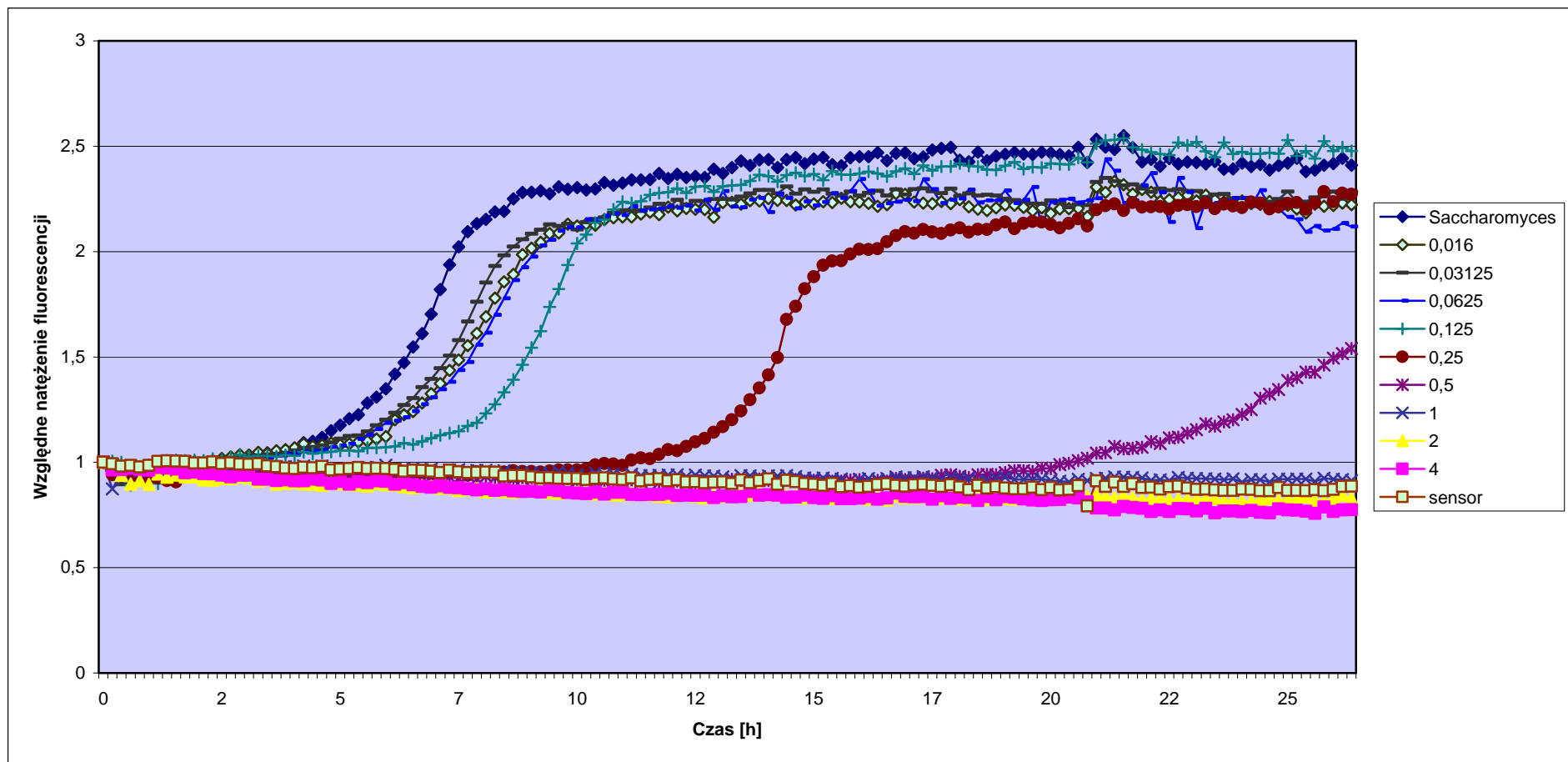
Z tabeli 9 wynika, że najmniejsze stężenie hamujące wzrost *Candida albicans* jest równe 2 µg/ml. W przypadku *Saccharomyces cerevisiae* wartość ta jest równa 1 µg/ml.

Porównując wyniki z oznaczeń respirometrycznych i metody seryjnych rozcieńczeń (czas inkubacji 48 godzin) można stwierdzić, że stosując metodę respirometrii optycznej i bardzo krótkie czasy inkubacji można uzyskać zaniżone wartości MIC dla nystatyny. Spowodowane jest to faktem, że obecność cytotatyków powoduje znaczne spowolnienie wzrostu hodowli i bardzo słabo zaawansowane krzywe wzrostu hodowli mogą być interpretowane jako zahamowanie wzrostu. Sugestię tę potwierdza krzywa wzrostu *Candida albicans* w obecności 0,125 µg/ml nystatyny z rysunku 51, która pokazuje, że faza

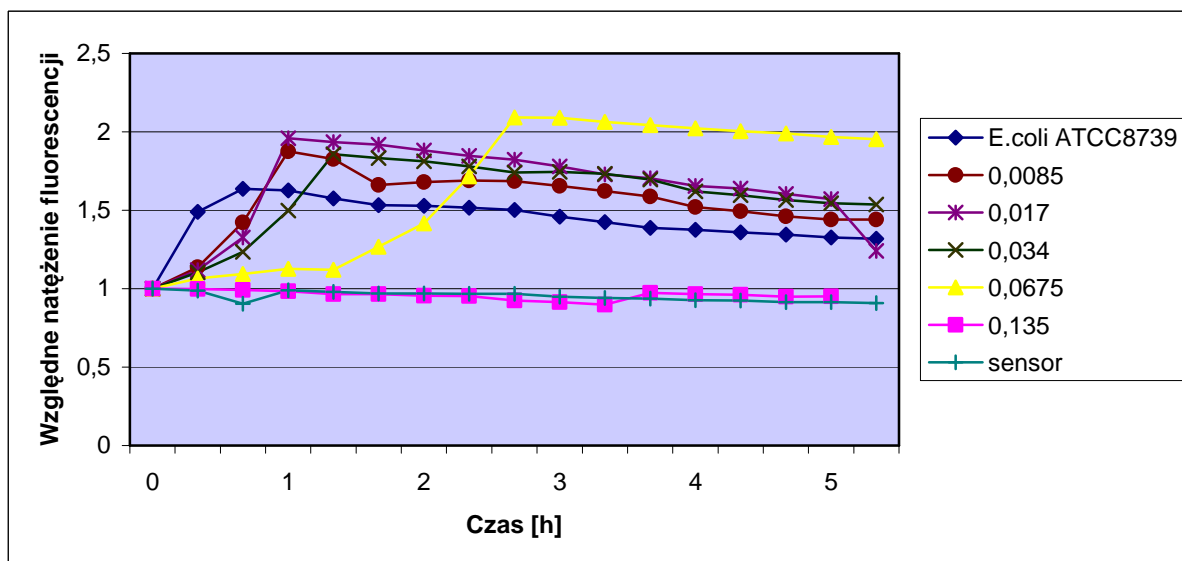
wzrostu w tym przypadku rozpoczyna się z opóźnieniem około 3 godzin w stosunku do krzywej odpowiadającej 0,0625 µg nystatyny na mililitr. Wykonano więc eksperymenty oznaczania MIC nystatyny z użyciem fluorescencyjnej respirometrii optycznej, w której czas inkubacji wydłużono do 26 godzin (rys. 52 i 53).



Rys. 52. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji od czasu dla hodowli *Candida albicans* zawierających różne stężenia nystatyny w badanej próbce. Dane zamieszczone w legendzie zawierają stężenia nystatyny w hodowli wyrażone w $\mu\text{g/ml}$. Pomiary prowadzono w temperaturze 37°C . Wyjściowe inokulum *Candida albicans* było równe 7×10^5 CFU/ml.



Rys. 53. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji od czasu dla hodowli *Saccharomyces cerevisiae* zawierających różne stężenia nystatyny. Dane zamieszczone w legendzie zawierają stężenia roztworów nystatyny wyrażone w $\mu\text{g/ml}$. Pomiary prowadzono w temperaturze 37°C . Wyjściowa gęstość zawiesiny *Saccharomyces cerevisiae* była równa 6×10^5 CFU/ml.



Rys. 55. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji hodowli *E. coli* ATCC 8739 od czasu dla różnych stężeń związku TCA 252. W legendzie podano odpowiednie stężenia związku wyrażone w %. Pomiary przeprowadzono w temperaturze 37°C.

Analiza krzywych zmian fluorescencji hodowli *E. coli* ATCC 8739 w obecności różnych stężeń TCA-252, ujawnia te same cechy znane z analiz innych związków przeciwdrobnoustrojowych. TCA-252 w stężeniu 0,135 % całkowicie hamuje wzrost bakterii (MIC). Niższe stężenia powodują spowolnienie metabolizmu drobnoustrojów, efekt ten zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia TCA-252. Wartość minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii *E. coli* ATCC 8739, wyznaczona metodą seryjnych rozcieńczeń (tabela 10), jest zgodna z wartością uzyskaną metodą fluorymetryczną.

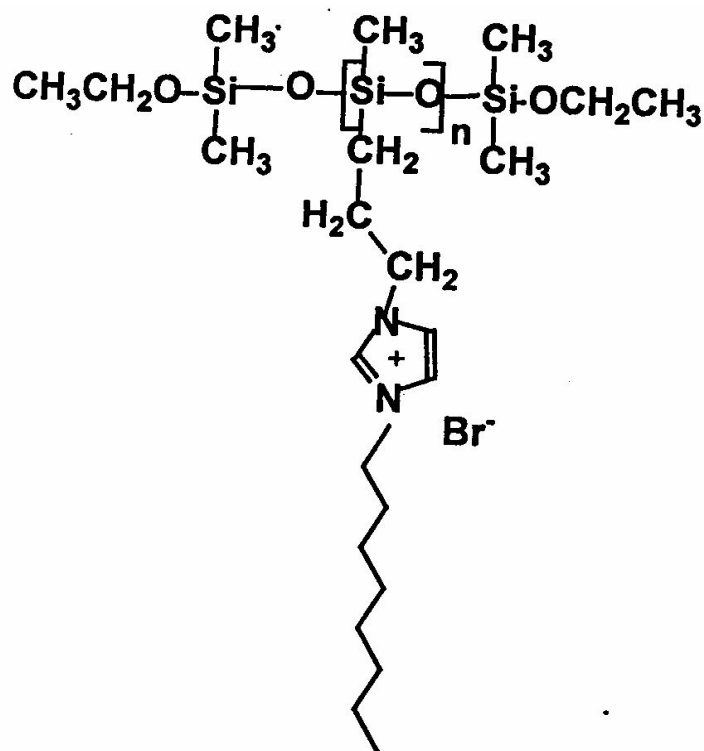
Tabela 10. Wyznaczanie minimalnego stężenia TCA 252 hamującego wzrost *Escherichia coli* ATCC 8739.

SZCZEP BAKTERII	TCA- 252 [%]											
	0,135	0,0675	0,034	0,017	0,0085	0,00425	0,002	0,001	0,0005	0,00025	0,00013	0,00007
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	- MIC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

„+” - wzrost bakterii w próbce

„-” - brak wzrostu bakterii w próbce

Drugim przykładem nowego typu związków przeciwdrobnoustrojowych, wybranym do analiz respirometrycznych, jest kationowy polimer polisilokasnowy z grupą N-N'-dialkiloimidazolwą (rys. 56) /56/.



Rys. 56. Wzór strukturalny polimeru polisilokasnowego z grupą N-N'-dialkiloimidazolwą IV-rzędowanego bromkiem oktylu.

Związki polimerowe tego typu budzą coraz większe zainteresowanie ze względu na ich potencjalne znaczenie dla zdrowia ludzi i zwierząt oraz przeciwdrobnoustrojową ochronę powierzchni. Grupy bakteriobójcze są w tym przypadku trwale związane z tym polimerem i nie są uwalniane do środowiska. Wartość MIC dla *E. coli* ATCC 8739, wyznaczona metodą seryjnych rozcieńczeń, jest równa 0,002 % (tabela 11) i jest zgodna z wynikami analiz wykonanych metodą fluorescencyjnej respirometrii optycznej (rys 57).

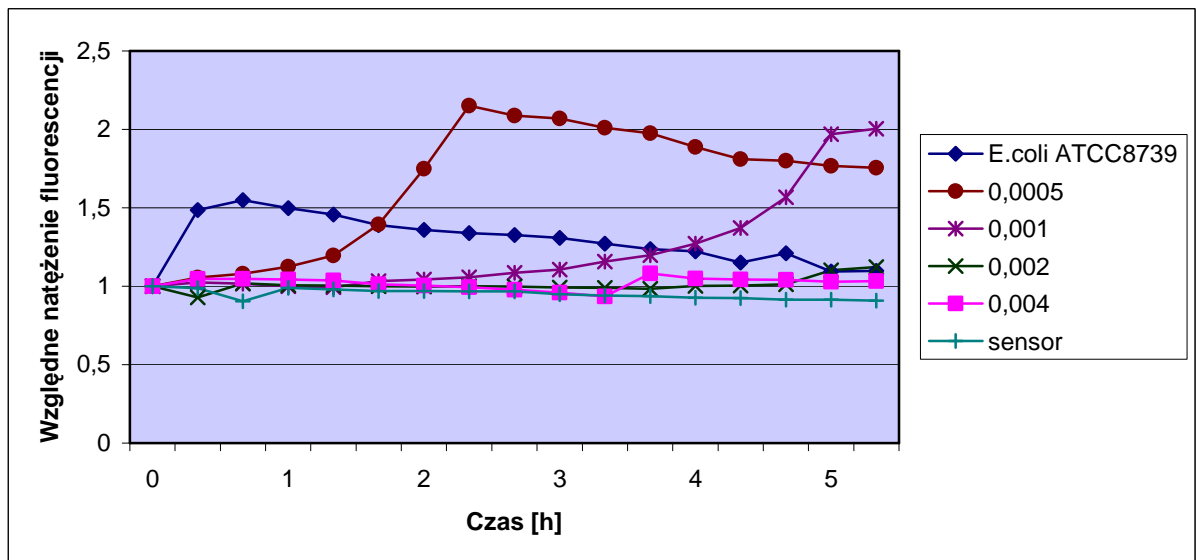
4. WYNIKI I DYSKUSJA

Tabela 11. Wyznaczanie minimalnego stężenia polimeru polisilokasowego z grupą dialkiloimidazolową hamującego wzrost *Escherichia coli* ATCC 8739.

SZCZEP BAKTERII	STĘŻENIE POLIMERU [%]												
	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,016	0,008	0,004	0,002	0,001	0,0005	0,00025	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MIC	+	+	+

„+”- wzrost bakterii w próbce

„-”- brak wzrostu bakterii w próbce



Rys. 57. Wykres zależności względnego natężenia fluorescencji hodowli *E. coli* ATCC 8739 od czasu dla różnych stężeń podstawionego polimeru polisilokasowego. W legendzie podano odpowiednie stężenia polimeru wyrażone w %. Pomiary przeprowadzono w temperaturze 37°C.

Skonstruowana w ramach tej pracy platforma pomiarowa do zautomatyzowanych pomiarów wpływu związków przeciwdrobnoustrojowych na bakterie i grzyby umożliwiła kontrolę wzrostu bakterii i grzybów w mikrohodowlach o objętości 160 μl . W dodatkowych kontrolnych doświadczeniach wykazano jednak, że objętość hodowli można zmniejszyć do 50 μl . Najprawdopodobniej możliwa jest dalsza redukcja objętości badanych próbek. Tak małą skalę prowadzonych hodowli drobnoustrojów umożliwia bardzo duża czułość systemu pomiarowego. Z analizy geometrii wiązki sondującej roztwór fluoresceiny wynika, że tylko część roztworu była wzbudzana światłem diody. Gdyby zmniejszyć objętość roztworu dziesięciokrotnie, do 5 μl , sygnał rejestrowany przez fotopowielacz byłby kilkakrotnie większy. Biorąc pod uwagę fakt, że natężenie światła wzbudzającego we wszystkich wykonanych eksperymentach ustalono na 10 % wartości maksymalnej, to zwiększając natężenie światła wzbudzającego proporcjonalnie zwiększono by wartość sygnału. Z powyższego wynika, że dalsza miniaturyzacja hodowli jest możliwa, a czułość układu conajmniej kilkadziesiąt razy większa. Nie bez znaczenia jest fakt, że zastąpienie użytego tu fotopowielacza H57583, który stosowany jest również do analizy przebiegów stałoprądowych, fotopowielaczem dedykowanym tylko do pracy impulsowej zwiększy efektywność zliczania fotonów około 10-krotnie. Zastosowanie w układzie detekcji jako detektora fotopowielacza i licznika fotonów powoduje, że system umożliwia również innego typu pomiary. W tej pracy, chociaż źródło światła działało w sposób impulsowy (żeby ograniczyć ewentualne zmiany w biosensorze pod wpływem światła wzbudzającego), pomiar emisji był dokonywany w czasie wzbudzania próbki. Licznik fotonów daje drugą opcję pomiarową, umożliwia rejestrację sygnału z opóźnieniem w stosunku do impulsu wzbudzającego. Taki typ pomiarów „time resolved”, pozwoliłby na dalsze zwiększenie stosunku sygnału do szumu przez wyeliminowanie autofluorescencji płytki titracyjnej oraz odbitego od powierzchni optycznych i rozproszonego światła wzbudzającego. Technika ta, w przypadku biosensora G20N-1 w zależności od stosowanego układu pomiarowego, dawała 100 i 400-krotny wzrost sygnału /62/. W naszym przypadku użyto biosensora, którego czasy życia były stosunkowo krótkie i mieściły się, w zależności od stężenia tlenu, w zakresie kilku mikrosekund /28, 5/, podczas gdy czasy życia G20N-1 osiągają wartości około 80 μs /62/. Przy tak krótkich czasach życia niecelowe było by zatem wykonanie pomiarów metodą „time resolved” ponieważ dioda daje zbyt długie impulsy świetlne. Najkrótsze czasy trwania impulsu świetlnego z diody LXH-NB98 były znacznie dłuższe od czasów życia- fluorescencji biosensora. Przy impulsie napięciowym o czasie trwania 10 μs impuls światła z diody trwał około 25 μs (rys. 17). Zmiana biosensora na G20N-1 i

zastosowanie „zielonego” lasera o $\lambda = 532$ nm tylko częściowo zmienia sytuację, ponieważ laser, którym dysponujemy ma częstość modulacji 30 kHz. Konieczne byłoby zatem zastosowanie lasera neodymowego z podwajaniem częstości, który daje nanosekundowe impulsy o $\lambda=532$ nm. Licznik fotonów SR 400 umożliwia również pomiary czasów życia jednak, podobnie jak w przypadku omawianym powyżej, należy zastosować szybkie impulsowe źródło światła.

Ważną cechą skonstruowanej platformy pomiarowej jest jej uniwersalność. W podstawowym zastosowaniu, w jakim użyto jej w tej pracy, pełni ona rolę czytnika fluorescencyjnego płytek titracyjnych. Urządzenia tego typu są dostępne komercyjnie, chociaż ich cena jest znacznie wyższa. Skonstruowana platforma, dzięki modułowej budowie łatwo poddaje się modyfikacjom i może być stosowana do innego typu pomiarów. Na przykład, zmieniając położenie źródła światła względem detektora można przystosować platformę do pomiarów gęstości optycznej próbek w dołkach płytki titracyjnej. Możliwość programowania i kontrolowania przez komputer ruchów stolika w płaszczyźnie dwuwymiarowej pozwala na skanowanie żeli, błon itp. z dużą rozdzielczością. Umożliwi to więc np. zastąpienie w wielu eksperymentach znaczników radioaktywnych sondami fluorescencyjnymi. Kolejnym zastosowaniem platformy pomiarowej może być wykorzystanie kontrolowanego przez komputer silnika krokowego, podłączonego do monochromatora, do obrotów pryzmatu lub siatki dyfrakcyjnej i automatycznej rejestracji widm fluorescencji.

Interesującym spostrzeżeniem z tej pracy jest wniosek o postępującej dekompozycji biosensora w czasie przechowywania płytek titracyjnych z dołkami opłaszczonymi biosensorem. Porównując amplitudy zmian fluorescencji krzywych respirometrycznych zarejestrowanych bezpośrednio po przygotowaniu płytek z biosensorem (rys. 33, 34) z amplitudą tych zmian w eksperymentach wykonanych po upływie miesiąca i roku (rys. 28, 30, 52, 53) obserwuje się dwu i trzykrotne zmniejszenie amplitudy. Świadczy to o zmianach biosensora w czasie. Płytki takie użyte do eksperymentów dają jednak typowe sigmoidalne krzywe zmian fluorescencji w czasie wzrostu hodowli. Nie obserwuje się również negatywnego wpływu na wzrost drobnoustrojów. Celowe będzie jednak zastąpienie tris 4,7-difenylo-1,10-fenantrolino dichlorek rutenu (II) bardziej stabilną, elektroluminescencyjną pochodną z hexafluorofosforanem / 9 /.

Za szczególnie cenny efekt wykonanych analiz można uważać informacje, które uzyskuje się dla stężeń substancji przeciwdrobnoustrojowych mniejszych od minimalnych stężeń hamujących wzrost drobnoustrojów. Wydaje się, że w takim przypadku metoda

fluorescencyjnej respirometrii optycznej, która w czasie rzeczywistym bez ingerencji w próbkę pozwala monitorować stan hodowli, idealnie nadaje się do analizy synergistycznego działania związków chemicznych.

Jedną z najistotniejszych korzyści, jakie wynikają z konstrukcji platformy pomiarowej i wprowadzenia techniki fluorescencyjnej respirometrii optycznej do arsenału metod badawczych stosowanych w Katedrze Mikrobiologii Farmaceutycznej AMG będzie możliwość analizy nowosyntyzowanych związków przeciwnowotworowych. Miniaturyzacja hodowli lini komórek nowotworowych i obiektywna metoda analizy ilościowej wpływu związków przeciwnowotworowych na te komórki znacząco obniży koszty i czas analiz.

5. STRESZCZENIE

Szybki rozwój różnych dziedzin nauki i techniki owocuje wprowadzaniem nowych metod badawczych i technologii, które wpływają na jakość życia i pracy ludzi. Dotyczy to również sfery biotechnologii i produkcji żywności, medycyny i farmacji. Nowe technologie pozwalają wytwarzać nowe generacje środków leczniczych, ale też sprostać starym i nowym zagrożeniom. Odnosi się to w szczególności do problemu narastającej oporności drobnoustrojów na chemioterapeutyki i środki dezynfekcyjne, skażenia środowiska czy bioterroryzmu. Poszukuje się nowych szybkich i tanich metod analizy związków przeciwdrobnoustrojowych i przeciwnowotworowych.

Celem tej pracy było wykonanie analiz przydatności nowej metody badawczej-fluorescencyjnej respirometrii optycznej do badania środków przeciwdrobnoustrojowych.

W ramach tej pracy:

1. Zaprojektowano i skonstruowano prototypowy czuły układ pomiarowy, który umożliwia rejestrację bardzo słabych sygnałów pochodzących z miniaturowych hodowli drobnoustrojów w 96 dołkowych płytkach titracyjnych. Zautomatyzowany układ pomiarowy pracuje pod kontrolą programu komputerowego, który określa sposób i sekwencję odczytu sygnału z każdej z mikrohodowli. Platforma pomiarowa pozwala na analizę natężenia światła fluorescencji w stanie ustalonym, metodą „time resolved” oraz pomiary czasów życia.
2. Zsyntetyzowano biosensor tlenowrażliwy tris 4,7-difenylo-1,10-fenantrolino dichlorek rutenu (II) – $\text{Ru(DPP)}_3\text{Cl}_2$, którego fosforescencja jest wygaszana przez tlen cząsteczkowy.
3. Wykazano, że skonstruowana platforma pomiarowa umożliwia przeprowadzanie analiz kinetyki wzrostu hodowli bakterii i grzybów i określanie parametrów wzrostu, np. czasu generacji drobnoustrojów w hodowlach. Pozwala więc na analizy wpływu różnych czynników fizycznych i chemicznych na drobnoustroje i może być stosowana do optymalizacji hodowli przez zmianę temperatury, składu podłoża itp. Może być stosowana do kontroli podłoży hodowlanych.
4. Przeprowadzono analizy wpływu przeciwdrobnoustrojowego różnych czynników chemicznych: DMSO, ampicyliny, ko-timoksazolu, jonów metali ciężkich, nystatyny oraz podstawionych polimerów polisiloksanowych. Wykazano, że wartości MIC uzyskane metodą fluorescencyjnej respirometrii optycznej są całkowicie zgodne z wynikami oznaczeń MIC wykonanych metodą seryjnych

rozcieńczeń. Respirometria optyczna pozwala jednak na znaczne skrócenie czasu eksperymentu.

5. Fluorescencyjna respirometria optyczna dostarcza znacznie więcej informacji o wpływie związków chemicznych na drobnoustroje niż metody tradycyjne. Dotyczy to przede wszystkim stężeń związków chemicznych mniejszych od MIC. Daje to szersze możliwości interpretacyjne eksperymentów jak i szansę na opracowanie efektywnej metody analizy synergistycznego działania związków przeciwdrobnoustrojowych.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Alocilja, E., and Muhammad-Tahir, Z., (2008) Label-free microbial biosensors using molecular nanowire transducers. w: Zourob, M., Elwary, S., Turner, A., (eds) (2008) Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems. *Springer Sciences + Business Media*, LLC.
2. Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59, 143-169.
3. Andrews, J. M., (2001) Determination of minimum inhibitory concentration. *J. Antim. Chemioth.*, 48, Suppl. S1, 5-16.
4. Atkins, S.D., Clark, I.M., (2004) Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J. Appl. Genet.*, 45, 3-15.
5. Bacon, J.R., and Demas, J.N., (1987) determination of oxygen concentrations by luminescence quenching of a polymer-immobilized transition metal complex. *Anal. Chem.*, 59, 2780-2785.
6. Bahr, G.F., Foster, W.D., Peters, D., and Zeitler, E.H., (1980) Variability of dry mass as a fundamental biological property demonstrated for the case of *Vaccinia virions*. *Biophys. J.*, 29, 305-314.
7. Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., (2006) Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends. Microbiol.*, 14, 176-182.
8. Baran, E. (red), (1998) Zarys mikologii lekarskiej. *Volumen*, Wrocław.
9. Bojarski, Ł., Dobrowolska, A., Grafowski, M., Czarnecki, M., Jaworska, A., (2001) Molekularna diagnostyka i epidemiologia zakażeń gatunkami grzybów chorobotwórczych. *Postępy Mikrobiologii*, 40, 311-324.
10. Bolink, H.J., Cappelli, L., Coronado, E., Grätzel, M., and Nazeeruddin, Md.K., (2006) Efficient and stable solid-state light-emitting electrochemical cell using tris (4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline) ruthenium (II) hexafluorophosphate. *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 46-47.
11. Chee, G.-J., Nomura, Y., Ikebukuro, K., Karube, I., (2000) Optical fiber biosensor for the determination of low biochemical oxygen demand. *Biosensors and Bioelectronics*, 15, 371-376.
12. Chen, W., Martinez, G., and Mulchandani, A., (2000) Molecular beacons. A real – time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. *Anal. Biochem.*, 280, 166-172.
13. Clarke, R.G., Pinder, A.C., (1998) Improved detection of bacteria flow cytometry using a combination of antibody and viability markers. *J. Appl. Microbiol.*, 84, 577-58

14. Coulet, P.R., and Blum, L.J., (1992) Bioluminescence/chemiluminescence based sensors. *Trends. Anal. Chem.*, 11, 57-61.
15. Dai, Y.J., Lin, L., Li, P.W., Chen, X., Wang, X.R., Wong, K.Y., (2004) Comparison of BOD optical fiber biosensors based on different microorganisms immobilized in ormosil matrixes. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 84, 607-617.
16. Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K., Mcmeekin, T.A., (1994) Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric nad viable count data. *Int. J. Food Microbiol.*, 23, 391-404.
17. Danelian, E., Karlen, A., Karlsson, R., Winiwarter, S., Hansson, A., Löfås, S., Lennernäs, H., and Hämäläinen, M.D., (2000) SPR biosensor studies of the direct interaction between 27 drugs and a liposome surface: Correlation with fraction absorbed in humans. *J. Med. Chem.*, 43, 2083-2086.
18. Demas, J.N., DeGraff, B.A., Coleman, P.B., (1999) Oxygen sensors based on luminescence quenching. *Anal. Chem.*, 71, 793A-800A.
19. Fan, F., Butler, B., Riss, T., Wood, K., (2005) BacTiter-Glo™ assay for antimicrobial drug discovery nad general microbiology. *Promega Notes*, 89, 1/05.
20. Farris, L., Habteselassie, M.Y., Perry, L., Chen, S.Y., Turco, R., Reuhs, B., and Applegate, B., (2008) Luminescence techniques for the detection of bacterial pathogens. w: Zourob, M., Elwary, S., Turner, A., (eds) Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems. *Springer Sciences + Business Media*, LLC.
21. Felmingham, D. & Brown, D.F.J., (2001) Instrumentation in antimicrobial susceptibility testing. *J. Antim. Chemioth.*, 48, Suppl.S1, 81-85.
22. Fluit, AD.C., Visser, M.R., Schmitz, F.J., (2001) Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14, 836-87.
23. Glynn, B., (2008) Rapid nucleic acid-based diagnostics methods for the detection of bacterial pathogens. w: Zourob, M., Elwary, S., Turner, A., (eds) (2008) Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems. *Springer Sciences + Business Media*, LLC.
24. Grzeszkowiak, M., Dembińska, M., Adamski, Z., (2001) Technika PCR i jej zastosowanie w diagnostyce zakażeń grzybami z rodzaju *Candida*. *Postępy Dermatologii i Alergologii*, 18, 17-20.
25. Grzybowiski, J., Reista, J., (2001) Praktyczna bakteriologia lekarska i sanitarna. *Dom Wydawniczy Bellon*, Warszawa.
26. Gupta, A., Bashir, R., (2007) Itergrated cantilever- based biosensors for the detection of chemical and biological entities. w: Vo-Dinh, T., (ed) Nanotechnology in biology and medicine. Methods, devices and applications. *CRC Press Taylor & Francis Group*, Boca Raton, London, New York.

27. Hall, L., Doerr, K.A., Wohlfiel, S.L. and Roberts, G.D., (2003) Evaluation of the MicroSeq System for Identification of Mycobacteria by 16S Ribosomal DNA Sequencing and Its Integration into a Routine Clinical Mycobacteriology Laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 1447-1453.
28. Hartman, P., Leiner, M.J.P., and Lippitsch, M.E., (1995) Luminescence quenching behavior of an oxygen sensor based on a Ru (II) complex dissolved in polystyren. *Anal. Chem.*, 67, 88-93.
29. Ho, H.P., Wu, S.Y., (2007) Biomolecule sensing using surface plasmon resonance. w: Vo-Dinh, T., (ed) Nanotechnology in biology and medicine. Methods, devices and applications. *CRC Press Taylor & Francis Group*, Boca Raton, London, New York.
30. Hobbe, J.E., Daley, R.J., Jasper, S., (1977) Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 1225-1228.
31. Hobson, N.S., Tothill, I., Tuner, A.P.F., (1996) Microbial detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 11, 455-477.
32. Homola, J., (2003) Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chemistry*. 377, 528-539.
33. Hynes, J., Floyd, S., Soini, A.E., O'Connor, R., Papkovsky, D.B., (2003) Fluorescence-based cell viability screening assays using water-soluble oxygen probes. *J. Biomol. Screen.*, 8, 264
34. Jaroszy, F. (2002) Podstawy biofizyki, *PZWL*.
35. Jongerius-Gortemaker., B.G.M., Goverde, R.I.J., van Knapen, F., and Bergwerff, A.A., (2002) Surface plasmon resonance (BIACORE) detection of serum antibodies against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *J. Immunol. Meth.*, 266, 33-44.
36. Jyoung, J.Y., Hong, S.H., Lee, W., and Choi, J.W., (2006) Immunosensors for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 2315-2319.
37. Kai, E., Ikebukuro, K., Hoshina, S., Watanabe, H., and Karube, I., (2000) Detection of PCR products of *Escherichia coli* O157: H7 in human stool samples using surface plasmon resonance (SPR). *Fems. Immunol. Med. Microbiol.*, 29, 283-288.
38. Karl D.M., (1980) Cellular nucleotide measurements and application in microbial ecology. *Microbiol. Rev.*, 44, 739-785.
39. Karlsson, R., Kullman-Magnusson, M., Hämäläinen, M.D., Remaeus, A., Andersson, K., Borg, P., Gyzander E., and Deinum, J., (2000) Biosensors analysis of drug-target interactions: Direct and competitive binding assays for investigation of interactions between thrombin and thrombin inhibitors. *Anal. Biochem.*, 278, 1-13.
40. Kaufmann, K.J., (2000) Light levels and Noise. *Photonics spectra*, July 2000, 149-153.

41. Kornicka, A., Sączewski, F., Gdaniec, M., Hałasa, R., Werel, W., (2004) Synthesis, structure and biological activities of novel thiocarbamoyl sulfenamides and benzothiazoles. W: *The Fourth Multidisciplinary Conference on Drug Research, Gdańsk-Sobieszewo, 17-19 maja 2004: book of abstracts*, K-8.
42. Koubová, V., Brynda, E., Karasová, L., Škvor, J., Homola, J., Dostálek, J., Tobiška, P., and Rošický, J., (2001) Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors. *Sensors and Actuators B*, 74, 100-105.
43. Kur, J., Samet, A., Juszczak, J., Gładzki, A., (1996) PCR-nowa era w klinicznej diagnostyce mikrobiologicznej i badaniach epidemiologicznych. *Przegląd Epidemiologiczny*, 50, 219-225.
44. Kurosawa, S., Park, J., Aizawa, H., Wakida, S., Tao, H., and Ishihara, K., (2006) Quartz crystal microbalance immunosensors for environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*. 22, 473-481.
45. Lakowicz, J.R., (1999) Principles of fluorescence spectroscopy, *Academic Press/Plenum Press*; New York, 1999.
46. Lambert, H.P., O'Gady, F.W., (1994) Antybiotyki i chemioterapia. *Wydawnictwo Medyczne*. Warszawa.
47. Lazcka, O., Campo, F.J.D., and Munoz, F.X., (2007) Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 22, 1205-1217.
48. Lei, Y., Chen, W., Mulchandni, A., (2006) Microbial biosensors. *Anal. Chim. Acta*, 568, 200-210.
49. Liedberg, B., Lundstrom, I., Stenberg, E., (1993) Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface-plasmon resonance. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 11, 63-72.
50. Lim, D.V., Simpson, J.M., Kearens, E.A., Kramer, M.F., (2005) Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18, 583-607.
51. Mansour, J.D., Robinson, J.A., Arndt, C.W., Schilte, T.H., (1985) Detection of *Escherichia coli* in blood using flow cytometry. *Cytometry*, 6, 186-190.
52. Markgren, P.O., Hämäläinen, M., and Danielson, U.H., (2000). Kinetic analysis of the interaction between HIV-1 protease and inhibitors using optical biosensor technology. *Anal. Biochem.*, 279, 71-78.
53. Mecler, I., Nawrot, U., (2007) Techniki molekularne stosowane w diagnostyce mikrobiologicznej. *Mikologia Lekarska*, 14, 280-284.
54. Meighen, E.A., (1991) Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.*, 55, 123-142.

55. Miyachi, H., Yano, K., Ikebukuro, K., Kono, M., Hoshina, S., and Karube, I., (2000) Application of chimeric RNA-DNA oligonucleotides to the detection of pathogenic microorganisms using surface plasmon resonance. *Anal. Chim. Acta*, 407, 1-10.
56. Mizerska, U., Fortuniak, J., Chojnowski, J., Hałasa, R., Konopacka, A., Werel, W., (2009) Polysiloxane cationic bicides with imidazolium salt (ImS) groups, synthesis and antibacterial properties. *Eur. Polym. J.*, 45, 779-787.
57. Mulchandani, P., Chen, W., Mulchandani, A., Wang, J., Chen, L., (2001) Amperometric microbial biosensor for direct determination of organophosphate pesticides using recombinant microorganism with surface expressed organophosphorus hydrolase. *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 433-437.
58. Munoz-Berbel, X., Godino, N., Laczka, O., Baldrich, E., Munoz, F.X., and Del Campo, J., Impedance-based biosensor for pathogen detection. w: Zourob, M., Elwary, S., Turner, A., (eds) (2008) Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems. *Springer Sciences + Business Media*, LLC.
59. Nies, D.H., (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 730-750.
60. Norden, M.A., Kurzyński, T.A., Bownds, S.E., Callister, S.M., Schell, R.F., (1995) Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) by flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 1231-1237.
61. O'Hara, C.M., (2005) Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* nad other aerobic gram-negative bacilli. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18, 147-162.
62. O'Mahony, F.C., Papkovsky, D.B., (2006) Rapid high-throughput assessment of aerobic bacteria in complex samples by fluorescence-based oxygen respirometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 1279-1287.
63. O'Riordan, T.C., Bukley, D., Ogurtsov, V., O'Connor, R., Papkovsky, D.B., (2000) A cell viability assay based on monitoring respiration by optical oxygen sensing. *Anal. Biochem.*, 278, 221-227.
64. Odumer, J.A., Steele, M., Fruhner, L., Larkin, C., Jiang, J., Mann, E., McNab, W.B. (1999) Evolution of accuracy and repeatability of identification of food-borne pathogens by automated bacterial identification systems. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 944-949.
65. Oh, B.K., Kim, Y.K., Lee, W., Bae, Y.M., Lee, W.H., and Choi, J.W., (2003) Immunosensor for detection of *Legionella pneumophila* using surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 605-611.
66. Oh, B.K., Kim, Y.K., Park, K.W., Lee, W.H., and Choi, J.W., (2004) Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium*. *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 1497-1504.

67. Olsen, E., Vainrub, A., and Vodyanoy, V., Acoustic wave (TCM) biosensors: weighing bacteria. w: Zourob, M., Elwary, S., Turner, A., (eds) (2008) Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems. *Springer Sciences + Business Media*, LLC.
68. Papkovsky D.B., (2004) Methods in optical oxygen sensing; Protocol and critical analyses. *Methods Enzymol.*, 381, 715-735.
69. Papkovsky, D.B., (1995) Phosphorescent complexes of porphyrin ketones: optical properties and application to oxygen sensing. *Anal. Chem.*, 67, 4112-4117.
70. Papkovsky, D.B., O'Riordan, T., (2005) Emerging applications of phosphorescent metalloporphyrins. *J. Fluoresc.*, 15(4), 569-584.
71. Parker, C.A., (1968) Photoluminescence of solutions, *Elsevier Publishing Company*. Amsterdam-London-New York.
72. Paul, E.A., Clark, F.E., (2000) Mikrobiologia i biochemia gleb. *Wydawnictwo UMCS*, Lublin.
73. Pavey, K.D., Barnes, L., Hanlon, G., Olliff, C., Ali, Z., and Paul, F., (2001) A rapid, non-destructive method for determination of *Staphylococcus epidermidis* adhesion to surfaces using quartz crystal resonant sensor technology. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 344-348.
74. Photon counting using photomultiplier tubes. *Hamamatsu Technocal Information*, Apr. 2001.
75. Pomarnacka, E., Bednarski, P.J., Reszka, P., Dziemidowicz-Borys, E., Bieńczak, A., Werel, W., Hałasa, R., (2006) Synthesis and biological activity of new 2-amino-8-chloro-5,5-dioxo[1,2,4]triazolo[2,3-*b*][1,4,2]benzodithiazines. *Eur. J. Med. Chem.*, 41(5), 633-639.
76. Pomarnacka, E., Kaćki, M., Werel, W., Hałasa, R., (2003) Synteza i aktywność biologiczna pochodnych 2-amino-8-chloro-5,5-diokso[1,2,4]triazolo[2,3-*b*][1,4,2]benzoditiazyny. w: *XXII Sesja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Gdańsku*, 57.
77. Porter, K.G., Yvette, S.F., (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25, 943-948.
78. Rattanasomboon, N., Bellara, S.R., Harding, C.L., Fryer, P.J., Thomas, C.R., Al Rubeai, M., McFarlane, C.M., (1999) Growth and enumeration of meat spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta*. *Int. J. Food Microbiol.*, 51, 145-158.
79. Reimer, L.G., Wilson, M.L., Weinstein, M.P., (1997) Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10, 444-465.

80. Rex, J.H., Pfaller, M.A., Walsh, T.J., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M., Gosey, L.L., Odds, F.C., Rinaldi, M.G., Sheehan, D.J. and Warnock, D.W., (2001) Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14, 643-658.
81. Roda, A., Pasini, P., Mirasoli, M., Michelini, E., and Guardigli, M., (2004) Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *Trends. Biotechnol.*, 22, 295-303.
82. Sączewski, F., Kornicka, A., Gdaniec, M., Hałasa, R., Werel, W., (2004) First stable *O*-amidinylhydroxylamines and their transformations into sulfenamides by intramolecular 1,5-O S amine migration. *Eur. J. Org. Chem.*, 16, 3511-3516.
83. Sączewski, F., Stencel, A., Bieńczak, A.M., Langowska, K.A., Michaelis, M., Werel, W., Hałasa, R., Reszka, P., (2008) Structure-activity relationships of novel heteroaryl-acrylonitriles as cytotoxic and antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 43(9), 1847-1857.
84. Sączewski, J., and Gdaniec, M., (2007) First tandem nucleophilic addition-electrophilic amination reaction of Eschenmoser's salt: synthesis of cyclic and spiro-fused hydrazonium salt. *Tetrahedron Lett.*, 48, 7624-7627.
85. Sakakibara, T., Murakami, S., and Imai, K., (2003) Enumeration of bacterial cell numbers by amplified firefly bioluminescence without cultivation. *Anal. Biochem.*, 312, 48-56.
86. Serduk, I.N., Zaccai, N.R., Zaccai, J., (2007) *Methods In Molecular Biophysics. Cambridge University Press.*
87. Sharp, R.W. & Michaud, G.L., (1974) Detection of microorganisms using filter techniques. *J. Appl. Microbiol.*, 34, 435-440.
88. Singh, A., Kuhad, R.C., Sahar, V., Ghosh, P., (1994) Evaluation of biomass. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 51, 47-70.
89. Sitt, D.T., Nagar, M.S., Haq, T.A., Timmins, M.R., (2002) Determination of growth rate of microorganisms in both from oxygen-sensitive fluorescence plate reader measurements. *Biotechniques*, 32, 684-689.
90. Skowrońska, A., Zmysłowska, I., (2006) Współczesne metody identyfikacji bakterii stosowane w ekologii mikroorganizmów wodnych- fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH). *Postępy Mikrobiologii.*, 45, 3, 183-193.
91. Steen, H.B., (2000) Flow cytometry of bacteria: glimpses from the past with a view to the future. *J. Microbiol. Meth.*, 42, 65-74.
92. Strager, Ch., Davis, J.R., (1992) Automated systems for identification of microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 5, 302-327.

93. Su, X-L., and Li, Y., (2005) A QCM immunosensor for salmonella detection with simultaneous measurements of resonant frequency and motional resistance. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 840-848.
94. Subramanian A., Irudayaraj, J., and Ryan T., (2006) A mixed self-assembled monolayer-based surface plasmon immunosensor for detection of *E-coli* O157: H7. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 998-1006.
95. Suppan, P. (1997) *Chemia i światło*, tłumaczenie Jerzy Prochorow, *Wydawnictwo Naukowe PWN*.
96. Sutton, S., (2006) Counting colonies. *Pharm. Microbiol. Forum Newsl.*, 12, 1-5.
97. Szczepaniak, W., (1999) *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*. *Wydawnictwo Naukowe PWN*.
98. Taylor, A.D., Ladd, J., Homola, J., and Jang, S., (2008) Surface plasmon resonance (SPR) sensors for the detection of bacterial pathogen. W Zourob, M., Elwary, S., Turner, A., (eds) *Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems*. *Springer Sciences + Business Media*, LLC.
99. Taylor, A.D., Ladda, J., Yu, Q.M., Chen, S.F., Homola, J., and Jiang, S.Y., (2006) Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 752-758.
100. Taylor, A.D., Yu, Q.M., Chen, S.F., Homola, J., and Jiang S.Y., (2005) Comparison of *E-coli* O157: H7 preparation methods used for detection with surface plasmon resonance sensor. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 107, 202-208.
101. Thomas, E., Bouma, A., van Eerden, E., Laudman, W.J.M., van Kanpen, F., Stegeman, A., and Bergwerff, A.A., (2006) Detection of egg yolk antibodies reflecting *Salmonella enteritidis* using a surface plasmon resonance biosensor. *J. Immunol. Meth.*, 315, 68-74.
102. Thorpe, T.C., Wilson, M.L., Turner, J.E., Diguseppi, J.L., Willert, M., Mirrett, S., Reller, L.B., (1990) BactT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 1608-1612.
103. Vaiopoulou, E., Melidis, P., Kampragou, E., Aivasidis, A., (2005) On-line load monitoring of wastewaters with a respirographic microbial sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 365-371.
104. Valasek, M.A., Repa, J.J., (2005) The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.*, 29, 151-159.
105. Watts, R.J., Crosby, G.A., (1971) Spectroscopic characterization of complexes of rhenium(II) and iridium(III) with 4,4'-diphenyl-2,2'-bipyridine and 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 3184-3188.
106. Wheat, P.F., (2001) History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J. Antim. Chemioth.*, 48, Suppl. S1, 1-4.

107. Wodnicka, M., Guarino, R.D., Hemperly, J.J., Timmins, M.R., Stitt, D., Pitner, B., (2000) Novel fluorescent technology platform for high throughput cytotoxicity and proliferation assays. *J. Biomol. Screen.*, 5(3), 141-152.
108. Woo, P.C.Y., Ng, K.H.L.N, Lau, S.K.P., Yip, K., Fung, A.M.Y., Leung, K, Tam, D.M.W., Que, T., and Yuen, K., (2003) Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 1996-2001.
109. Wood, K.V. & Gruber, M.G.(1996) Transduction in microbial biosensors using multiplexed bioluminescence. *Biosensors and Bioelectronics*, 11, 3, 207-214.
110. Woźniak-Kosek, A., Reiss, J., Kawiak, J., (2003) Cytometria przepływowa w klinicznych analizach bakteriologicznych. *Postępy Mikrobiologii*, 42, 235-254.
111. Wright, J.D., Oliver, J.V., Nolte, R.J.M., Holder, S.J., Sommerdijk, N.A.J.M., and Nikitin, P.I., (1998) The detection of phenols in water using surface plasmon resonance system with specific receptors. *Sensors and Actuators B*, 51, 305-310.
112. Zanetti, S., Ardito, F., Sechi, L., Sanguinetti, M., Mollicotti, P., Delogu, G., Pinna, M.P., Nacci, A., and Fadda, G., (1997) Evaluation of nonradiometric system (Bactec900MB) for detection of *Mycobacteria* in human clinical samples. *J. Clin Microbiol.*, 35, 2072-2075.
113. Zourob, M., Elwary, S., Turner, A., (eds) (2008) Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems. *Springer Sciences + Business Media*, LLC.
114. Zwolska, Z., Augustynowicz-Kopeć, E., Klatt, M., (1998) Nowy, automatyczny, nieizotopowy system hodowli prątków MB/BacT i jego wartość w diagnostyce mikrobiologicznej gruźlicy. *Pneumonologia i Alergologia Polska*, 1-2, 24-30.

7. STOSOWANE SKRÓTY

ATCC - American Type Culture Collection

CFU - z ang. Colony Forming Units

CLSI - z ang. Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO - Dimetylosulfotlenek

EC₅₀ - z ang. 50 % Effective Concentration

ELISA - z ang. Enzyme -Linked Immunosorbent Assay

ERA - z ang. Electrorotation Assay

FCM - z ang. Flow Cytometry

IRMA - z ang. Immunoradiometric Assay

MBC - z ang. Minimum Bactericidal Concentration

MIC - z ang. Minimum Inhibitory Concentration

PCR - z ang. Polymerase Chain Reaction

Ru(DPP)₃Cl₂ - tris 4,7-difenylo-1,10-fenantrolino dichlorek rutenu (II)

DODATEK NR 1

ELEMENTY SKŁADOWE MODUŁU ORIENTUJĄCEGO PŁYTKĘ:

Elementy składowe modułu orientującego próbkę zostały zakupione w firmie GmbH & Co. i są to:

- dwa silniki krokowe MS160 napędzające mechanizm orientujący,
- szyna ILF-7 o długości 789 mm,
- szyna MLF 3 o długości 496 mm,
- zespół sanek do szyn ILF,
- sanki WS 3/7,
- sprzęgło WK30/40, 2 sztuki
- śruba toczna 16x5 o długości 668 mm,
- śruba toczna 16x5 o długości 368 mm,
- łożysko przednie śruby, 2 sztuki,
- łożysko tylne śruba, 2 sztuki,
- blok mocujący nakrętki typ1, 2 sztuki,
- nakrętka kulkowa 16x5, 2 sztuki.

Linear Guide Rail

LFS-12-7 (LF 7)

mechanics



Features

- W 128 x H 40 mm
- 2 precision steel shafts Ø 12
- Twist-resistant
- Aluminium shaft profile, anodized
- Attachment from below by means of thread rails in the T-groove indentation profile
- Conditionally cantilever
- Arbitrary Guide Rail length
- Weight: 5.63 kg/m

Load Data

Units with 2x WS 6	
C ₀	4955 N
C	2810 N
F _{1 stat.}	4232 N
F _{1 dyn.}	2999 N
F _{2 stat.}	4955 N
F _{2 dyn.}	2810 N
M _{1 stat.}	159 Nm
M _{1 dyn.}	148 Nm
M _{2 stat.}	173 Nm
M _{2 dyn.}	90 Nm
M _{3 dyn.}	84 Nm
M _{4 dyn.}	98 Nm

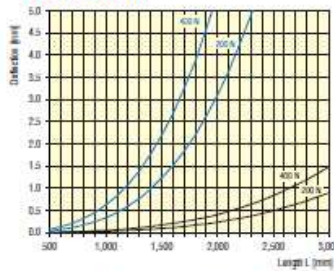
Units with 4x WS 6	
C ₀	8006 N
C	3748 N
F _{1 stat.}	5642 N
F _{1 dyn.}	3198 N
F _{2 stat.}	8006 N
F _{2 dyn.}	3748 N
M _{1 stat.}	212 Nm
M _{1 dyn.}	310 Nm
M _{2 stat.}	303 Nm
M _{2 dyn.}	120 Nm
M _{3 dyn.}	178 Nm
M _{4 dyn.}	206 Nm

Force sketch of the load table see page 37

Order Key 220 006 XXXX

Length in mm (in steps of 100 mm)
e.g. 0029 = Length 298
0299 = Length 2998
Profile length = Total Length L - 2 mm

Deflection



Force sketch of the deflection diagrams see page 37

2 x Aluminium Bearing Carriage WS 6/70 (Kit)



- L 84 x W 126 x H 8 mm
- Polished steel plate
- 2 x WS 6/70, central lubrication
- Adjustable free of clearance
- Total Weight: 1.19 kg

Item no.: 223 240 0001

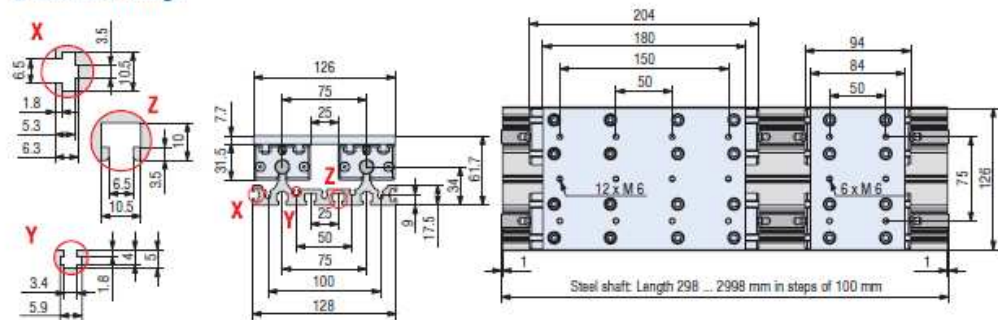
4 x Aluminium Bearing Carriage WS 6/70 (Kit)



- L 180 x W 126 x H 8 mm
- Polished steel plate
- 4 x WS 6/70, central lubrication
- Adjustable free of clearance
- Total Weight: 2.48 kg

Item no.: 223 240 0002

Scale Drawings



Hybrid Two-Phase Stepping Motor MS 110 / 160



MS 160 Z

MS 160

MS 110

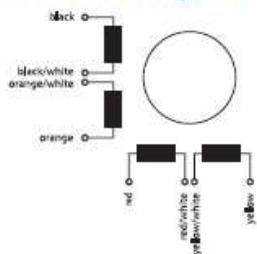
Features

- hybrid stepping motor with high energy density
- unipolar and bipolar mode of operation due to 8-wire connection
- revolution control via step-sequence frequency in open loop
- minor step angle error, not cumulative
- rotation angle of the motor shaft is directly proportional to the number of the input impulses
- second shaft end for the optional mounting of brake and encoder (type HEDS 55..., make: HP)
- Option: Gear stepping motor upon request

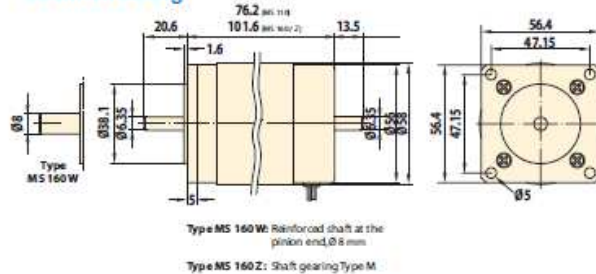
Technical Data

Description	Item no.	Holding torque unipolar/bipolar Nm	Winding torque per phase (unipolar) A	Coil voltage per phase V	Winding inductance per phase mH	Step- angle °	Connecting lines	Weight kg	Range dimension mm	Overall length (without shaft) mm	Ø / length shaft A-sided mm	Ø / length shaft B-sided mm
MS 110	473031	0.88 / 1.1	2.8	2.8	1.9	1.8	8	1.0	56.4	76.2	6.35 / 20.6	6.35 / 18.6
MS 160	473041	1.3 / 1.6	2.85	1.7	2.2	1.8	8	1.4				
MS 160Z	473042	1.3 / 1.6	2.85	1.7	2.2	1.8	8	1.4				
MS 160W	473043	1.3 / 1.6	4.1	1.1	1.0	1.8	8	1.4			8 / 20.6	6.35 / 18.6

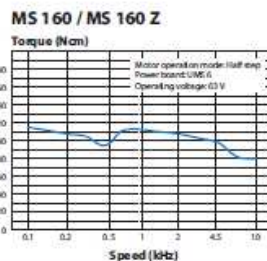
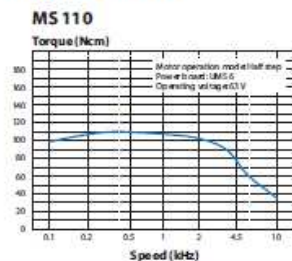
Connection Diagram



Scale Drawing



Torque Curves

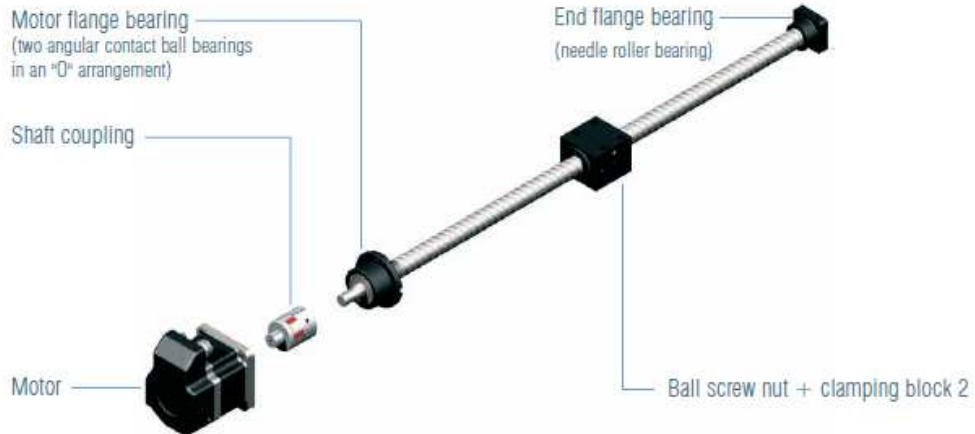


Drive Components

Overview

Linear drives

At the employment of linear drives, the directly or via a toothed belt driven spindle is the most frequently applied variant.



Accessory

Shaft coupling: compensation of mismatching shaft ends (see page B 81)

Flange bearing: linear drive bearing (see page B 59)

Shaft couplings



Set consisting of two aluminium shaft coupling parts, three PUR toothed rims (86°, 92°, 98° shore) and corresponding clamping screws.

WK 30/40
for shaft diameters from 6 to 13 mm

WK 40/60
for shaft diameters from 8 to 18 mm

Motor flange bearing



Bearing of the spindle's driving side (fixed bearing end).

Bearing bush with two angular contact ball bearings in an "O" arrangement.

Flange bearing



Bearing of the spindle's floating bearing end.

Bearing bush with two needle roller bearings.

Ball Screw Spindle

Ø16

Features

- Ø 16 mm, rolled, hardened and polished
- material CF 53, inductively hardened (HRC 60±2); (for more detailed information, see DIN 17212)
- pitches: 2,5 / 4 / 5 / 10 and 20 mm
- available in lengths up to 3,052 mm
- shaft ends treated according to the isel-standards or customer-specifically (see "available lengths")
- made according to DIN 69051, part 3, type of tolerance 7

Options

- customer-specific treatment of shaft ends

Available Lengths

Shaft ends not treated

- 452 mm
- 552 mm
- 652 mm
- 752 mm
- 852 mm
- 952 mm
- 1052 mm
- 1252 mm
- 1552 mm
- 1752 mm
- 2052 mm
- 2252 mm
- 2752 mm
- 3052 mm

Special lengths according to drawing: 211 13X 0998.

Shaft ends treated on both sides

- 368 mm
- 468 mm
- 568 mm
- 668 mm
- 768 mm
- 868 mm
- 968 mm
- 1068 mm
- 1168 mm
- 1268 mm
- 1368 mm
- 1468 mm
- 1568 mm
- 1668 mm
- 1768 mm
- 1868 mm
- 1968 mm
- 2068 mm
- 2168 mm
- 2268 mm
- 2368 mm
- 2468 mm
- 2568 mm
- 2668 mm
- 2768 mm
- 2868 mm
- 2968 mm
- 3068 mm

Special lengths according to drawing: 211 13X 5999.

Ordering Data

Groove Nut

- self-locking
- M 10 x 0,75 mm

Item no.: 890257 0011

Aluminium handwheel, plastic handwheel, brake

Order Key

211 13X XXXX

Pitch

- 2 = 2,5 mm
- 3 = 4 mm
- 4 = 5 mm
- 5 = 10 mm
- 6 = 20 mm

Treatment of shaft ends

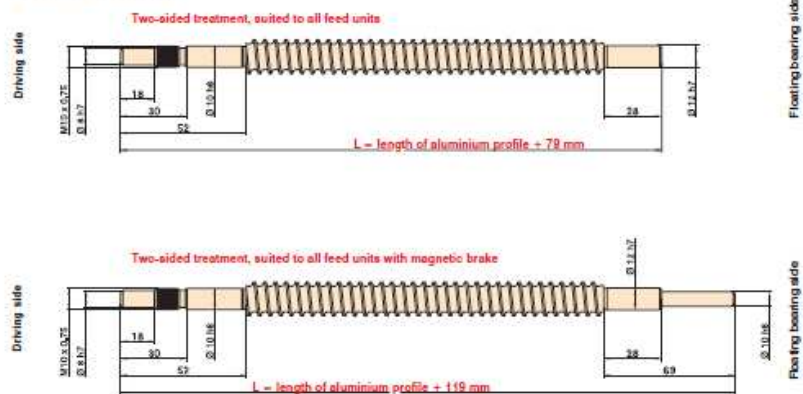
- 0 = not treated
- 5 = two-sided treatment suited to all feed units (length of aluminium profile + 78 mm)
- 6 = two-sided treatment suited to all feed units with magnetic brake (length of aluminium profile + 119 mm)

Lengths

- e.g. 045 = 452 mm
- 086 = 868 mm
- 305 = 3052 mm (reduced by the last digit)

Permissible combinations, see "available lengths"!

Scale Drawing



Shaft Couplings

Drive Components

mechanics

Jolt Factor / Temperature Factor

Toothed rim Shore hardness	Permanent temperature	Max. temperature (temporary)	Jolt factor	S_A
86	- 50 bis + 80 °C	- 60 bis + 120 °C	Minor Jolts	1.5
92	- 40 bis + 90 °C	- 50 bis + 120 °C	Medium Jolts	1.8
98	- 30 bis + 90 °C	- 40 bis + 120 °C	Major Jolts	2.2

Ambient temperat. [°C]	-30 bis +30	+40	+60	+80	+90
Temperature factor	1,0	1,2	1,4	1,8	2,2

Technical Data

Size	Shore hardness	Revolutions per minute V=30 m/s	Torque			Static torsion spring stiffness [Nm/rad]	Torsion spring stiffness [N/mm]	Mass moment of inertia [kgm ²]	
			T_{Kup}	T_{KN}	T_{Kmax}			per hub	toothed rim
20/30	86	28.000	0,45	2,2	4,5	22,6	183	0,49 - 10 ⁻⁶	0,079 - 10 ⁻⁶
	92			3,0	6,0	31,5	262		
	98			5,0	10,0	51,6	518		
30/40	86	19.000	1,0	5,5	11,0	82,4	226	2,8 - 10 ⁻⁶	0,457 - 10 ⁻⁶
	92			7,5	15,0	114,6	336		
	98			12,5	25,0	171,9	604		
40/60	86	14.000	2,5	6,9	14,0	415,0	780	20,4 - 10 ⁻⁶	1,49 - 10 ⁻⁶
	92			10,0	20,0	573,0	1120		
	98			17,0	34,0	859,5	2010		

Ordering Data

Shaft couplings



Scope of delivery: 2 aluminium blocks, 3 PUR toothed rims (86°, 92° and 98° shore) and appropriate clamping screws
Item no. - see table

PUR toothed rims
all hardness grades



for WK 20/30 Item no.: 217 011 00**
for WK 30/40 Item no.: 217 012 00**
for WK 40/60 Item no.: 217 013 00**
for **, insert the shore hardness

coupling	Item no.:	d_1	d_2
20/30	218 001 5060	5,0	6,0
	218 001 9999	from 4 to 7 mm	
30/40	218 002 6380	6,25	8,0
	218 002 8080	8,0	8,0
	218 002 9999	from 6 to 13 mm	
40/60	218 003 9580	9,52	8,0
	218 003 9999	from 8 to 18 mm	

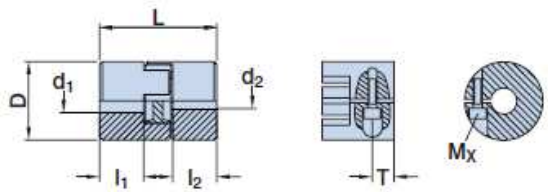
Further couplings upon request!

mechanics

Linear Units

Shaft Couplings

Scale Drawing



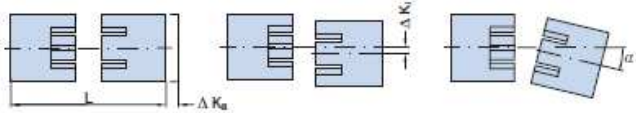
Size	Dimensions [mm]				Clamping screw		
	D	L	l ₁ / l ₂	d ₁ / d ₂	M _x	T	Screwing-down torque [Ncm]
20/30	20	30	10	4 - 7	M3	5	0,76
30/40	30	40	14	6 - 13	M4	5	1,34
40/60	40	60	22,5	8 - 18	M5	12	3,05

Drive Components

Definitions

- T_{Ksp} [Nm] = Coupling torque clearance-free
- T_{KN} [Nm] = Nominal coupling torque
- T_{Kmax} [Nm] = Maximal coupling torque
- T_N [Nm] = Nominal plant torque
- T_{AS} [Nm] = Maximal drive torque
- T_S [Nm] = Maximal torque
- J_A [kgm²] = Moment of inertia - motor side
- J_L [kgm²] = Moment of inertia - load side
- S_A = Jolt factor
- S_t = Temperature factor

Displacement Compensation



Size	Toothed rim Shore hardness	Displacements		
		axial ΔK_a	radial ΔK_r	angle α [°]
20/30	86	0,8	0,16	1
	92		0,13	
	98		0,08	
30/40	86	0,1	0,18	1
	92		0,15	
	98		0,09	
40/60	86	1,2	0,125	1
	92		0,10	
	98		0,06	

$$T_{Ksp} > T_S S_t$$

$$T_{KN} > T_N S_t$$

$$T_{Kmax} > T_S S_t$$

$$T_S = T_{AS} S_A \frac{J_L}{J_A + J_L}$$

B80

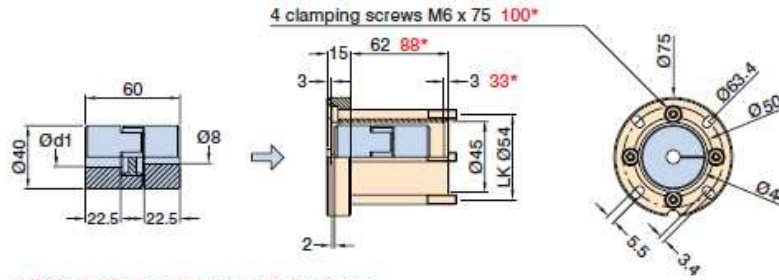
MECHANICS | Linear Units

iselautomation

Coupling casings

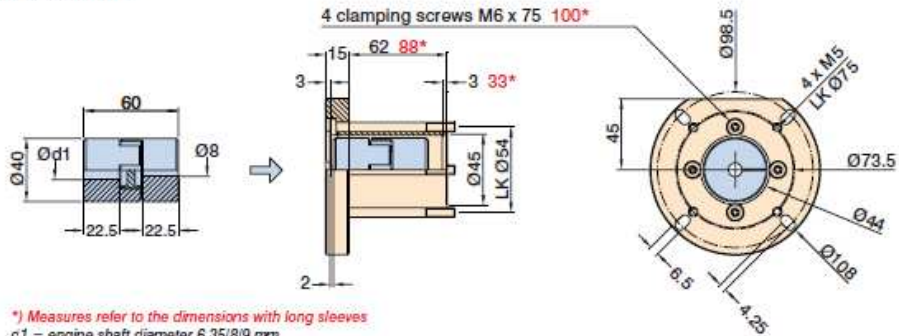
Drive Components

Scale Drawing Coupling Casing 1



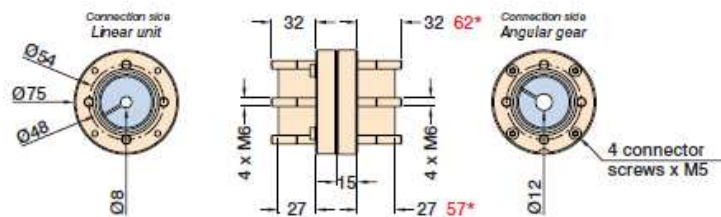
**) Measures refer to the dimensions with long sleeves
d1 = engine shaft diameter 6.35/8/9 mm
Suitable shaft coupling WK 40/60 on page B 117 (not included in scope of delivery)*

Scale Drawing Coupling Casing 2



**) Measures refer to the dimensions with long sleeves
d1 = engine shaft diameter 6.35/8/9 mm
Suitable shaft coupling WK 40/60 on page B 117 (not included in scope of delivery)*

Scale Drawing Split Coupling Casing



**) Measures refer to the dimensions with long sleeves
Suitable shaft coupling WK 40/60 on page B 117 (not included in scope of delivery)*

Ball Screw Nut

Version 2-Ø16



Features

- material 20MnCr5, ground
- versions for ball screw spindle Ø 16 mm
- nut pitch: 2.5/4/5/10 mm
- balls are redirected internally
- as casing with foot mounting
- additional lubrication by grease nipples 90°, 0°

Load Rates

Pitch	Major diameter	Dynamic load rate	Static load rate
2,5 mm	16 mm	3500 N	5500 N
4 mm	16 mm	4600 N	7200 N
5 mm	16 mm	4600 N	7200 N
10 mm	16 mm	4200 N	6500 N

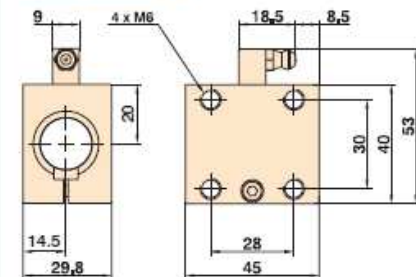
Ordering Data

for Spindle Ø16 only

Pitch	Item no.
2,5	213 003 1003
4	213 003 1004
5	213 003 1005
10	213 003 1010

Matching: Wipers
 • Packaging unit: 2 pieces
 Item no.: 613 502

Scale Drawings



Version 3-Ø16 Ø 25



Features

- material 16MnCr5, ground
- versions for ball screw spindles Ø 16 and Ø 25 mm
- nut pitches: 2.5/4/5/10 and 20 mm (Ø16 mm) 5 / 10 and 20 mm (Ø 25 mm)
- balls are redirected internally
- separate clamping blocks for foot and flange mounting
- the version with nut pitch 20 is delivered with wipers

Load Rates

Pitch	Major diameter	Dynamic load rate (N)	Static load rate (N)
2,5	16	3,500	5,500
4	16	4,600	7,200
5	16	4,600	7,200
10	16	4,200	6,500
20	16	3,800	5,800
5	25	5,100	7,600
10	25	5,100	7,600
20	25	4,500	6,800

Ordering Data

for Spindle Ø 25 only

Pitch	Item no.
5	213 700 0005
10	213 700 0010
20	213 700 0020

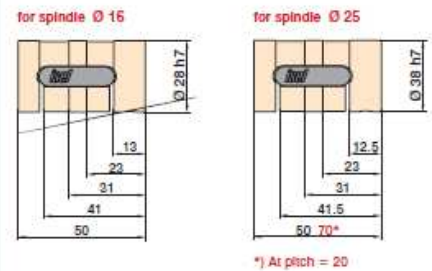
Matching:
 Wipers
 • Packaging unit: 2 pieces
 Item no.: 613 503

for Spindle Ø 16 only

Pitch	Item no.
2,5	213 503
4	213 514
5	213 505
10	213 510
20	213 520

Matching:
 Wipers
 • Packaging unit: 2 pieces
 Item no.: 613 502

Scale Drawings



Clamping Blocks

for Nut Version 3



Flange mounting



Foot mounting

Features

- material 16MnCr5, rolled, hardened and polished
- versions for ball screw spindles $\varnothing 16$ and $\varnothing 25$ mm
- nut pitches: 5/10 and 20 mm ($\varnothing 25$ mm) 2,5/4/5/10 and 20 mm ($\varnothing 16$ mm)
- ball screw nuts are clearance-free adjustable
- separate clamping blocks for foot and flange mounting

Ordering Data

Clamping Block 1 $\varnothing 16$
Foot mounting

Pitch	Item no.
all	213 500

Clamping Block 2 $\varnothing 16$
Flange mounting

Pitch	Item no.
all	213 501

Clamping Block 1 $\varnothing 25$
Foot mounting

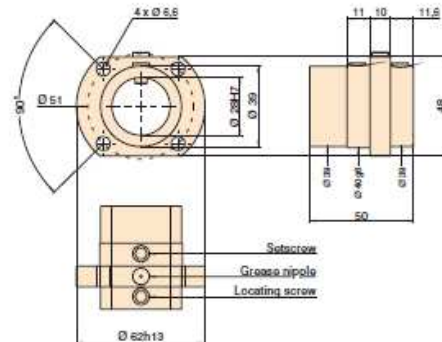
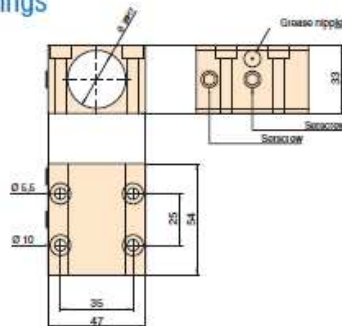
Pitch	Item no.
5 / 10	213 700 9001
20	213 700 9002

Clamping Block 2 $\varnothing 25$
Flange mounting

Pitch	Item no.
5 / 10	213 700 9003
20	213 700 9004

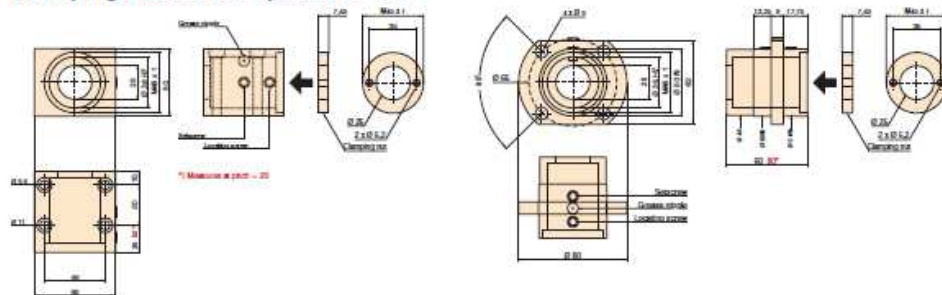
Scale Drawings

Clamping Blocks for Spindle $\varnothing 16$



Scale Drawings

Clamping Blocks for Spindle $\varnothing 25$



DODATEK NR 2

ELEMENTY SKŁADOWE MODUŁU OPTYCZNEGO:

Źródło światła:

- dioda LXHL-NB98 firmy Luxeon , z zakresem widmowym 460-490nm,

Soczewki:

- obiektyw mikroskopowy 5x, firmy PZO,
- soczewka płasko-wypukła o średnicy 12 mm z zestawu Tech Spec Lens Kit E54-672 firmy Edmund Optics,

Filtry optyczne:

- zwierciadło dichroiczne (ang. beamsplitter) FF495-Di02-25x36 firmy Semrock,
- filtr interferencyjny Brightline FF01-472/30-25 o średnicy 25 mm, firmy Semrock,
- filtr interferencyjny Brightline FF01-593/40-25 o średnicy 25 mm, firmy Semrock,

Pozostałe komponenty optyczne:

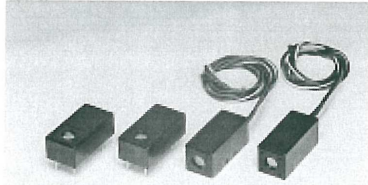
- oprawa do zwierciadła dichroicznego E54-824 firmy Edmund Optics,
- zakrętka typu C-mount, E55-245 firmy Edmund Optics,
- oprawa do obiektywu mikroskopowego typu C-mount E03-627 firmy Edmund Optics,
- uchwyt 30x5,6 mm do soczewek lub filtrów 12,5/12,7 mm typu C-mount E55-246 firmy Edmund Optics,
- uchwyt 30x5,6 mm do soczewek lub filtrów 25/25,4 mm typu C-mount E56-353 firmy Edmund Optics,
- uchwyt achromatyczny 30x11 mm do soczewek lub filtrów 12,5/12,7 mm typu C-mount E55-246 firmy Edmund Optics,
- uchwyt achromatyczny 30x11 mm do soczewek lub filtrów 25/25,4 mm typu C-mount E56-353 firmy Edmund Optics,
- złączka mosiężna pasująca do komponentów typu C-mount firmy Spokol s.c.

DODATEK NR 3

FOTOPOWIELACZ H5783 FIRMY HAMAMATSU

Metal Package PMT

Photosensor Modules H5773/H5783/H6779/H6780 Series



The H5773/H5783/H6779/H6780 series are photosensor modules housing a metal package PMT and high-voltage power supply circuit. The metal package PMTs have a metallic package with the same diameter as a TO-8 package used for semiconductor photodetectors, and deliver high gain, wide dynamic range and high-speed response while maintaining small dimensions identical to those of photodiodes. The internal high-voltage power supply circuit is also compact, making the module easy to use.

Considering the mounting methods, a cable output type and a pin output type are provided, and a total of 7 types are available according to the wavelength range to be measured. P-type is also available with selected gain and dark count ideal for photon counting under extremely low light conditions.

Product Variations

Type No.	Suffix	None	-01	-02	-03	-04	-06	-20	Output Type	Features
H5773		yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	On-board	Low power consumption
H5783		yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	Cable output	
H5773P		yes	no	no	no	no	no	no	On-board	For photon counting
H5783P		yes	no	no	no	no	no	no	Cable output	Low power consumption
H6779		yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	On-board	Low ripple noise
H6780		yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	Cable output	Fast settling time

Suffix	Spectral Response
None	300 nm to 650 nm
-01	300 nm to 850 nm
-02	300 nm to 880 nm
-03	185 nm to 650 nm
-04	185 nm to 850 nm
-06	185 nm to 650 nm
-20	300 nm to 920 nm

The suffix -06 type (synthetic silica window) has higher sensitivity than the -03 type below 300 nm in wavelength range.

Specifications

Parameter		H5773 / H5783 / H6779 / H6780 Series					Unit	
Suffix		None	-03, -06	-01, -04	-02	-20	—	
Input Voltage		+11.5 to +15.5					V	
Max. Input Voltage		+18					V	
Max. Input Current		H5773 / H5783 Series: 9 H6779 / H6780 Series: 30					mA	
Max. Output Signal Current		100					μA	
Max. Control Voltage		+1.0 (Input impedance 100 kΩ)					V	
Recommended Control Voltage Adjustment Range		+0.25 to +0.9					V	
Effective Area		φ8					mm	
Sensitivity Adjustment Range		1: 10 ⁴					—	
Peak Sensitivity Wavelength		420	420	400	500	630	nm	
Cathode	Luminous Sensitivity	Min. 40 Typ. 70	40 70	80 150	200 250	350 500	μA/lm	
	Blue Sensitivity Index (CS 5-58)	Typ. 8	8	—	—	—	—	
	Red/White Ratio	Typ. —	—	0.2	0.25	0.45	—	
Anode	Radiant Sensitivity *1	Typ. 62	62	60	58	78	mA/W	
	Standard Type	Luminous *2	Min. 10	10	15	25	35	A/lm
		Sensitivity	Typ. 50	50	75	125	250	A/lm
	P Type	Radiant Sensitivity *1 *2	Typ. 4.3 × 10 ⁴	4.3 × 10 ⁴	3.0 × 10 ⁴	2.9 × 10 ⁴	3.9 × 10 ⁴	A/W
		Dark Current *2 *3	Typ. 0.2 Max. 2	0.2 2	0.4 4	2 20	2 20	nA
	P Type	Gain *2	Min. 7.5 × 10 ⁵ Typ. 1 × 10 ⁶	—	—	—	—	—
		Radiant Sensitivity *1 *2	Typ. 6.2 × 10 ⁴	—	—	—	—	A/W
	P Type	Dark Count *2 *3	Typ. 50 Max. 100	—	—	—	—	s ⁻¹
		Rise Time *2	Typ. 0.78	—	—	—	—	ns
	Ripple Noise *2 *4 (peak to peak)		Max. 1.2	—	0.6	—	—	mV
Settling Time *5		Max. 2	—	0.2	—	—	s	
Operating Ambient Temperature *6		+5 to +50		+5 to +45			°C	
Storage Temperature *6		-20 to +50					°C	
Weight		60	80	60	80	—	g	

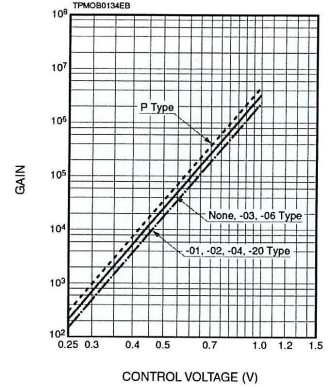
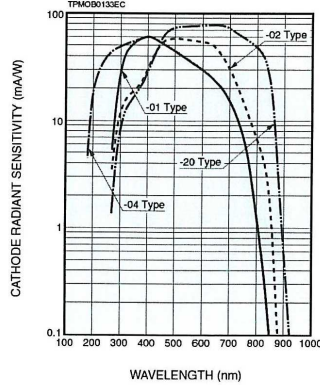
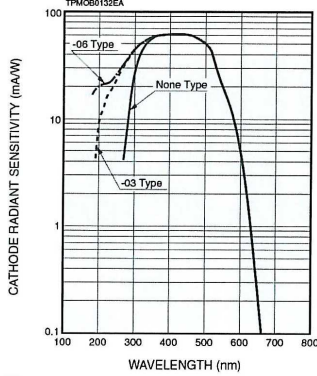
*1: Measured at the peak sensitivity wavelength *2: Control voltage = +0.8 V *3: After 30 minutes storage in darkness

*4: Cable RG-174/U, Cable length 450 mm, Load resistance = 1 MΩ, Load capacitance = 22 pF

16 *5: The time required for the output to reach a stable level following a change in the control voltage from +1.0 V to +0.5 V. *6: No condensation

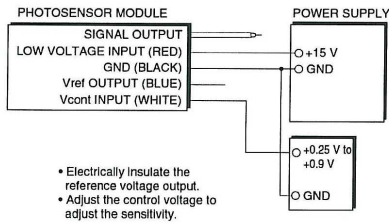
Current Output Type Photosensor Modules

Characteristics (Cathode radiant sensitivity, Gain)



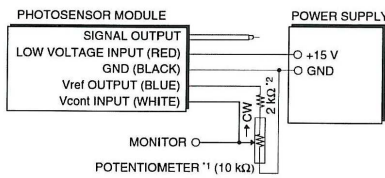
Sensitivity Adjustment Method

VOLTAGE PROGRAMMING



- Electrically insulate the reference voltage output.
- Adjust the control voltage to adjust the sensitivity.

RESISTANCE PROGRAMMING

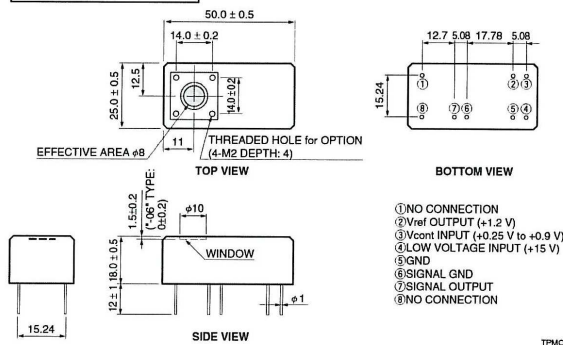


- *1: When using a potentiometer to adjust sensitivity, monitor the control voltage so it does not exceed +1.0 V.
- *2: H6799/H6780 series has this 2 kΩ resistor. No external resistor is needed.

TPM090131EC

Dimensional Outlines (Unit: mm)

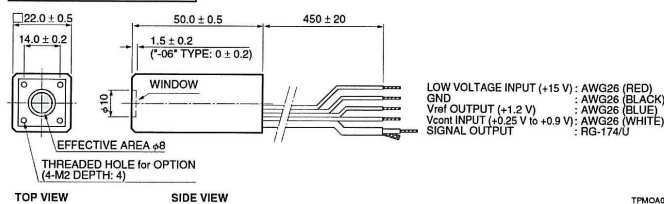
H5773/H6779 Series



- ① NO CONNECTION
- ② Vref OUTPUT (+1.2 V)
- ③ Vcont INPUT (+0.25 V to +0.9 V)
- ④ LOW VOLTAGE INPUT (+15 V)
- ⑤ GND
- ⑥ SIGNAL GND
- ⑦ SIGNAL OUTPUT
- ⑧ NO CONNECTION

TPM0A0010ED

H5783/H6780 Series

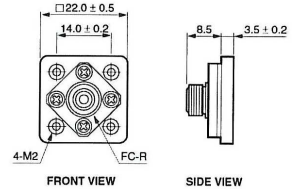


- LOW VOLTAGE INPUT (+15 V) : AWG26 (RED)
- GND : AWG26 (BLACK)
- Vref OUTPUT (+1.2 V) : AWG26 (BLUE)
- Vcont INPUT (+0.25 V to +0.9 V) : AWG26 (WHITE)
- SIGNAL OUTPUT : RG-174/U

TPM0A0011ED

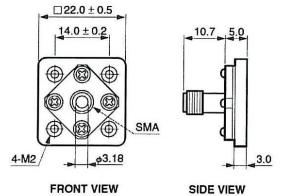
Options (Optical Fiber Adapter) (Unit: mm)

E5776 (FC Type)



TACC0A055EA

E5776-51 (SMA Type)



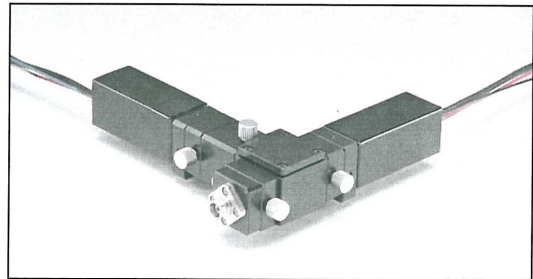
TACC0A0239EA

NEW

OPTICAL BLOCKS FOR PMT MODULES

OVERVIEW

The optical block is a compact unit containing optical components such as bandpass filters and dichroic filters. Optical components are accurately arranged in angular "minutes" by high-precision machining technology. The joint section is fully light-shielded by its V shape and an O-ring. It can easily be attached to another block or removed by the thumb screw, allowing any desired combination of blocks.



▲OPTICAL BLOCK COMBINATIONS

FEATURES

- Easy to Attach/Detach
- No Alignment Required
- Superb Light-shielding Effect

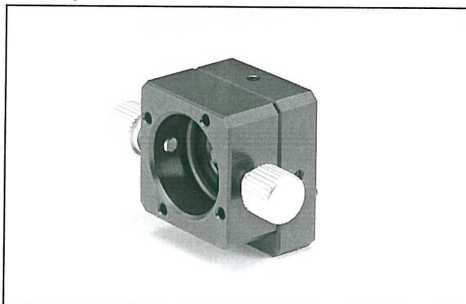
SUITABLE PMT MODULE

H5773 / H5783 / H6779 / H6780 / H9858
H5784 / H9656 / H7155 / H7467 / H7468
These ten series

For information on other photomultiplier tube (PMT) modules, contact our sales office.

BLOCK CHARACTERISTICS

● Adapter Block A10030



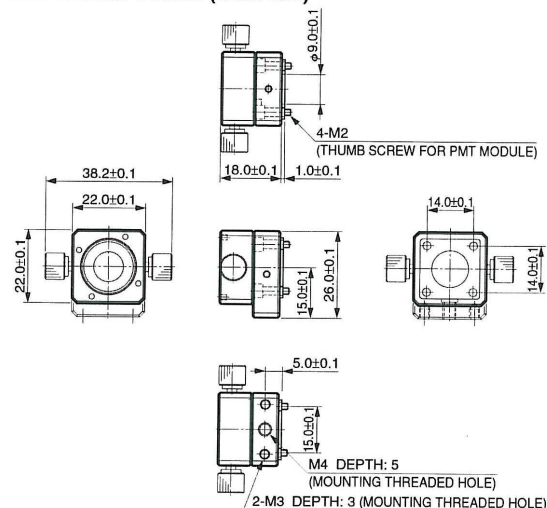
Adapter for connecting each block to PMT module

NOTE: Avoid frequently attaching and detaching from PMT module.

SPECIFICATION

Type No.	Operating Ambient Temperature	Storage Temperature	Effective Beam Size	Weight
A10030	+5 °C to +50 °C	-20 °C to +50 °C	φ 8 mm	Approx. 24 g

Dimensional Outline (Unit: mm)



TACC40209EA

DODATEK NR 4

LICZNIK FOTONÓW SR 400 FIRMY STANFORD RESEARCH SYSTEM.

www.thinkSRS.com

Photon Counters

SR400 — Gated photon counter (2-channel)



SR400 Gated Photon Counter

- Two independent counting channels
- Count rates to 200 MHz
- 5 ns pulse-pair resolution
- Gated and continuous modes
- Gate scanning for time-resolved counting
- Built-in discriminators
- Gate and discriminator outputs
- GPIB and RS-232 interfaces

• SR400 ... \$5350 (U.S. list)

The SR400 Dual-Channel Gated Photon Counter offers a convenient, integrated approach to photon counting that avoids the complexity and expense of older counting systems. No longer is it necessary to mix and match amplifiers, discriminators, gate generators and counters. The SR400 combines all these modules into a single, integrated, microprocessor-controlled instrument. Complex measurement tasks such as background subtraction, synchronous detection, source compensation, and pile-up correction can all be performed easily with the SR400.

Counters

The SR400 has two independent channels that can count at rates up to 200 MHz. Different counting modes allow you to count for a fixed amount of time, until a certain number of counts have been received, or for a fixed number of triggers. Each counting channel has its own gate generator which provides counting gates as short as 5 ns or as long as 1 s. The gates can be set in a fixed position relative to the trigger signal, or scanned to measure lifetimes or recover time-varying waveforms.

The actual inputs to the counters can be viewed as NIM level pulses from the discriminator outputs on the front panel. The discriminated pulses are negative going from 0 to -0.7 V. The DISC outputs are very useful when adjusting discriminator thresholds or gate timing.

 Stanford Research Systems

phone: (408)744-9040
www.thinkSRS.com

SR400 Gated Photon Counter

Signal Inputs and Discriminators

Both analog signal inputs (A and B) are internally terminated into 50 Ω . The inputs accept signals between ± 300 mV and are protected to ± 5 VDC. Each input is followed by a DC to 300 MHz amplifier, allowing detection of pulses as small as 10 mV. If additional sensitivity is required, a remote preamplifier (like the SR445A) can be used.

Discriminators are provided for each channel with a selectable threshold from -300 mV to $+300$ mV in 0.2 mV steps. Pulse-pair resolution is 5 ns, and pulses of either polarity may be detected. Each threshold may be programmed to scan in either direction with selectable step size. This can provide a pulse height analysis (PHA) output and is useful for choosing photomultiplier tube bias or discriminator levels.

Count Periods

The SR400 may be programmed to cycle from 1 to 2000 count periods in a single scan. At the end of the programmed scan, the counters may be stopped or the scan may be restarted. Consecutive count periods are separated by a "Dwell Time" which can be set from 2 ms to 60 s. During the Dwell Time,

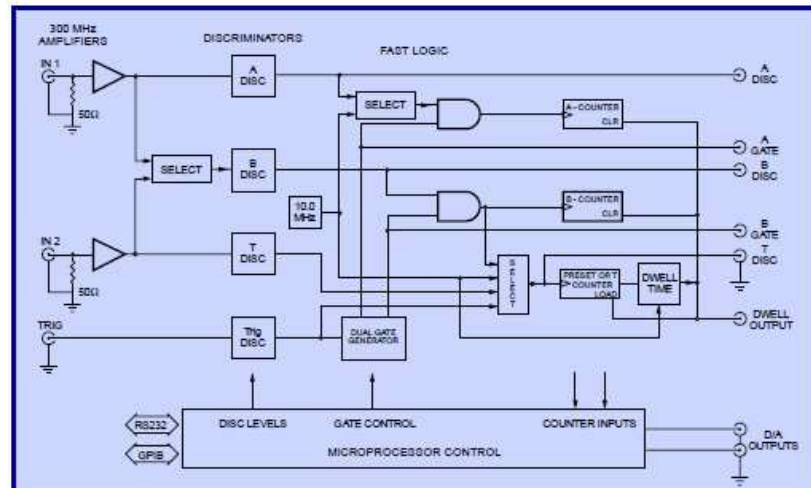
counting is disabled and data may be transferred or external parameters may be changed. The dwell output provides a TTL signal which is high during the dwell time. This can be convenient for interfacing other instruments used in the experiment.

Outputs

The front panel can display counts up to 10^9 . Results from both counters can be displayed individually or combined as A-B or A+B. A front-panel D/A output provides an analog signal proportional to A, B, A-B, or A+B depending on the counting mode. The scale may be logarithmic (1V/decade) or linear.

Computer Interfaces

Built-in RS-232 and GPIB interfaces provide a convenient means of controlling the instrument and retrieving data. While the SR400 is scanning, each of the count values for the A and B counters are stored in a 2000 point internal buffer. This buffer can be transferred on a point-by-point basis, or dumped all at once through either interface.



SR400 Block Diagram

A block diagram of the SR400 is shown above. There are three fast counters identified as counters A, B, and T. All three counters operate at rates up to 200 MHz. The input to each counter is selected from a number of sources which includes the two analog signal inputs, the 10 MHz crystal timebase, and the external trigger input. Counter T can be preset to determine the measurement period. For pulsed experiments, counters A and B may also be synchronized to external events via the two independent gate generators. The gate generator provides gates from 5 ns to 1 s in duration with a delay from an external trigger ranging from 25 ns to 1 s.

SR400 Specifications

Signal Inputs

Bandwidth	DC to 300 MHz
Input impedance	50 Ω
Linear range	± 300 mV (at input)
Input protection	± 5 VDC, 50 V for 1 μ s
Overload recovery	5 ns

Discriminators

Counters A, B, and T have independent discriminators when counting the signal inputs. All discriminator levels may be set to a fixed level or scanned.

Discriminator range	-300 mV to +300 mV
Discriminator slope	Rising or falling
Resolution	0.2 mV
Input offset voltage	<1 mV
Minimum pulse input	10 mV
Pulse-pair resolution	5 ns
Discriminator outputs	NIM levels into 50 Ω
Inhibit input	TTL high stops count

Trigger Input

Impedance	10 k Ω
Threshold	± 2.000 VDC in 1 mV steps
Slope	Rising or falling
Protection	15 VDC, 100 V for 1 μ s

Gate Generators

Both the A and B gates may be fixed in time or scanned. The gate outputs show the positions of the gates with respect to the discriminator outputs.

Insertion delay	25 ns
Maximum delay	999.2 ms
Minimum gate width	5 ns
Maximum gate width	999 ms or CW
Resolution	0.1 %, 1 ns minimum
Accuracy	2 ns + 1 %
Jitter	200 ps rms +100 ppm
Maximum trigger rate	1 MHz
Gate view output	NIM levels into 50 Ω
Gate view error	<2 ns

Scan and Dwell

The number of count periods or data points in a scan may be set from 1 to 2000. The duration of one count period is determined by the preset condition.

The time between consecutive count periods is the dwell time and can be set from 2 ms to 60 s. The dwell output will be TTL high during the dwell time. This output can be used to trigger external devices. At the end of a scan (of 1 to 2000 count periods), counting may be programmed to stop or start the scan over again. The start key begins the first count period of the programmed scan.

The stop key terminates the current count period and pauses the scan. If scanning, gates and disc levels are held at their current values. Pressing the stop key while in a paused condition will reset the scan, and all scanned parameters will return to their start values. Pressing the start key while paused resumes the scan by starting the next count period.

The dwell time may also be set to external. In this mode, count periods begin with the start key or external start input (TTL rising edge). Count periods terminate with the preset condition, the stop key, or the external stop input (TTL rising edge). Pressing the stop key while not counting resets the scan.

All count data is internally buffered for one scan. Data may be read over the computer interfaces during or after a scan.

Display Mode

Continuous	Displays current counter value
Hold	Displays final count value

D/A Output

The front-panel D/A output is proportional (linear or log) to A, B, A-B or A+B, and is updated at the end of each count period. There are two rear-panel D/A outputs: port 1 and port 2. These outputs may be set or scanned from the front panel or via the computer interface.

Full scale	± 10 VDC
Resolution	12 bits (5 mV)
Current rating	10 mA
Output impedance	<1 Ω
Accuracy	0.1 % + 5 mV

General

Interfaces	GPIB and RS-232
Dimensions	16" \times 3.5" \times 13" (WHD)
Weight	10 lbs.
Power	35 W, 100/120/220/240 VAC, 50/60 Hz
Warranty	One year parts and labor on defects in materials and workmanship



SR400 rear panel

Ordering Information

SR400	Gated photon counter	\$5350
SR445A	350 MHz preamplifier	\$1100

SR400 Gated Photon Counter



Example 1: Boxcar Mode

This experiment uses a scanning gate to measure the lifetime of an excited state pumped by a pulsed laser. The SR400's gate generators are triggered by a photodiode when the laser fires. Counter A counts photons which occur during a narrow gate, while counter B counts the photons during the entire decay.

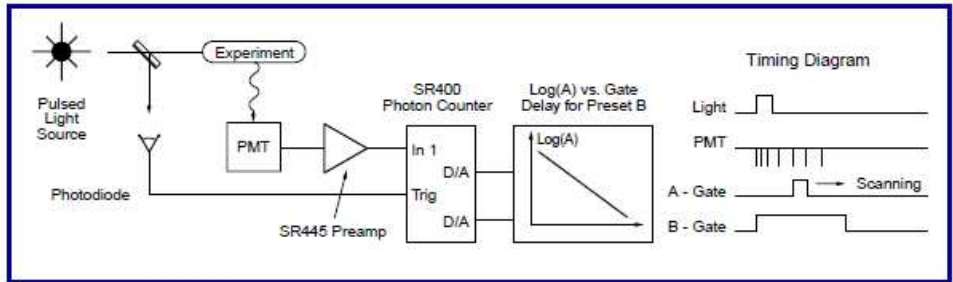
Decay data is normalized to the source intensity by counting until a preset value is reached in counter B. When B reaches its preset condition, the D/A output is set to a voltage proportional to A's count, A's gate is stepped, and a new count interval begins.

By plotting the log of A's count value vs A's gate delay, the exponential decay curve is linearized, and the lifetime of the excited state can be determined from the slope on the chart recorder. If count rates are high and count periods short, then scans may be displayed on an X-Y scope. The D/A output is the Y drive and port 1 or port 2 is the X drive. The dwell output should be used as the blanking pulse.

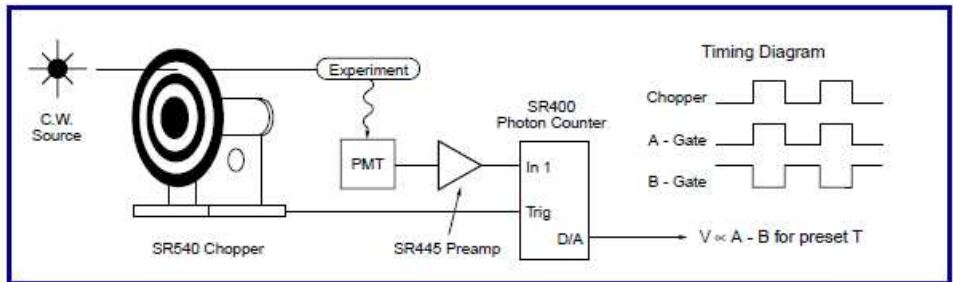
Example 2: Synchronous (Lock-In) Mode

Very small changes in the flux of photons may be measured by synchronous detection. If a signal is fixed in frequency and has a 50 % duty cycle, then synchronous photon counting, or photon counting in a "lock-in" mode, can be used. An optical chopper is used to modulate a CW light source. The reference output from the chopper triggers the photon counter's dual gate generator. The A gate is positioned to count photons during the open phase of the chopper, and thus counts the signal plus background. The B gate only counts the background, counting pulses only during the closed cycle of the chopper. The difference between the two counts, A-B, is the signal. Accumulating data over many cycles is required to measure the signal since the background rate often far exceeds the signal rate.

The D/A output is proportional to A-B. Since the background count is subtracted for each chopper cycle, only the signal which is synchronous with the chopper will cause the output of the photon counter to change.



Boxcar Mode



Lock-In Mode

www.thinkSRS.com

350 MHz Preamplifier

SR445A — 350 MHz preamplifier (4-channel)



The Model SR445A 350 MHz Preamplifier contains four wide-bandwidth, DC-coupled amplifiers, each with a gain of 5. The four channels may be used independently, or cascaded to provide a total gain of up to 625. The fast rise time, low noise, and excellent DC accuracy of the SR445A make it an ideal instrument for amplifying the outputs of fast photomultiplier tubes and photodiodes. The SR445A can be used to improve the sensitivity of oscilloscopes, photon counters, boxcar averagers, spectrum analyzers, and other high-frequency test equipment.

Each channel has an input and output impedance of 50 Ω. The input impedance of channel 1 can be increased to approximately 500 Ω by a front-panel switch. This can improve the sensitivity of signals from current and charge output devices, such as photomultiplier tubes. Each channel has a separate offset adjustment allowing you to quickly null DC errors.

SR445A Specifications

- **Four independent channels**
- **DC to 350 MHz bandwidth**
- **1 ns rise and fall time**
- **Voltage gain to 625**
- **6.4 nV/√Hz input noise**
- **50 Ω input and output impedance**
- **3 ns overload recovery**
- **Excellent phase linearity**

• **SR445A ... \$1100 (U.S. list)**

Amplifier channels	4
Inputs and outputs	50 Ω, DC coupled
Bandwidth	DC to 350 MHz (-3 dB)
Rise/fall time	1 ns (single channel)
Voltage gain	5 per channel (Up to 4 channels can be cascaded)
Input noise	6.4 nV/√Hz
Operating range	Inputs: ±200 mV, Outputs: ±1.0 V
Propagation delay	2.7 ns per channel
Recovery time	3 ns for a 10× overload
Input protection	±50 V for <1 μs
Output clamp	±1.6 V
Output overload detect	±1.3 V
Crosstalk	-60 dB
Operating temperature	0 °C to 40 °C, non-condensing
Dimensions	8.3" × 1.5" × 8" (WHD)
Power	10 W, 100/120/220/240 VAC, 50/60 Hz
Warranty	One year parts and labor on defects in materials and workmanship

Ordering Information

SR445A	350 MHz preamplifier	\$1100
--------	----------------------	--------

 **Stanford Research Systems**

phone: (408)744-9040
www.thinkSRS.com

1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA REGULATORA SCL210E3/B.

Uniwersalny regulator temperatury do kontroli urządzeń grzewczych i chłodniczych.
Charakterystyka regulacji: ON-OFF

programowanie z klawiatury gumowej 3-przyścisłkowej IP65;

1 wejście termometryczne (czujnik temperatury Pt100)

1 próg z wyjściem przekaźnikowym (zmienny temperatury zadanej)

alarm temperatury (wbudowany przekaźnikowy (kontrola ON-OFF))

wyświetlacz cyfrowy

odczyt cyfrowy o rozdzielczości wskazań 0,1°C w zakresie -99,9°C...99,9°C.

Po przekroczeniu tego zakresu regulator automatycznie przeląca odczyt temperatury na odczyt w pełnych °C w zakresie 100...999°C;

ochrona serwisowa

Parametry konfiguracyjne sterownika mogą być zabezpieczone hasłem.

interfejs IFS

Wszystkie ustawione parametry konfiguracyjne regulatora mogą być łatwo i szybko kopiowane na następny regulator za pomocą interfejsu IFS, przy użyciu specjalnego klucza.

obudowa 75 x 33 x 63 mm;

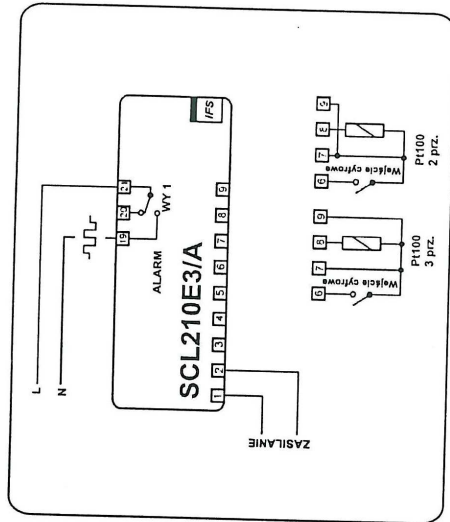
sygnalizacja błędów;

produkcja ESSECI.

2. DANE TECHNICZNE

Wejścia.....	Pt100 : -90...+800°C
Zakres wskazań.....	programowalne wejście cyfrowe
Wyjścia przekaźnikowe:	-99,9 + 999°C
WY1.....	SPDT 8(3)A/250V~ (dla obciążeń rezyst.)
Odczyt cyfrowy LED	3 cyfry+ znak, czerwony
rozdzielczość	1 °C lub 0,1 °C
automat. zmiana rozd. (z 0,1 na 1).....	po za zakresem -99,9 + 99,9 °C
Zakres temperatur pracy	-10 + 50 °C
Zakres wilgotności przechowywania.....	-20 + 70 °C
Instalacja.....	30 + 80 % bez skraplania
Zasilanie	w otworze o wymiarach 71 x 29 mm
Moc pobierana.....	3VA
Pamięć danych.....	EEPROM
Klasy ochronności.....	człoiowa IP65

12. SCHEMAT ELEKTRYCZNY



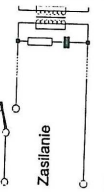
13. WAŻNE UWAGI EKSPLOATACYJNE - stosowanie układów gaszących.

Jeżeli do styków przekaźnika dołączone jest obciążenie o charakterze indukcyjnym (np. cewka stycznika, transformator), to w chwili ich rozłączenia bardzo często pojawiają się przejściowe piki napięciowe, wywołane rozładowaniem się energii zgromadzonej w indukcyjności. Mogą one wywołać drastyczne efekty, szczególnie w aparaturze kontrolno-pomiarowej. Do szczególnie negatywnych skutków tych pików należą: zmniejszenie żywotności styków i przekaźników, destrukcja półprzewodników (diody, tyrystory, triaki), uszkodzenie lub zakłócenie sterujących i pomiarowych systemów, emisja pola elektromagnetycznego zakłócającego otoczenie urządzenia. W celu uniknięcia takich skutków przepięcia muszą być zmniejszone do bezpiecznego poziomu. Najlepszą metodą jest dołączenie odpowiedniego modułu gaszącego bezpośrednio do zacisków obciążenia indukcyjnego. Generalnie do każdego typu obciążenia indukcyjnego należy dobrać odpowiednie typy układów gaszących.

Nominalne styczniki posiadają na ogół odpowiednie fabryczne układy gaszące. W przypadku ich braku proponujemy kontakt z Biurami Handlowymi firmy General Electric Power Controls: Wrocław tel (71) 344-93-80, fax (71) 343-81-90, Bielsko-Biala tel (33) 828-65-02-03-08, fax (33) 828-65-50, Warszawa tel (22) 696-55-00, fax (22) 626-94-09, Gdańsk (58) 300-04-30, fax (58) 320-12-80. Czasowo można zbocznikować obciążenie układem RC, np. 47Ω/1W + 22nF/630V.

Układ gaszący łączyć zawsze bezpośrednio do zacisków obciążenia indukcyjnego.

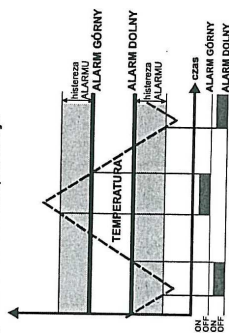
Użycie obwodu gaszącego ogranicza wypalanie się styków przekaźnika w regulatorze oraz zmniejsza prawdopodobieństwo ich sklejania. Jego brak szybko niszczy styki przekaźników wyniku pojawiania się na nich łuku elektrycznego przy ich rozłączaniu.



8. ALARM TEMPERATURY.

Regulator ma programowany górny i dolny alarm temperatury. Wartość górnego i dolnego progu alarmu jest niezależna i programowana w całym zakresie pomiarowym. Po przekroczeniu górnego bądź dolnego alarmu temperatury uruchamia się sygnał dźwiękowy oraz alarm na wyświetlaczu.

a) Przykład charakterystyki załączenia alarmu temperatury.

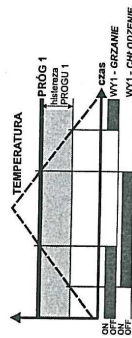


9. LISTA PARAMETRÓW REGULATORA

Kod parametru	Opis parametru	Zakres	Jednostka	Ustawienie fabryczne
Parametry czujnika temperatury				
TC	Wzorcowanie czujnika temperatury	-12...12	°C	0.0
TS	Stabilizacja odczytu czujnika	0...14	-	3
Parametry regulatora				
FD	Histeresa PROG1	0,1...800	°C	1.0
FA	Typ regulacji PROG1 0=chłodzenie; 1=grzanie	0 lub 1	-	1
FE	Tryb nocny. Skokowa zmiana temperatury zadanej PROG1.	-90...800	°C	10.0
FL	Dolne ograniczenie PROG1	-90...800	°C	-80
FH	Górne ograniczenie PROG1	-90...800	°C	800
Parametry wyjść przekątnikowych.				
LC	Status styku przekątnika 1 w razie uszkodzenia czujnika temperatury 0=wyłączony; 1=załączony	0 lub 1	-	0
LI	Minimalna przerwa między dwoma załączeniami wyjścia przekątnikowego 1	0...999	sekundy	0

7. TRYB PRACY REGULATORA (KONTROLA ON-OFF)

a) Przykład charakterystyki regulacji ON-OFF.



Kontrola temperatury przy akcji ON-OFF zależy od poniższych parametrów:

- wartość temperatury zadanej PROG1 **FD**,
- rodzaj charakterystyki **FA** (grzanie lub chłodzenie)
- wartość histeresy PROG1 **FD**

Zastosowanie regulatora jest bardzo uniwersalne. W zależności od doboru powyższych parametrów uzyskujemy indywidualną kontrolę procesu.