

ZMIANY ROZKŁADU PRZESTRZENNEGO WIDM DYFRAKCYJNYCH KOLONII BAKTERII WYWOŁANYCH DZIAŁANIEM WYBRANYCH CZYNNIKÓW FIZYKOCHEMICZNYCH

SPATIAL CHANGES OF THE DIFFRACTION PATTERNS OF BACTERIAL COLONIES INDUCED BY SELECTED PHYSICOCHEMICAL FACTORS

Mariusz Linard, Igor Buzalewicz*, Agnieszka Ulatowska-Jarża

Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Katedra Inżynierii Biomedycznej, 50-370 Wrocław, Wybrzeże Wyspiańskiego 27

*e-mail: igor.buzalewicz@pwr.edu.pl

STRESZCZENIE

Problemy identyfikacji bakterii oraz zwalczania zakażeń bakteryjnych należą do jednych z najważniejszych zagadnień współczesnej nauki w kontekście przeciwdziałania wzrastającej lekooporności bakterii. Istnieje zatem potrzeba opracowania nowych, szybszych i bardziej powszechnych metod detekcji oraz identyfikacji bakterii, środków i czynników bakteriobójczych, jak również technik pozwalających na charakteryzację efektywności ich działania. W niniejszej publikacji zbadano korelację pomiędzy zmianami rozkładów przestrzennych widm dyfrakcyjnych Fresnela kolonii bakterii wywołanych działaniem wybranych czynników fizykochemicznych: niskiej temperatury, alkoholu oraz promieniowania UV. Przeprowadzona analiza jakościowa oraz ilościowa uzyskanych wyników wykazała bezpośredni związek pomiędzy zmianami rozkładu przestrzennego widm dyfrakcyjnych kolonii a działaniem czynników hamujących rozwój kolonii bakterii. Uzyskane wyniki świadczą o możliwości wykorzystania analizy widm dyfrakcyjnych kolonii bakterii do oceny efektywności działania materiałów, środków chemicznych i czynników fizycznych o działaniu antybakteryjnym.

Słowa kluczowe: dyfrakcja światła, widma dyfrakcyjne Fresnela, bakterie, czynniki antybakteryjne

ABSTRACT

The problem of bacteria identification and limitation of the bacteria contamination risk are the most important issues of contemporary science in the context of increasing bacterial drug resistance. Therefore, there is a need to develop new, faster, and more common methods of bacteria detection and identification, antibacterial agents and factors, as well as techniques to characterize their effectiveness against bacteria. In this paper the correlation between the spatial changes of bacterial colonies Fresnel diffraction patterns and the colonies treatment by selected physicochemical factors: low temperature, alcohols, and UV radiation was investigated. The performed qualitative and quantitative analysis of obtained results confirmed that there is a direct relation between the bacterial colonies diffraction patterns spatial changes and the factors influencing bacterial colonies growth. Obtained preliminary results demonstrated the possibility of the application of the diffraction patterns analysis to characterize the efficiency of different physicochemical factors with antibacterial activity.

Keywords: light diffraction, Fresnel diffraction patterns, bacteria, antibacterial factors

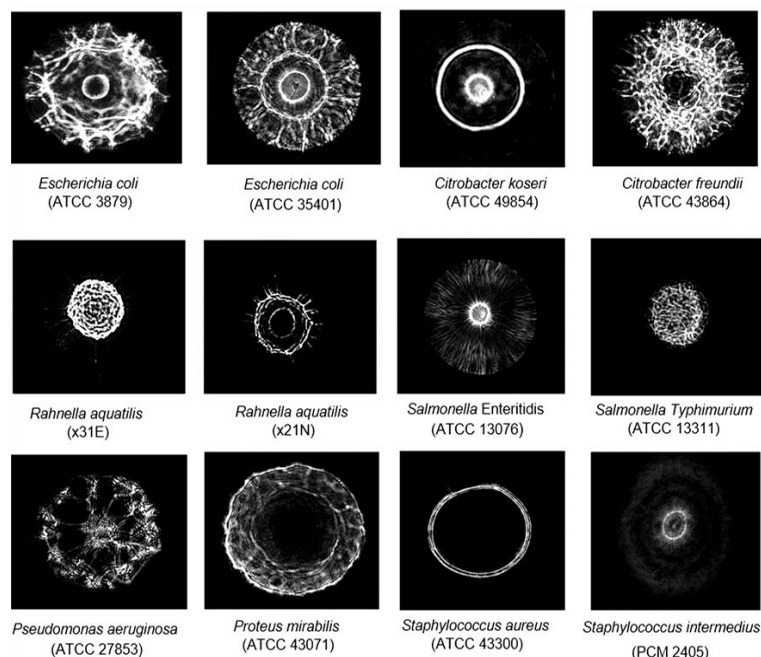
1. Wstęp

Obecnie obserwuje się stały wzrost oporności bakterii na powszechnie stosowane antybakteryjne związki chemiczne (antybiotyki, czynniki bakteriobójcze itp.). W szczególności, oporność na antybiotyki jest szeroko analizowana i omawiana w literaturze medycznej. Amerykański Narodowy Instytut Alergii i Chorób Zakaźnych – NIAID (ang. *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*) ostrzega w swoich raportach, że ponad 70% różnych gatunków bakterii, najczęściej powodujących infekcje szpitalne, jest już całkowicie odpornych na co najmniej jeden rodzaj antybiotyków powszechnie stosowanych w ich zwalczaniu [1, 2]. W konsekwencji, leczenie ma ograniczone możliwości zwalczania chorób zakaźnych i powikłań zakaźnych powszechnych u pacjentów poddawanych chemioterapii, dializie i zabiegom chirurgicznym, dla których kluczowe znaczenie ma zdolność skutecznego leczenia wtórnych infekcji.

Należy podkreślić, że zgodnie z doniesieniami literaturowymi, to właśnie niewłaściwa terapia antybiotykowa jest jednym z najważniejszych czynników powodujących wzrost oporności bakterii. Antybiotyki należą do najczęściej przypisywanych leków stosowanych w medycynie, jednakże aż 50% wszystkich przypisywanych antybiotyków nie powinno w ogóle być zastosowanych w leczeniu lub też nie są one odpowiednio dobrane tak, aby zapewnić skuteczne działanie terapeutyczne. Niewłaściwy dobór antybiotyku lub też zbyt krótki czas jego stosowania, sprawiają, iż bakterie, którym udało się przeżyć w organizmie, są w stanie wytworzyć odporność na stosowane względem nich środki farmakologiczne. W konsekwencji dochodzi do mutacji kodu genetycznego tych bakterii tak, iż są one w stanie wytworzyć enzymy rozkładające składniki leków, których działaniu podlegały. Tym samym w wyniku ich rozmnażania się oraz wymiany informacji genetycznej powstają nowe szczepy bakterii lekoopornych. Poważne zagrożenie stanowią bakterie znajdujące się w szpitalach, które ze względu na powszechną obecność osób chorych, środków farmakologicznych oraz niewystarczające metody sterylizacji, charakteryzują się wysoką odpornością na powszechnie stosowane antybiotyki, np. szczep gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* MRSA (ang. *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus*), czyli gronkowca złocistego odpornego na metycylinę. Szczególnie niebezpieczne są bakterie z genem NDM-1 (ang. *New Delhi-Metallo-beta-laktam-1*), które odkryto u pacjenta leczonego w szpitalu w New Delhi (Indie), gdyż gen ten koduje enzymy tzw. karbapenemazy rozkładające karbapenemy, które dotychczas uważane były za antybiotyki „ostatniej szansy” w leczeniu zakażeń wywołanych przez pałeczki Gram-ujemne [3, 4]. Zwiększająca się lekooporność w głównej mierze związana jest z brakiem wstępnej diagnostyki mikrobiologicznej pozwalającej na identyfikację bakterii, które są rzeczywistą etiologiczną przyczyną chorób zakaźnych. Wstępna diagnostyka oraz identyfikacja gatunków bakterii powodujących stany chorobowe, umożliwia podjęcie odpowiednich procedur terapeutycznych poprzez dobór antybiotyku przeznaczonego do konkretnego gatunku bakterii, co w konsekwencji doprowadzi do ograniczenia stosowania antybiotyków o szerokim spektrum działania. Zastosowanie antybiotyków dedykowanych dla konkretnych bakterii chorobowych zwiększa skuteczność terapii, lecz również w znaczny sposób zmniejsza ryzyko wytworzenia przez bakterie lekooporności. Zgodnie z programem zwalczania oporności bakterii na antybiotyki NIAID odpowiednia diagnostyka ma kluczowe znaczenie dla ułatwienia zastosowania środków terapeutycznych przez umożliwienie stosowania leków skierowanych na konkretny patogen [5]. Oznacza to, iż zindywidualizowana terapia antybiotykowa w najbliższych latach stanie się ogólnosiwiatowym trendem w zwalczaniu lekooporności bakterii. Powyższe przyczyny sprawiają, że w ostatnich latach podjęto pewne działania w celu opracowania nowych technik wykrywania i identyfikacji bakterii, które mogą zmniejszyć koszt analizy i szybko wykryć bakterie w próbkach klinicznych, w żywności i w wodzie, jak również prowadzi się prace nad nowymi środkami chemicznymi oraz czynnikami bakteriobójczymi, które mogłyby zostać zastosowane w zwalczeniu bakterii, szczególnie chorobotwórczych.

W ostatnich latach w naszej Grupie opracowany został nowy optoelektroniczny system diagnostyki mikrobiologicznej opierający się na zjawisku dyfrakcji światła na koloniach bakterii [6, 7, 8, 9, 10]. W praktyce mikrobiologicznej „złotym standardem” jest posiew komórek bakterii na podłożach stałych. Na stałych podłożach hodowlanych komórki bakteryjne dzieląc się, formują widoczne nieuzbrojonym okiem makroskopowe skupiska o budowie charakterystycznej dla danego gatunku bakterii, składu podłoża hodowlanego oraz warunków inkubacji. Mianem kolonii określa się skupiska drobnoustrojów

na powierzchni lub w głębi stałego podłoża hodowlanego. Przy dostatecznie dużym rozcieńczeniu wejściowej zawiesiny bakterii zakłada się, iż kolonia bakterii powstaje z pojedynczej komórki bakteryjnej. Tak powstałą kolonię określa się mianem czystej kultury bakterii. Jest to wstępny etap przygotowania próbek klinicznych do dalszej analizy. Spośród wszystkich kolonii bakterii znajdujących się na szalce, wybierane są kolonie reprezentatywne, z których przygotowywane są próbki do dalszych badań za pomocą różnych technik diagnostycznych: molekularnych, biochemicznych, immunologicznych itp. Opracowana technika pozwala na identyfikację bakterii już na etapie wstępnego przygotowania próbek klinicznych. Metoda ta polega na specyficznej transformacji światła na tych makroskopowych strukturach bakteryjnych. Kolonie bakterii oświetlone światłem koherentnym generują wzorce optyczne w postaci widm dyfrakcyjnych, których rozkład przestrzenny oraz natężenie światła ugiętego w bezpośredni sposób zależą od właściwości morfologicznych oraz optycznych kolonii, które są charakterystyczne dla danego gatunku lub szczepu bakterii. Przykładowe widma dyfrakcyjne kolonii bakterii zostały przedstawione na rysunku 1. Oznacza to, iż porównując widma dyfrakcyjne wygenerowane przez próbkę kliniczną (nieznaną) oraz referencyjną (znaną) możliwe jest określenie gatunku i szczepu bakterii znajdujących się w analizowanej próbce.



Rys. 1. Przykładowe widma dyfrakcyjne Fresnela kolonii bakterii

W celu przeprowadzenia ilościowej analizy widm dyfrakcyjnych, konieczne było zastosowanie algorytmów przetwarzania informacji obrazowej oraz metod statystycznych. Z zarejestrowanych widm dyfrakcyjnych wyodrębniono cechy ilościowe charakteryzujące specyficzny rozkład przestrzenny widm dyfrakcyjnych kolonii bakterii. Następnie wykorzystana została analiza wariancji ANOVA (ang. *Analysis Of Variance*) w celu wyznaczenia zestawu cech klasyfikacyjnych widm dyfrakcyjnych w najlepszy sposób je różnicujących, które zostały następnie wykorzystane do budowy modeli klasyfikacyjnych opartych na liniowej LDA (ang. *Linear Discriminant Analysis*) i kwadratowej analizie dyskryminacyjnej QDA (ang. *Quadratic Discriminant Analysis*) lub maszynie wektorów nośnych SVM (ang. *Support Vector Machine*) [11]. Uzyskane wyniki wykazały, iż możliwa jest identyfikacja gatunku i szczepu bakterii ze skutecznością większą niż 98% [12]. Opracowana metoda i układ pomiarowy zostały opatentowane [13] oraz są obecnie wdrażane przez firmę Bioavlee Sp. z o.o.

W niniejszym artykule przedstawione są wstępne wyniki prac eksperymentalnych mających na celu zbadanie wpływu wybranych fizykochemicznych czynników bakteriobójczych na morfologię kolonii bakterii oraz rozkład przestrzenny ich widm dyfrakcyjnych Fresnela. Badania przeprowadzono na przykładzie kolonii bakterii *Yersinia enterocolitica*, które zostały poddane działaniu: niskiej temperatury, promieniowania UV oraz mieszaniny alkoholi. Aby określić wpływ tych czynników na widma dyfrakcyjne, opracowano dedykowane algorytmy przetwarzania informacji obrazowej w celu wyodręb-

nienia cech ilościowych ich rozkładów przestrzennych. Dodatkowo, aby wykazać korelację pomiędzy obserwowanymi zmianami wartości średnich tych cech a stosowanym czynnikiem, przeprowadzono analizę wariancji wartości tych cech. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że zmiany morfologiczne kolonii bakterii wywołane przez te czynniki w bezpośredni sposób wpływają na rozkład przestrzenny ich widm dyfrakcyjnych Fresnela. Tym samym możliwe jest wykorzystanie opracowanej metody opartej na zjawisku dyfrakcji światła na koloniach bakterii nie tylko do identyfikacji gatunku/szczepu bakterii, lecz również do oceny efektywności działania biobójczego różnego rodzaju czynników fizykochemicznych, w tym antybiotyków.

2. Metoda

2.1. Przygotowanie próbek bakterii

W badaniach wykorzystano próbki bakterii *Yersinia enterocolitica* (ATCC 23715) przygotowane w laboratorium firmy Bioavlee Sp. z o.o. według standardowych procedur mikrobiologicznych. Zawiesiny bakterii były wstępnie inkubowane w temperaturze 37 °C przez 24 godziny. Następnie bakterie zostały naniesione na tryptozowo-sojowe podłoże hodowlane i były dalej inkubowane w temperaturze 37 °C przez kolejne 5 godzin. Po tym czasie zostały one poddane działaniu wybranych czynników fizykochemicznych (niskiej temperatury, promieniowania UV oraz środka chemicznego), po czym wszystkie próbki były dalej inkubowane w cieplarni. Następnie, po 23 godzinach inkubacji, zostały one umieszczone w zaprojektowanym układzie optycznym, w którym pojedyncze kolonie bakterii zostały oświetlone zbieżną, sferyczną wiązką świetlną i zarejestrowane zostały ich widma Fresnela. Widma dyfrakcyjne były porównywane z próbką kontrolną niepoddaną działaniu żadnego z czynników oraz inkubowaną w taki sam sposób, jak próbki pomiarowe.

2.2. Zastosowane czynniki fizykochemiczne

W przeprowadzonych badaniach zastosowano trzy czynniki fizykochemiczne: niską temperaturę (4 °C), promieniowanie UV (340–390 nm) oraz chemiczny środek bakteriobójczy Skinsept® Pur (producent: Ecolab). Środek Skinsept® Pur w 100 g roztworu zawiera: substancje czynne: 46,0 g etanolu (96% zdenaturowany); 27,0 g alkoholu izopropylowego; 1,0 g alkoholu benzyłowego oraz substancje pomocnicze: nadtlenek wodoru, woda oczyszczona.

W przypadku zastosowania stresu temperaturowego poprzez obniżenie temperatury następuje zaburzenie syntezy istotnych związków potrzebnych do realizacji procesów życiowych komórki bakteryjnej, co skutkuje spowolnieniem metabolizmu bakterii [14]. W tym celu kolonie bakterii umieszczono w temperaturze $(4,0 \pm 0,5)$ °C przez 55 minut, a następnie dalej inkubowano do czasu pomiaru.

Z kolei zastosowanie promieniowania z zakresu ultrafioletu w bezpośredni sposób wpływa na strukturę kwasu dezoksyrybonukleinowego komórki bakteryjnej, gdyż jego energia jest absorbowana przez wiązania pomiędzy zasadami azotowymi powodując ich rozerwanie. Należy jednak podkreślić, iż jeśli przez czas naświetlania kolonii promieniowaniem UV nie zostaną one zniszczone w stopniu uniemożliwiającym im dalsze funkcjonowanie, to wówczas aktywowane zostaną geny odpowiedzialne za rekonstrukcję komórek bakterii i będzie możliwy dalszy rozwój drobnoustrojów [15]. W pomiarach wykorzystano lampę UVA emitującą promieniowanie z zakresu długości fal 340–390 nm. W płaszczyźnie próbki moc promieniowania wynosiła $(923,6 \pm 1,99)$ μW, a natężenie napromienienia: $(1175,96 \pm 2,53)$ μW/cm². Kolonie bakterii były oświetlane przez 40 minut, po czym były dalej inkubowane do czasu pomiaru.

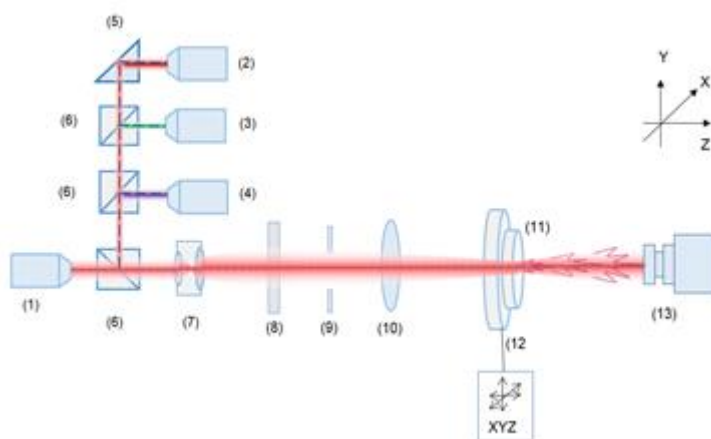
Alkohole powodują denaturację białek oraz rozpuszczenie lipidów membrany bakterii, której ciągłość może być przerwana, co prowadzi do wycieku cytoplazmy do środowiska zewnętrznego oraz do śmierci komórki [16]. W celu zbadania wpływu tego czynnika zastosowano środek Skinsept® Pur zawierający mieszaninę alkoholi. Na kolonie naniesiono 0,09 g tego środka.

W celu wywołania efektu wpływu wyżej wymienionych czynników na strukturę kolonii bakterii, po 5 godzinach inkubacji próbek, poddane one zostały działaniu wyżej wymienionych czynników fizykochemicznych, po czym wszystkie próbki były dalej inkubowane w cieplarni.

2.3. Układ pomiarowy do rejestracji widm dyfrakcyjnych

Pomiary zostały wykonane w multispektralnym dyfraktometrze optycznym ze zbieżną sferyczną wiązką oświetlającą, który umożliwia rejestrację widm dyfrakcyjnych kolonii bakterii i został przedstawiony na rysunku 2. Układ ten składał się z: (1) modułu diody laserowej (635 nm, 1 mW), (2) modułu diody laserowej (780 nm, 4 mW), (3) modułu diody laserowej (532 nm, 4 mW), (4) modułu diody laserowej (405 nm, 4 mW), (5) pryzmatu odbiciowego, (6) dzielników wiązki, (7) poszerzacza wiązki, (8) polaryzatora liniowego oraz filtra amplitudowego, (9) przesłony irysowej, (10) soczewki transformującej, (11) szalki Petriego z koloniami bakterii, (12) statywu na szalkę z możliwością przesuwu XYZ, (13) kamery z obiektywem do rejestracji widm.

Skolimowana wiązka świetlna przechodzi przez poszerzacz wiązki, który zwiększa jej średnicę poprzeczną. Następnie, za pomocą polaryzatora oraz filtra amplitudowego regulowane jest jej natężenie, a za pomocą przesłony irysowej kontrolowana jest jej średnica.



Rys. 2. Schemat multispektralnego dyfraktometru optycznego

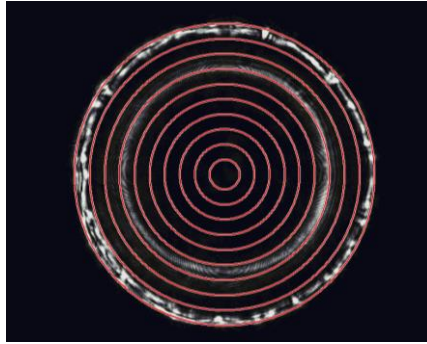
Wiązka świetlna jest skupiana przez soczewkę transformującą tak, iż pojedynczą kolonię bakterii oświetla wiązka zbieżna. Światło padając na kolonię bakterii ulega dyfrakcji, a utworzone przez nią widmo dyfrakcyjne Fresnela jest rejestrowane za pomocą kamery wraz z obiektywem.

2.4. Pomiary mikroskopowe

W celu charakteryzacji morfologii kolonii poddanych działaniu wybranych czynników fizykochemicznych oraz próbki kontrolnej przeprowadzono pomiary za pomocą mikroskopu Nikon Eclipse 2000 pracującego w trybie transmisyjnym (obiektyw Nikon 4x).

2.5. Analiza widm dyfrakcyjnych

W celu przeprowadzenia analizy ilościowej zmian rozkładu przestrzennego natężenia widm dyfrakcyjnych Fresnela kolonii bakterii poddanych działaniu wybranych czynników fizykochemicznych zdecydowano się na zastosowanie algorytmów komputerowego przetwarzania informacji obrazowej przygotowanych w środowisku MATLAB®. Obszar widma dyfrakcyjnego został ograniczony przez dziesięć koncentrycznych, pierścieniowych stref, co zostało przedstawione na rysunku 3. Dla każdej ze stref wyznaczona została średnia wartość natężenia pikseli obrazu widma dyfrakcyjnego, która została wybrana jako dyskretna wartość opisująca natężenie światła ugiętego. Zmienność tej cechy w różnych strefach ograniczających widmo należy zatem traktować jako wskaźnik opisujący zmianę rozkładu przestrzennego widma dyfrakcyjnego kolonii wywołaną przez działający czynnik fizykochemiczny. W celu zbadania w jakim obszarze widma dyfrakcyjnego zachodzą największe zmiany natężenia światła ugiętego, przeprowadzono analizę wariancji wartości średniej natężenia pikseli w każdej ze stref ograniczających.

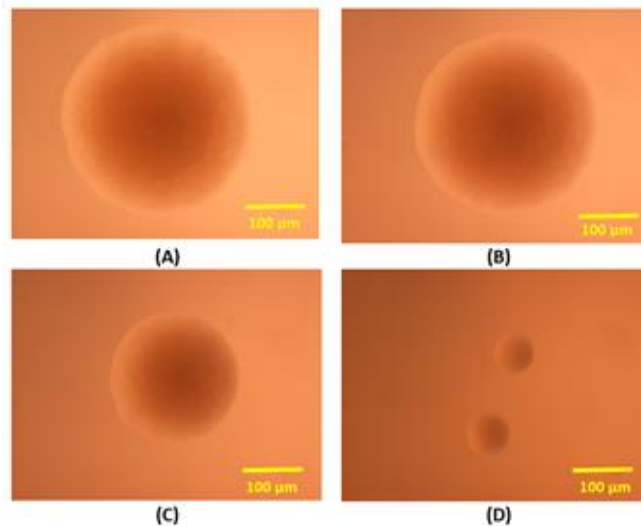


Rys. 3. Schemat podziału widm dyfrakcyjnych na strefy ograniczające

3. Wyniki

Poniżej przedstawione i omówione zostały wyniki zrealizowanych prac badawczych mających na celu wykazanie korelacji pomiędzy zmianami rozkładu przestrzennego widm dyfrakcyjnych kolonii bakterii a wybranymi czynnikami fizykochemicznymi hamującymi rozwoju tych kolonii.

Przykładowe obrazy mikroskopowe kolonii bakterii poddanych działaniu wybranych czynników fizykochemicznych zostały przedstawione na rysunku 4. W porównaniu do kolonii próbki kontrolnej, kolonie bakterii poddane działaniu wybranych czynników fizykochemicznych mają znacznie mniejsze rozmiary przestrzenne, co świadczy o spowolnieniu lub zahamowaniu rozwoju kolonii. W celu ilościowego porównania zmiany średnic kolonii poddanych działaniu tych czynników w stosunku do kolonii próbki kontrolnej, na podstawie obrazów mikroskopowych określone zostały rozmiary tych kolonii. Uzyskane wyniki pokazują, iż spośród wszystkich badanych czynników, największe ograniczenie średnicy kolonii miało miejsce w przypadku zastosowania promieniowania UV. Kolonie bakterii poddane działaniu tego promieniowania były o 64% mniejsze w stosunku do kolonii kontrolnej. W przypadku środka Skinsept® Pur oraz niskiej temperatury, średnica kolonii zmieniła się odpowiednio o 29% i 9%. Oznacza to, że największe zahamowanie rozwoju kolonii bakterii uzyskano dla promieniowania UV.



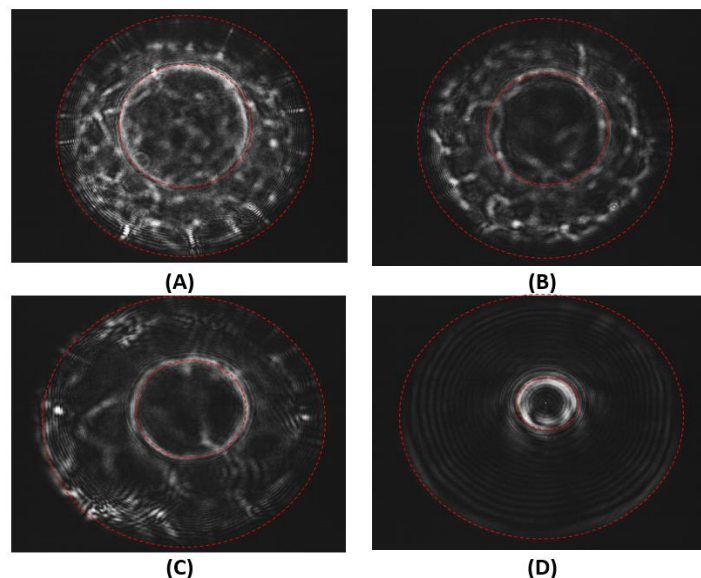
Rys. 4. Przykładowe obrazy mikroskopowe (obiektyw 4x) kolonii bakterii (czas inkubacji 23h): (A) kontrolnej, (B) poddanej działaniu niskiej temperatury 4 °C, (C) środka Skinsept® Pur, (D) promieniowania UV

Spowolnienie rozwoju kolonii bakterii prowadzi nie tylko do ograniczenia ich rozmiarów przestrzennych, ale również do zróżnicowania ich struktury wewnętrznej. Zmiana wielkości kolonii oraz ich struktury wpłynie na zmianę rozkładu przestrzennego generowanych przez nie widm dyfrakcyjnych Fresnela, które są ściśle skorelowane z cechami morfologicznymi kolonii [6, 17].

Na podstawie skalarnej teorii dyfrakcji, widma dyfrakcyjne Fresnela można wyrazić jako moduł

transformaty Fouriera funkcji przedmiotowej oraz dodatkowe członu fazy kwadratowej ściśle zależnego od odległości płaszczyzny obserwacji od płaszczyzny przedmiotowej. Dlatego też, biorąc po uwagę własności transformaty Fouriera, należy się spodziewać, że rozmiary przestrzenne widm dyfrakcyjnych kolonii bakterii poddanych działaniu badanych czynników fizykochemicznych również ulegną zmianom, gdyż powodują one zmianę wielkości kolonii. Zgodnie z twierdzeniem o podobieństwie lub skalowaniu transformaty Fouriera, zmiana rozmiarów poprzecznych funkcji przedmiotowej będzie prowadziła do odwrotnie proporcjonalnej zmiany widm fourierowskich, których szczególnym przypadkiem są widma Fresnela. W przypadku kolonii bakterii będzie się to przejawiać zmianą szerokości widma dyfrakcyjnego, odległości zewnętrznego pierścienia dyfrakcyjnego od wewnętrznego pierścienia widma kolonii bakterii, szerokością pierścieni i prążków dyfrakcyjnych oraz odległością między nimi.

Na rysunku 5 przedstawione zostały przykładowe widma dyfrakcyjne kolonii bakterii kontrolnej oraz poddanych działaniu badanych czynników fizykochemicznych. Widoczna jest zmiana rozkładu przestrzennego widm Fresnela kolonii próbki kontrolnej w stosunku do widm kolonii poddanych działaniu niskiej temperatury, środka Skinsept® Pur oraz promieniowania UV, chociaż były inkubowane na takim samym podłożu hodowlanym, w takiej samej temperaturze, przez taki sam czas. W przypadku widma kolonii kontrolnej widoczne są dwa główne pierścienie dyfrakcyjne w centrum i na obrzeżach widma. Wnętrze widma dyfrakcyjnego charakteryzuje się specyficzną „siateczkową” modulacją natężenia związaną ze strukturą wewnętrzną kolonii. Z kolei, w przypadku kolonii poddanych działaniu czynników fizykochemicznych, wraz ze zwiększającą się efektywnością ich działania tzn. hamowania rozwoju kolonii, a tym samym uzyskania kolonii o znacznie mniejszych rozmiarach przestrzennych, zwiększa się odległość pomiędzy dwoma głównymi pierścieniami dyfrakcyjnymi. Zauważyć można, że średnica centralnego pierścienia dyfrakcyjnego wzrasta wraz ze wzrostem średnicy kolonii, czyli jego wielkość, jest uzależniona od stadium rozwoju kolonii. Porównując widma kolonii poddanych działaniu badanych czynników fizykochemicznych z widmem kolonii kontrolnej, widoczny jest stopniowy zanik charakterystycznej „siateczkowej” modulacji natężenia widma dyfrakcyjnego. Warto podkreślić, że efekt ten wzmacnia się wraz ze wzrostem hamującego działania rozważanego czynnika.



Rys. 5. Przykładowe widma dyfrakcyjne Fresnela kolonii bakterii (czas inkubacji 23h):

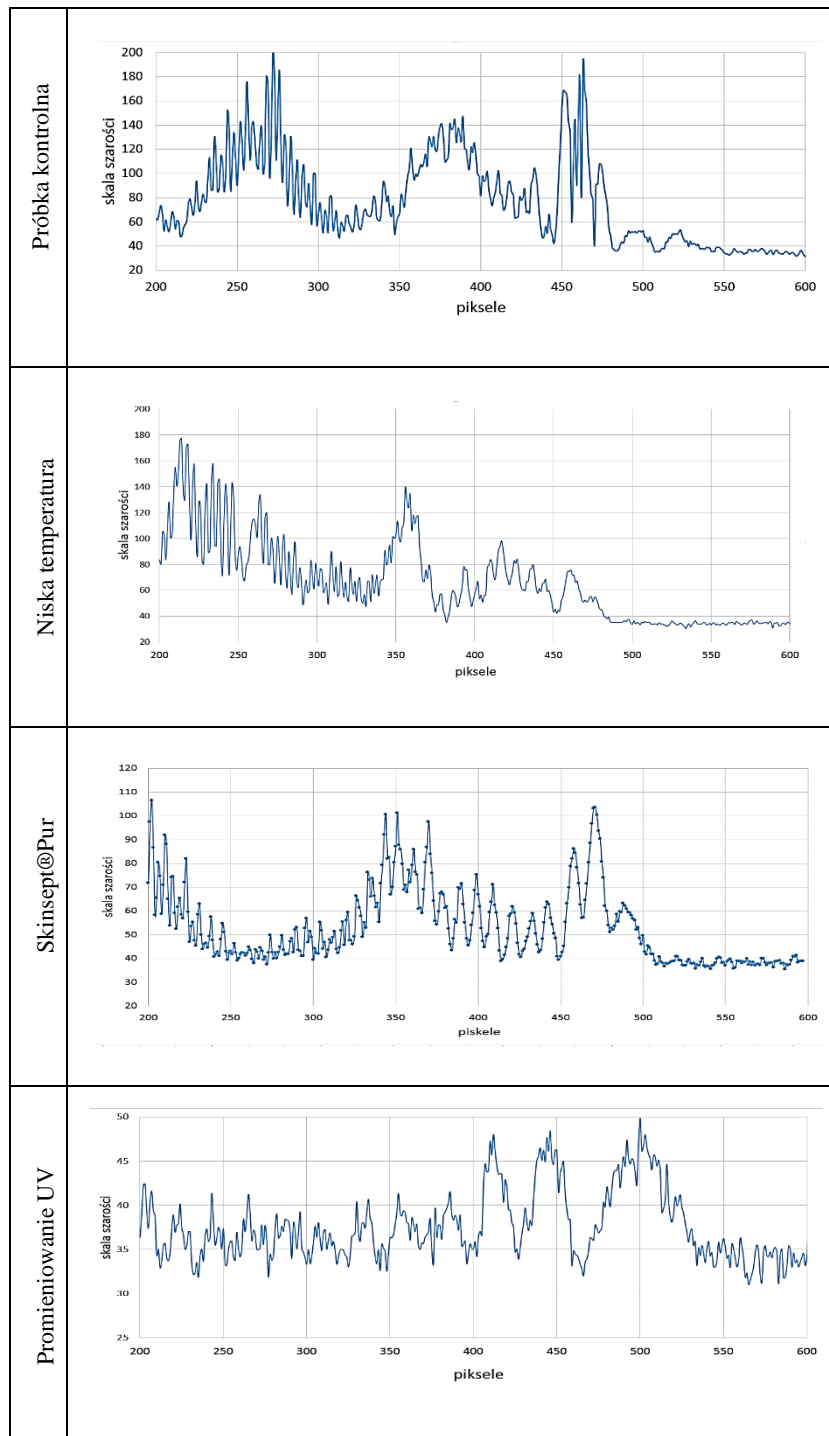
(A) kontrolnej, (B) poddanej działaniu niskiej temperatury 4 °C, (C) środka Skinsept® Pur, (D) promieniowania UV (czerwonymi przerywanymi liniami zaznaczone zostały główne pierścienie dyfrakcyjne)

W celu zbadania wpływu wielkości kolonii na szerokość prążków oraz odległości międzyprążkowe, wyznaczono profile natężenia widma wzdłuż poziomej linii pomiędzy dwoma głównymi pierścieniami dyfrakcyjnymi widm dyfrakcyjnych. Uzyskane wyniki (p. tab. 1) pokazują, iż w zależności od stadium rozwoju kolonii, czyli jej wielkości, zmienia się szerokość prążków interferencyjnych obecnych

w widmie dyfrakcyjnym oraz odległość międzyprążkowa. Im mniejsza jest średnica kolonii, tym szersze są prążki interferencyjne, a odległość między nimi wzrasta. Dodatkowo, widoczne są również obniżenie wartości natężenia widm dyfrakcyjnych, co może być wywołane obecnością martwych komórek bakterii wpływających na zmianę właściwości transmisyjnych samej kolonii, której rozwój został zahamowany.

Uzyskane wyniki świadczą o tym, że zmiany rozkładu przestrzennego widm dyfrakcyjnych kolonii są ściśle związane z ich stadium rozwoju strukturalnego, a efektywność działania różnego rodzaju czynników wpływających na ich rozwój może być scharakteryzowana dzięki analizie tych widm. Wraz z rozwojem kolonii bakterii wzrasta jej zróżnicowanie strukturalne, co przejawia się również w zmianach zachodzących w rozkładzie przestrzennym ich widm dyfrakcyjnych Fresnela.

Tabela 1. Profile prążków dyfrakcyjnych obecnych w widmie wyznaczone w kierunku osi X pomiędzy dwoma głównymi pierścieniami dyfrakcyjnymi

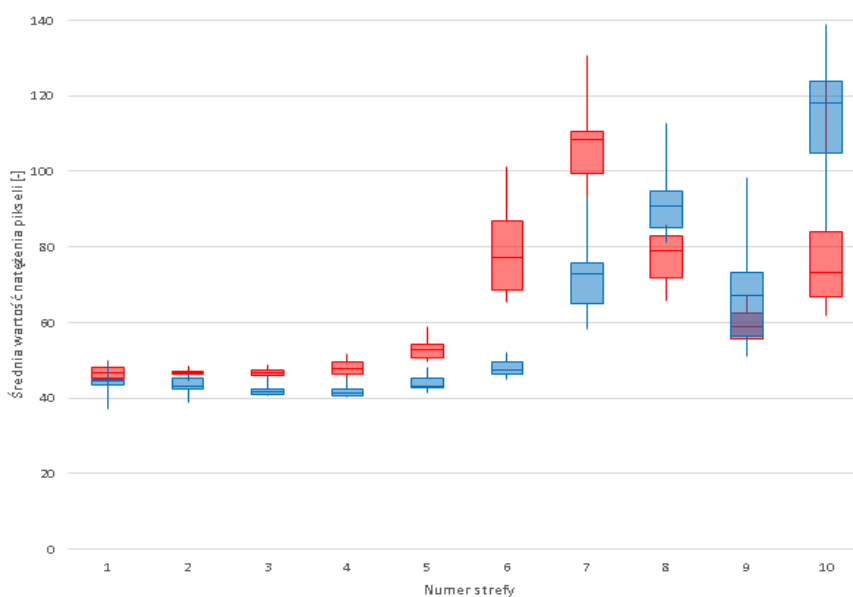


Na podstawie przeprowadzonej analizy jakościowej wpływu poszczególnych czynników bakterio-bójczych na badane kolonie gatunku *Yersinia* stwierdzono, iż dla promieniowania UV zaobserwować można największy stopień zmian struktury morfologicznej kolonii bakteryjnych oraz rozkładu przestrzennego zarejestrowanych widm Fresnela w stosunku do próbki kontrolnej. Chcąc jednak określić w ilościowy sposób efektywność wyróżnionego czynnika, mającego za zadanie neutralizację drobnoustrojów, oraz wyznaczyć obszary widm dyfrakcyjnych wykazujących największe różnice pomiędzy próbką kontrolną i poddaną działaniu czynnika bakterio-bójczego, zdecydowano się na dokonanie analizy ilościowej bazującej na porównaniu średnich wartości natężenia pikseli w określonych strefach ograniczających widmo dyfrakcyjne. Do celów analitycznych, z przeprowadzonego pomiarowego panelu czasowego, ze względu na najmniejsze wartości wariancji dotyczące rozważanych średnich w obrębie ośmiu serii rejestrowanych widm, wybrano kolonie bakteryjne w 26. godzinie od ich wysiania.

Tabela 2. Porównanie wartości średnich oraz odchylenia standardowego natężenia pikseli w poszczególnych strefach widm dyfrakcyjnych dla kolonii bakteryjnych próbki kontrolnej oraz poddanej działaniu promieniowania UV

Próbka	Parametr/Strefa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kontrolna	Wartość średnia	44,13	43,37	42,08	41,70	44,08	48,11	72,70	91,56	67,59	113,64
	Odch. st.	2,85	2,17	1,61	1,46	2,27	2,24	10,22	8,59	14,15	16,79
UV	Wartość średnia	46,71	46,70	46,70	48,03	52,90	79,31	107,61	77,29	59,43	78,35
	Odch. st.	2,08	1,15	1,21	2,15	2,67	11,96	13,19	7,25	4,51	17,80

W tabeli 2 zamieszczono dane dotyczące porównania wartości średnich oraz odchylenia standardowego natężenia pikseli w poszczególnych strefach analizowanych widm dyfrakcyjnych kolonii bakteryjnych próbki kontrolnej oraz poddanej działaniu promieniowania UV. Uzyskane wyniki demonstrują zauważalne różnice wartości wyznaczonych wielkości, które są szczególnie widoczne dla stref ograniczających od 5 do 10. Dla tych stref różnice wartości średniej pomiędzy próbką kontrolną i poddaną działaniu promieniowania UV sięgają nawet ponad 30 jednostek. Dla stref centralnych (1–5), wyznaczona cecha ilościowa (wartość średnia) przyjmuje z dokładnością do wartości odchylenia standardowego porównywalne wartości pomiędzy obiema próbkami, dlatego nie można w ich przypadku jednoznacznie wykazać wpływu działania promieniowania UV. Oznacza, to iż w centralnym obszarze widma zmiany wywołane jego działaniem są stosunkowo niewielkie w stosunku do widma próbki kontrolnej.



Rys. 6. Wykres typu pudełkowego dla wartości średnich natężenia pikseli w poszczególnych strefach widm dyfrakcyjnych dla próbki kontrolnej (kolor niebieski) i poddanej działaniu promieniowania UV (kolor czerwony)

Na rysunku 6 przedstawiono porównanie średniej wartości natężenia pikseli w poszczególnych strefach ograniczających serię zarejestrowanych widm dyfrakcyjnych badanych próbek (kontrolnej oraz poddanej działaniu promieniowania UV). Zauważyć można wyraźne rozbieżności potwierdzające tezę wysuniętą przy analizie ilościowej o dużym wpływie nadfioletu na rozkład przestrzenny widm fresnelowskich kolonii badanych bakterii. W przypadku niemalże wszystkich stref (z wyłączeniem dziewiątej) zestawienia reprezentujące dwie badane grupy próbek biologicznych nie nakładają się na siebie w obrębie wygenerowanych struktur pudełkowych, będących reprezentacją poszczególnych kwartyli dla konkretnych obserwacji wartości danych wyznaczonych numerycznych. Jedynie niektóre „wąsy” odpowiadające minimalnym oraz maksymalnym wartościom średnim natężenia pikseli w obrębie danego widma pokrywają się ze sobą, co potwierdza wcześniejsze wyniki analiz jakościowej. Tym samym, również przeprowadzona analiza ilościowa, pozwala na wykazanie różnic pomiędzy widmami dyfrakcyjnymi kolonii kontrolnych oraz poddanych działaniu badanego czynnika i w konsekwencji różnic w strukturze morfologicznej obserwowanych obiektów biologicznych.

Dodatkowo, w celu wykazania istotnych statystycznie zmian pomiędzy wartościami cech ilościowych widm dyfrakcyjnych wywołanych działaniem badanego czynnika zdecydowano się na przeprowadzenie jednoczynnikowej analizy wariancji, której wyniki zostały przedstawione w tabeli 3. W analizie jako hipotezę zerową przyjęto brak istnienia niepodważalnych rozbieżności pomiędzy poszczególnymi strefami zarejestrowanych widm dyfrakcyjnych reprezentujących badane grupy kolonii bakteryjnych. Oznacza to, iż hipoteza ta zakłada równość wartości średnich analizowanych cech ilościowych dla grup określonych przez poziom zmiennej niezależnej, zatem różnice pomiędzy, jak i w obrębie grup powinny być do siebie zbliżone, a więc ich wariancje, które są miarami wspomnianych różnic, również powinny być w tym przypadku do siebie zbliżone. W celu określenia zmienności cech ilościowych widm Fresnela kolonii wyznaczonych dla danych stref ograniczających pomiędzy serią pomiarów dla próbki kontrolnej oraz poddanej działaniu wybranego czynnika zastosowano statystykę Fishera–Snedecora. Jeżeli wartość obliczonej statystyki F jest większa od wartości krytycznej (Test F), wówczas można odrzucić hipotezę zerową na rzecz hipotezy alternatywnej o braku równości wartości średnich analizowanego parametru pomiędzy wydzielonymi grupami. Przeprowadzona statystyka w jednoznaczny sposób wykazała, że istnieją statystycznie istotne różnice w obrębie aż dziewięciu z dziesięciu wyznaczonych ówczynie obszarów ograniczających widma dyfrakcyjne.

Tabela 3. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji dla próbki kontrolnej oraz poddanej działaniu promieniowania UV (wartość średnia natężenia pikseli w poszczególnych strefach widm dyfrakcyjnych)

Numer strefy	F	p	Test F
1	4,84	4,12E-02	4,41
2	16,61	7,09E-04	
3	47,60	1,88E-06	
4	53,51	8,56E-07	
5	57,20	5,40E-07	
6	59,14	4,28E-07	
7	39,36	6,46E-06	
8	14,47	1,30E-03	
9	2,71	1,17E-01	
10	18,72	4,07E-04	

Zgodnie z zaprezentowanym wykresem pudełkowym, jedynie w przypadku strefy ograniczającej oznaczonej numerem 9, obejmującej peryferyjne obszary widma dyfrakcyjnego, ze względu na wartość prawdopodobieństwa większą niż ustalony próg ufności 0,05 oraz parametr F nieprzekraczający testowego (Test F), nie można wysunąć stwierdzenia o istotnej statystycznie wariancji analizowanych wartości średnich w jej obrębie. Poddając analizie pozostałe strefy ograniczające można stwierdzić, iż największe rozbieżności pomiędzy wartościami cech ilościowych widma uzyskiwane są dla stref oznaczonych numerami 6, 7 oraz 10. Zauważyć należy także, iż pomimo dość wąskiego zakresu

wartości w przypadku pierwszych pięciu stref ograniczających, można na podstawie przeprowadzonej dla nich jednoczynnikowej analizy wariancji, iż na skutek poddania kolonii działaniu promieniowania UV dochodzi do zmiany rozkładu przestrzennego widma fresnelowskiego tych kolonii. Uzyskane wyniki analizy statystycznej potwierdzają, zatem istnienie korelacji pomiędzy rozkładem przestrzennym widma dyfrakcyjnego a zmianami strukturalnymi kolonii bakterii spowodowanymi ekspozycją na działanie ultrafioletu oraz potwierdzają efektywności zastosowanego czynnika bakteriobójczego, który w sposób bezdyskusyjny wpływa na morfologię badanych obiektów o charakterze biologicznym.

4. Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych prac eksperymentalnych oraz uzyskanych wyników analizy jakościowej oraz ilościowej widm dyfrakcyjnych Fresnela kolonii poddanych działaniu wybranych czynników fizykochemicznych o działaniu bakteriobójczym, można stwierdzić, iż istnieje korelacja pomiędzy rozkładami przestrzennymi rejestrowanych widm dyfrakcyjnych a zmianami strukturalnymi kolonii bakteryjnych wywołanych działaniem rozważanych czynników: niskiej temperatury, alkoholu oraz promieniowania UV. Występujące w następstwie ich działania zmiany w rozmiarach średnic kolonii obserwowane na zdjęciach mikroskopowych są ściśle powiązane z cechami charakteryzującymi widma dyfrakcyjne, wśród których wyróżnić należy przede wszystkim ich szerokość, odległość pomiędzy prążkami dyfrakcyjnymi, czy też wzajemne położenie występujących w ich obrębie pierścieni dyfrakcyjnych. Przeprowadzone porównanie zmian cech ilościowych widm dyfrakcyjnych na przykładzie wartości średnich natężenia pikseli w poszczególnych strefach ograniczających widma, poparte jednoczynnikową analizą wariancji (ANOVA-1) pozwalają na potwierdzenie występowania statystycznie istotnych różnic pomiędzy wartościami średnimi natężenia pikseli w danym obszarach widma, znajdujących swoje bezpośrednie odzwierciedlenie w zmianach wielkości i struktury kolonii bakterii. Na ich podstawie możliwe jest także dokładne określenie efektywności działania danego czynnika biobójczego, którym – jak stwierdzono podczas prowadzonych badań laboratoryjnych - ze względu na największy stopień obserwowanych zmian, było promieniowanie UV. Uzyskane wyniki prac eksperymentalnych pozwalają zatem na zwiększenie funkcjonalności opracowanej metody pomiarowej, która oprócz identyfikacji określonych gatunków/szczepów bakterii, może być również wykorzystana do badania efektywności bakteriobójczego działania antybiotyków, a także innych środków bądź czynników.

LITERATURA

- [1] <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf#page=6>
- [2] <http://www.niaid.nih.gov/topics/antimicrobialresistance/documents/arstrategicplan2014.pdf>
- [3] <http://wiadomosci.wp.pl/title,Grozne-lekoodporne-bakterie-w-Polsce,wid,12870371,wiadomosc.html>
- [4] W. Hrynkiewicz, M. Gniadkowski: *Wytyczne postępowania w przypadku wykrycia szczepów pałeczek z rodziny Enterobacteriaceae wytwarzających karbapenemazy typu KPC (ang. Klebsiella pneumoniae carbapenemase)*, www.antybiotyki.edu.pl/pdf/KPCwytyczne20-09.pdf
- [5] <http://www.niaid.nih.gov/topics/antimicrobialresistance/documents/arstrategicplan2014.pdf>
- [6] I. Buzalewicz, A. Wieliczko, H. Podbielska: *Influence of various growth conditions on Fresnel diffraction patterns of bacteria colonies examined in the optical system with converging spherical wave illumination*, *Optics Express*, vol. 19(22), 2011, s. 21768–21785, doi.org/10.1364/OE.19.021768.
- [7] H. Podbielska, I. Buzalewicz, A. Suchwałko, A. Wieliczko: *Bacteria Classification by Means of the Statistical Analysis of Fresnel Diffraction Patterns of Bacteria Colonies*, *Biomedical Optics and 3-D Imaging*, Washington D.C.: OSA. 2012, s. BSu5A.5.1, doi:10.1364/BIOMED.2012.BSu5A.5.
- [8] A. Suchwałko, I. Buzalewicz, H. Podbielska: *Statistical identification of bacteria species*, [w]: Méndez-Vilas A, (red.) *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2013, s. 711–721.
- [9] A. Suchwałko, I. Buzalewicz, H. Podbielska: *Computer-based classification of bacteria species by analysis of their colonies Fresnel diffraction patterns*, *SPIE Proceedings*, vol. 8212, 2012, s. 82120R–82120R–13.
- [10] A. Suchwałko, I. Buzalewicz, H. Podbielska: *Identification of bacteria species by using morphological and textural properties of bacterial colonies diffraction patterns*, [w]: F. Remondino, M.R. Shortis, J. Beyerer, F. Puente León (red.). *Proceedings of SPIE: 87911M–1–87911M–7*, 2013, doi:10.1117/12.2020337.
- [11] A. Suchwałko, I. Buzalewicz, A. Wieliczko, H. Podbielska: *Bacteria species identification by the statistical analysis of*

- bacterial colonies Fresnel patterns*, Optics Express, vol. 21(9), 2013, s. 11322–11337.
- [12] A. Suchwałko, I. Buzalewicz, H. Podbielska: *Bacteria identification in an optical system with optimized diffraction pattern registration condition supported by enhanced statistical analysis*, Optics Express, vol. 22(21), 2014, s. 26312–26327, doi:10.1364/OE.22.026312.
- [13] I. Buzalewicz, H. Podbielska: *Sposób badania kolonii bakterii hodowanych na podłożach stałych i układ do badania kolonii bakterii na podłożach stałych*, patent krajowy nr PL 218 010 B1, 2012.
- [14] R. Straka, J. Stokes: *Metabolic Injury to Bacteria at Low Temperatures*, Journal of Bacteriology, vol. 78, 1959, s. 181–185.
- [15] L. Rose, H. O'Connell: *UV Light Inactivation of Bacterial Biothreat Agents*, Applied And Environmental Microbiology, vol. 75(9), 2009, s. 2987–2990.
- [16] M. Fletcher: *The Effects of Methanol, Ethanol, Propanol and Butanol on Bacterial Attachment to Surfaces*, Journal of General Microbiology, vol. 129, 1983, s. 633–641.
- [17] I. Buzalewicz, A. Wieliczko, H. Podbielska: *Wykorzystanie widm dyfrakcyjnych Fresnela w diagnostyce mikrobiologicznej*, Inżynieria Biomedyczna Acta Bio-optica et Informatica Medica, vol. 18(3), 2012, s. 213–219.

otrzymano / submitted: 30.01.2017
zaakceptowano / accepted: 01.03.2017