

ATP különböző biológiai rendszerekben

Intracelluláris ATP biolumineszcens meghatározásának új alkalmazási lehetőségei vörösvértetekben és mikrobiális rendszerekben

**Készítette: dr. Nagy Sándor
Témavezető: dr. Kőszegi Tamás**

Programvezető: Dr. Kellermayer Miklós

**Pécs
2006**

Rövidítések és nevezéktan magyarázat

ATCC	American Type Culture Collections, amerikai sejt kultúra gyűjtemény
ATP	adenozine -5'-triphosphate, adenzin-5'-trifoszfát
ATP- dnaA	ATP-t kötő dnaA fehérje
CCD	charge-coupled camera - CCD kamera
CPD	citrát-foszfát-dextróz
c.f.u.	colony forming unit, telepképző egység
FBS	fetal bovine serum, főtális borjúsérum
FMN	flavin mononucleotide, flavin mononukleotid
GOD/POD	glucose oxydase/ peroxydase, glükóz-oxidáz/peroxidáz
Hb	Hemoglobin
HEPES	N-(2-hidroxietil)-piperazin-N`-2-etánszulfonsav
HPLC	high performance liquid chromatography nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HPTLC	high performance thin layer chromatography, nagyhatékonyságú vékonyréteg kromatográfia
LDH	lactate dehydrogenase, laktát dehidrogenáz
MCV	mean corpus volume, átlagos vörösvértest térfogat
MDD	minimal detectable dosis, minimális detektálható dózis
MEM	Minimum Essential Medium, minimál táptalaj
MIC	Minimal Inhibitor Concentration, minimális inhibitor koncentráció
MTT	3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromid, dimetil-tiazolil-tetrazolium bromid
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide, nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát
NTP	nucleotide-triphosphate, nukleotid-trifoszfát
OD	optical density, abszorbancia, extinkció
OPLC	overpressure performance laminar chromatography, túlnyomásos vékonyréteg kromatográfia
PBS	phosphate buffer saline, foszfát pufferolt, fiziológiás nátrium-klorid
PCA	perchloric acid, perklórsav
TCA	trichloroacetic acid, triklórecetsav
TLC	Thin Layer Chromatography, vékonyréteg kromatográfia

biolumineszcencia	biolumineszcencia olyan kemilumineszcencia, amelynél a fényt kibocsátó folyamat, élő sejtekben vagy azokból izolálható rendszerekben játszódik le
BioAréna	optimális TLC (OPLC) és az optimált bioautográfia együttes megvalósítása
bioautográfia	A TLC rétegen elválasztott vegyületek biológiai hatását (mikrobák növekedését gátló vagy növekedését serkentő) eredetileg nem a TLC lemezen, hanem egy azzal érintkező agar gél rétegben levő mikrobákkal detektálják (agar diffúziós módszer). Ha in situ a TLC lemezen történik a detektálás) → direkt bioautográfiáról van szó
direkt bioautográfia	Az alkalmazott minta biológiai hatását közvetlenül a TLC lemezen tenyésztett mikrobák növekedés gátlásával vagy serkentésével detektálja)
dnaA	A replikáció startpontján a DNS-hez kötődő fehérje, mely elősegíti a kettős kötés fellazítását
kemilumineszcencia	olyan fénykibocsátási folyamat, amelynél a fényt kibocsátó rendszer kémiai reakció
luciferáz	Itt: szentjánosbogárból (firefly, <i>Photinus pyralis</i>) származó enzim, amely a biolumineszcens reakcióban a luciferin átalakulását katalizálja
luciferin	Itt: szentjánosbogárból (firefly, <i>Photinus pyralis</i>) származó enzim szubsztrát, amely fényt bocsát ki a biolumineszcens reakcióban

TARTALOM

RÖVIDÍTÉSEK ÉS NEVEZÉKTAN MAGYARÁZAT.....	2
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS.....	6
1.1 Általános bevezetés	6
1.1.1 Az ATP alapvető jelentősége a különböző biológiai rendszerekben	6
1.1.1.1 A vörösvérttest ATP, iongradiens és integritás összefüggésének kérdései	6
1.1.1.2 A direkt bioautográfia TLC lemezen levő tesztmikrobái és az intracelluláris ATP kapcsolata	8
1.1.2 Az ATP méréstechnika alkalmazási lehetőségei a különböző biológiai rendszerekben	11
1.2 Célkitűzések	15
1.2.1 Humán vörösvérttestek metabolikus aktivitásának fenntartásához szükséges minimális ATP mennyiség megállapítása	15
1.2.2 A direkt bioautográfia hatékonyságának növelése	16
1.2.2.1 Új alkalmazási terület: gyógyszer hatóanyag-leadás biológiai aktivitásának detektálása	17
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	18
2.1 Kémiai anyag hozzáadása nélküli ATP depléció megvalósítása és követése vörösvérttestekben	18
2.2 A jellemző metabolikus paraméterek követése a vörösvérttest ATP depléció során	18
2.2.1 A teljes vér jellemző paraméterei	18
2.2.2 A vörösvérttestek jellemző paraméterei	18
2.3 Mikrobiális ATP meghatározása optimális mikroba metabolikus aktivitás elérésére	19
2.3.1 Mikroorganizmusok és táptalajok	20
2.3.2 Vékonyréteg kromatográfia	20
2.3.3 Direkt bioautográfia optimalizálás megvalósítása ATP mérésén keresztül	21
2.3.3.1 Mintafelvétel és bioautogram készítés	21
2.3.3.2 Mikrobák metabolikus aktivitásának követése ATP méréssel a bemerítő mikroba szuszpenzióban	22
2.3.3.3 Mikrobák metabolikus aktivitásának követése ATP méréssel a TLC lemezeken	22
2.3.3.4 Szkenning elektronmikroszkópia	22
3. EREDMÉNYEK.....	25
3.1 Vörösvérttestek ATP depléciójának megvalósítása metabolikus folyamatokra ható vegyület hozzáadása nélkül	25
3.1.1 A vörösvérttest térfogat (MCV), víztartalom és ATP szint időbeli változásának összehasonlítása 4°C-on és 37°C-on	25
3.1.2 A metabolikus paraméterek (K ⁺ , Na ⁺ , Hb, ATP és glükóz koncentráció) időbeli változása 4°C-on a 110 órás inkubálási idő alatt	26

3.1.3 A metabolikus paraméterek (K^+ , Na^+ , Hb, ATP és glükóz koncentráció) időbeli változása 37°C-on a 110 órás inkubálási idő alatt	27
3.2 A direkt bioautográfia optimalizálása	30
3.2.1 Mozgó fázisok	30
3.2.2 Mikroba tenyésztés és a mikrobiális ATP változása	30
3.2.3 A maximális intracelluláris ATP és a log fázis, valamint ezek eléréséhez szükséges idők meghatározása	32
3.2.4 Mikrobiális ATP mérése abemerítő szuszpenzióban és a TLC lemezen	35
3.2.5 Bioautogram készítés	39
3.2.6 Tesztmikrobák optimális metabolikus aktivitása a direkt bioautográfiában	44
4. MEGBESZÉLÉS	49
4.1 ATP depléció vörösvértetekben	49
4.1.1 A 4 °C-on kapott eredmények értékelése	49
4.1.2 A 37 °C-on kapott eredmények értékelése	50
4.2 Direkt bioautográfia tesztmikrobái	51
5. ÖSSZEFOGLALÁS	58
5.1 Humán vörösvértetek ATP depléciója	58
5.2 Az ATP biolumineszcens mérése alkalmas módszer tesztmikrobák metabolikus aktivitásának követésére a direkt bioautográfia TLC rétegében is	58
5.3 Szkennung elektronmikroszkópos felvétel direkt bioautogramról	59
5.4 Új módszer gyógyszerek in vitro antimikrobás hatóanyagleadás biológiai aktivitás változás követésére	59
5.5 BioAréna™ : az optimális TLC (OPLC) és az optimált bioautográfia együttes megvalósítása	60
6. ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK	61
6.1 Ábrák	61
6.2 Táblázatok	62
7. IRODALOM.....	63
A témában megjelent saját publikációk jegyzéke.....	71
A témában megjelent saját publikációk, könyvfejezet, absztraktok impakt faktoros folyóiratban	74
A témán kívül megjelent publikációk jegyzéke	
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

1.1 Általános bevezetés

1.1.1 Az ATP alapvető jelentősége a különböző biológiai rendszerekben

A nukleotid-trifoszfátok (NTP), de különösen az ATP, a sejtek primer kémiai energiahordozója. Hasonló funkciót más nukleotidok is betölthetnek, de jelentőségük nem olyan általános, mint az ATP-é. Az ATP-t elsőként 1929-ben Lohmann izolálta izomból. A szerkezetét csak néhány évvel később tisztázták. Az ATP központi szerepét a sejtek energia-metabolizmusában, 1941-ben Lipmann fedezte fel [1,2], melynek jelentőségét mutatja, hogy ezért 1953-ban Nobel-díjat kapott. Ő vezette be a nagyenergiájú foszfátkötés fogalmát. 1948-ban Todd szintetizálta kémiailag. Az ATP nem egy kémiai energiát raktározó molekula, ezt a funkciót a szénhidrátok (pl. glükogén) és a zsírok töltik be. Ha a sejtnak energiára van szüksége, akkor a raktározó molekula felhasználásával ATP keletkezik. Az ATP energiát szállít a sejt különböző részeire.

1.1.1.1 A vörösvértest ATP, iongradiens és integritás összefüggésének

kérdései

Az ATP jelentősége jól ismert az energiafüggő életfolyamatokban. Az élő állapot egyik fontos mechanizmusa az extra- és az intracelluláris tér közötti iongradiens fenntartása, amely energiát igényel. Az intracelluláris iontartalom kiegyenlítődése a külső, környező térrel a sejt halálát jelenti. Ezen szoros kapcsolatok figyelembevételével kezdtük vizsgálatainkat.

Az ATP és az ATP-metabolizmus döntő szerepe a **keringő vörösvértestek** funkcionális és szerkezeti integritásának fenntartásában,

ma már aligha lehet kérdéses [3-5]. Ez akkor is így van, ha közvetlen (in vivo) adatok még alig állnak rendelkezésre. A közvetlen megfigyelések hiányára egyszerű a magyarázat: a 120 napos életidejű keringő vörösvértest-populáció sohasem homogén, mindig fiatalabb és idősebb, különböző ATP tartalmú vörösvértestek keveréke. Az in vitro vizsgálatok esetében a helyzet más. Ekkor is igaz, hogy a vörösvértestek fiatalabb és idősebb populációk keverékéből állnak, de mivel az in vitro inkubálás alatt a sejtek kor szerinti eloszlása nem változhat meg, az ATP tartalommal párhuzamosan mért paraméterek újabb betekintést adhatnak még fel nem derített összefüggésekbe, vagy bizonyítékokkal szolgálhatnak az ATP szerepére a vörösvértestek szerkezeti és funkcionális integritásának fenntartásában.

A rendelkezésre álló sok adat ellenére nem tisztázott, hogy humán **vörösvértestek életfolyamatainak fenntartásához minimálisan mennyi ATP-re van szükség**, illetve hogyan viselkednek a vörösvértestek a kritikus minimális ATP tartalom közelében. Még alig ismert az ATP szerepe a sejtintegritás fenntartásában. A vörösvértest ATP szintje és más metabolikus paraméterei közötti kapcsolatok egyidejű változásának fényt deríthet az említett probléma jobb megértéséhez.

1.1.1.2 A direkt bioautográfia TLC lemezen levő tesztmikrobái és az intracelluláris ATP kapcsolata

Korábbi kutatásaink során különféle vegyületek **antimikrobás hatását teszteltük** az ún. direkt bioautográfia segítségével. Az 1. ábra bemutatja az antimikrobás hatással rendelkező természetes anyagok tesztelési módszerei között a bioautográfia helyét és ezen belül a vékonyréteg kromatográfiát is alkalmazó direkt bioautográfiát. Kezdetben a bioautográfiát papírkromatogramokon, majd adszorbens (pl. szilikagél) rétegen levő antibiotikumfoltok kimutatására használták [6-9].

A **direkt bioautográfia** a vékonyréteg kromatográfia (TLC) egy detektálási módszere, amelyben az adott anyag antimikrobás (vagy más biológiai) hatását tesztmikrobák segítségével mutatjuk ki, míg a TLC hagyományos detektálási módszerei fizikai kölcsönhatáson vagy kémiai reakciókon alapulnak. A direkt bioautográfiában a biológiai válasz lehet: toxicitás, mutagenitás, sejtalkotók növekedésének gátlása, enzimgátlás stb.[10]. A direkt bioautográfiát ma is széles körben alkalmazzák **antimikrobás hatás** tanulmányozására [10-14].

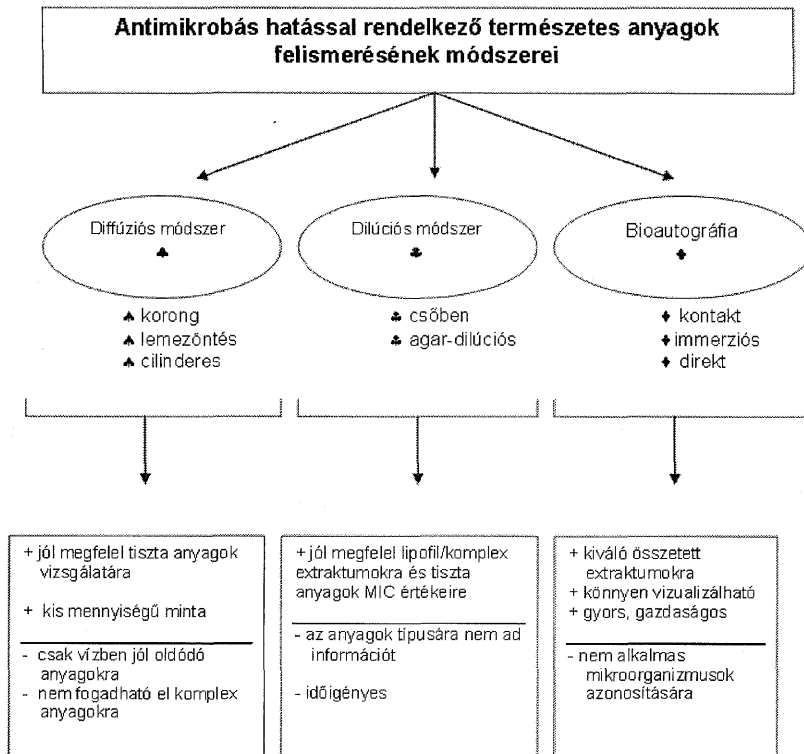
Az antimikrobás hatáson kívül ezt a módszert számos **más fontos területen is** felhasználják. Gondoljunk a TLC lemez, élő mikrobák és a tápfolyadék kapcsolatrendszer bármelyikének változtatásából adódó sokféle lehetőségre!

Például baktériumok és mutánsaik **bioszintézis útjainak** vizsgálata (tiamin-pirofoszfát szintézis útjait tanulmányozták) [15]. Ebben az esetben például tiamin-monofoszfát vagy tiamin-pirofoszfát-tartalmat és ezek keletkezési sebességét vizsgálták bioautográfiás módszerrel.

Egy másik lehetőség arginoszuccinát-liáz (EC 4.3.2.1), egy emlős **enzim specifikus vizualizálása** gél elektroforézis után, mutáns baktériumok segítségével [16]. Az arginoszuccinát-liáz enzim elektroforézis után a rendelkezésre bocsátott arginoszuccinát szubsztrátból arginint állít elő és az enzim közelében keletkezett arginint egy arginin-igényű *E. coli* törzs a saját növekedéséhez használja fel (baktérium proliferáció). Ez vizuálisan láthatóvá válik. A bioautográfia kiválóan bevált izoenzimek vizualizálására [17]. A bioautográfia további széleskörű alkalmazására az irodalomban számos lehetőséget találunk [18-23].

A TLC az egyetlen kromatográfiás eljárás, amely az egyes komponensek elválasztása után in situ antimikrobás hatást képes detektálni.

A vizsgálandó összetett anyag TLC lemezen történt elválasztása után, mikrobákat viszünk a TLC lemezre (lemezek bemerítése mikroba szuszpenzióba). Így az elválasztás helyszínén (in situ) megy végbe a mikrobák gyorsított vagy lassított szaporodása (attól függően, hogy a TLC lemezen növekedést serkentő vagy gátló komponenssel találkoznak).



1. ábra. Az antimikrobás hatással rendelkező természetes anyagok kimutatásának módszerei

Antimikrobás vegyületek tesztelése során kezdetben hagyományos, egy éjszakán át tenyésztett (ún. post-log fázisú) baktériumokkal dolgoztunk. Ezzel a módszerrel nem vesszük figyelembe, hogy a különféle baktériumok életképessége, szaporodási sebessége egymástól lényegesen különböző. Korábbi kísérleti tapasztalataim alapján, - melyeket a vörösvértest intracelluláris ATP mérések során szereztem - arra gondoltam: mivel a mikrobák életképesség változása intracelluláris ATP szint mérésével követhető és a különféle mikrobáknak különböző az életképessége, így megvizsgálható, hogy milyen inkubációs idő és más paraméter a legelőnyösebb a TLC lemezekten tenyésztett egyes tesztmikroba féleségek számára.

A TLC lemezekten való mikroba tenyésztés csak a bioautográfia történetének későbbi szakaszában valósult meg s ez a módszer még nem

veszi figyelembe, hogy a direkt bioautográfiás képet befolyásolja-e: a TLC lemezeken levő élő és az elpusztult mikrobák aránya, valamint a mikrobákból származó metabolikus vegyületek mennyisége.

A tesztmikrobák életfeltételeit a TLC lemezeken alig vizsgálták. Ez azért fontos, mert a mikrobák az új életkörülmények között (pl. szilikagél rétegben) másként viselkednek, mint a megszokott tenyésztési feltételek (pl. agar gél) mellett. Régebben hosszú ideig kizárólag az agar gélt tekintették az egyetlen lehetséges közegnek a mikrobák számára a bioautográfiában (agar overlay és egyéb technikák). Amíg az egyik közegben (pl. agar gél) a mikrobatenyésztés folyt, a másikban (pl. szilikagél) a kémiai anyagok elválasztása. Így a hagyományos bioautográfia esetén csak diffúzió útján (a szilika gélből az agar gélbe) jöhetett létre a kémiai anyagok és a mikrobák találkozása. Ezért kisebb érzékenységet, elmosódott gátlási zónahatárt lehetett elérni. Mindezekon túl a lassú diffúzió miatt hosszú volt a TLC lemezek inkubálási ideje. Mivel az ilyen TLC lemez inkubálások nedves atmoszférában történnek, sok esetben a leázó TLC rétegek miatt el sem lehetett végezni a direkt bioautográfiás meghatározást (pl. cellulóz, poliamid stb. réteg).

1.1.2 Az ATP mérés technika alkalmazási lehetőségei a különböző biológiai rendszerekben

Számos területen alkalmazzák az ATP meghatározást. Mérésére minden olyan enzimátikus reakció szóba jön, amelyben ATP termelés vagy felhasználás történik. Közvetett úton lehetséges baktériumok, gombák és más mikroorganizmusok „mérése” élelmiszerekben, italokban,

kozmetikumokban, vízben, gyógyszeripari termékekben stb. Figyelembe kell venni, hogy minden mikroba tartalmaz ATP-t, de nem mindegyik szaporodik az adott idő és környezeti paraméterek mellett. Az iparban különféle edények, felületek mikrobiológiai szennyezettségének meghatározására is használják.

Bár az ATP-t kromatográfiás, radioizotópos és enzimatis technikákkal is el lehet választani és detektálni, mégis a leggyorsabb, érzékeny és reprodukálható a szentjánosbogár (firefly, *Photinus pyralis*) biolumineszcencia módszer. Lumineszcencia az összefoglaló neve minden olyan fénykibocsátási folyamatnak, amelynél a fényt kibocsátó rendszer nem a magas hőmérséklet, hanem egyéb okok (pl. kémiai reakció – kemilumineszcencia, előzetes fénybesugárzás stb.) következtében világít [24]. Az intracelluláris ATP mérések alapját jelentő biolumineszcencia olyan kemilumineszcencia, amelynél a fényt kibocsátó folyamat, élő sejtekben vagy azokból izolálható rendszerekben játszódik le [25].

ATP + D-luciferin + O₂ $\xrightarrow{\text{luciferáz / Mg}^{2+}}$ AMP + pirofoszfát só+ CO₂ + oxiluciferin + fény.

Jelenleg is intenzív kutatások folynak ezen a területen. Az egyik újabb eredmény szerint a luciferázban (szentjánosbogár, firefly, *Photinus pyralis*) egyetlen aminosav helyettesítése megváltoztatja a biolumineszcencia során emittált fény színét [26]. Ilyen spektrális változást más luciferáz (*Luciola cruciata*) esetén a közelműtben közöltek [27].

Strehler [28], Lundin [29] és McElroy [30] munkássága, új fejezetet nyitott a biolumineszcencia ATP mérés történetében. Ennek oka a foton számlálás alkalmazása, valamint a módszer rendkívüli érzékenysége

(gyakorlatilag már egyetlen ATP molekula mérhető, érzékelhető!). Habár maga a módszer megfelelő felszereléssel könnyen kivitelezhető, a különböző biológiai mintára a mintaelőkészítést külön-külön kell kidolgozni. A sejtekben levő nukleotidok meghatározására ismert módszereket Hastings foglalta össze [25]. A biolumineszcens ATP mérések elterjedt alkalmazását láthatjuk példaként egy a környezetvédelemmel kapcsolatos összefoglalásban [31].

Az előbbi fejezetekben vázolt problémák (1.1.1.1. fejezet: vörösvértest ATP és integritás; 1.1.1.2. fejezet: direkt bioautográfia tesztmikrobái) tanulmányozása az intracelluláris ATP mérés szükségességét hozták.

A sejtekben leggyakrabban mért nukleotid az ATP, mert alapvető a szerepe a sejtek energiaháztartásában és aránylag nagy mennyiségben van jelen [32]. Nincs olyan mintavételi technika a világon, amely gyorsabb, mint az ATP turnover sebessége. Következésképpen az intracelluláris ATP kvantitatív mérése csak akkor pontos, ha a mintavétel folyamán konstans feltételeket biztosítunk [32].

Az ATP alapvető szerepe miatt a különböző biológiai rendszerek (vörösvértestek, mikrobák) ATP tartalma megváltozik a külső körülmények (tápanyag koncentráció, hőmérséklet stb.) hatására. Ezt az ATP-szint változást az újabb intracelluláris ATP mérési módszerek képesek követni.

Az ATP szint mérése az egyik legjobb módszer eukarióta sejtek és baktériumok életképességének követésére [33, 34]. Több kutató sejtkárosító ágensek hatását vizsgálta sejtek életképességére, ezek az ún. „chemosensitivity” tesztek, melyek egy része az ATP szint mérése

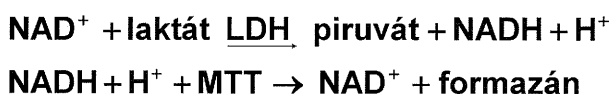
alapján működik [35-37]. Létezik azonban dehidrogenáz enzim segítségével működő, MTT-t alkalmazó „chemosensitivity” teszt [38] is.

A 2. ábrán (lásd 17.o.) a különféle vegyületek toxikológiai hatásának néhány, TLC lemezen történő közvetlen detektálási lehetőségét mutatom be [39-41].

Ezen vegyületek egyik része az életfolyamatokban fontos enzimek gátlása révén hat /in vitro egy enzimet alkalmazva (pl. kolineszterázok [39, 40], xantin-oxidáz [41]) vagy in vivo, mikrobában levő enzim gátlását felhasználva (pl. dehidrogenáz) /.

A károsító vegyületek másik része in vivo, közvetlen a mikroorganizmusok metabolikus aktivitására hat és ez a gátlás a természetesen meglévő biolumineszcenciát csökkenti. Ez utóbbi az ATP szint változásának csaknem direkt, in situ detektálását valósítja meg.

Fontos megjegyeznünk, hogy a direkt bioautográfias módszerben használt mikrobák optimális létfeltételeinek meghatározásához biolumineszcens ATP mérést alkalmaztunk. Ezután a meghatározott paramétereket felhasználva sorozatos mérésre, a költségeket is tekintve a 2. ábrán közepén található mikroba dehidrogenázos (DH) - MTT rendszert használtuk. Ez utóbbi, MTT-vel történő dehidrogenáz aktivitás detektálás elve:

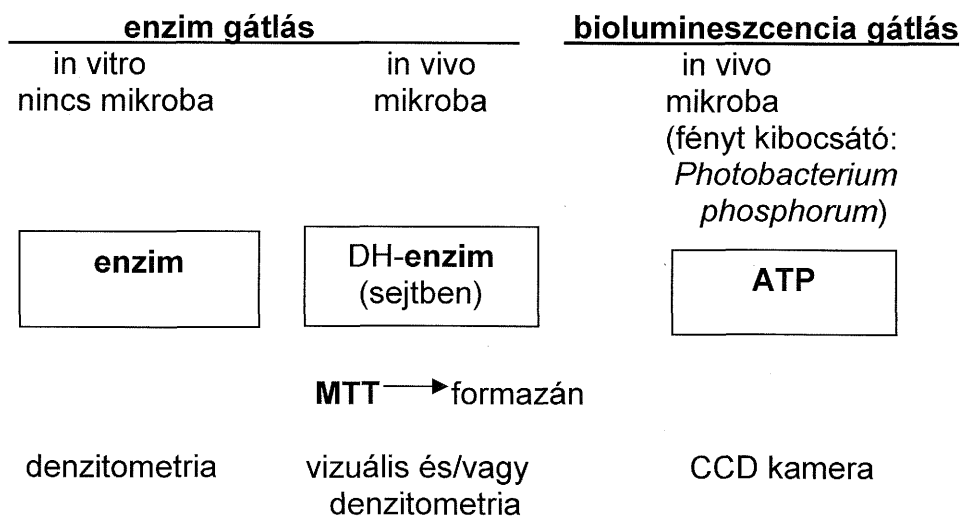


A reakció alapjairól [42-44] és mikrobiális alkalmazásáról [45, 46] az irodalom eligazít.

Itt hangsúlyozom, hogy a direkt bioautográfias detektálás során a mikrobában levő enzim (laktát-dehidrogenáz) gátlását detektáljuk MTT-vel. Ugyanakkor a mikrobák metabolikus aktivitását az ATP segítségével

tudtuk optimalizálni (érzékenyebb változásokat jelez az ATP, mint az MTT enzimgátlás [47]).

Ez az ATP mérés azonban nem cserélhető fel a biolumineszcenciát mutató mikrobák életfolyamatainak közvetlen gátlásával (2. ábra 3. oszlopa).



2. ábra. Toxikus anyagok TLC lemezekén történő néhány detektálási lehetősége

1.2 Célkitűzések

1.2.1 Humán vörösvértetek metabolikus aktivitásának

fenntartásához szükséges minimális ATP mennyiség

A rendelkezésre álló számos adat ellenére nem tisztázott, hogy a vörösvértetek életképességének fenntartásához (pl. a nátrium-ionok és kálium-ionok egyenlőtlen ionmegoszlás mechanizmusához), minimálisan mennyi ATP-re van szükség, illetve hogyan viselkednek a sejtek a kritikus

minimális ATP tartalom közelében. Ezért **elhatároztuk**, hogy az ATP és vörösvértest integritás közötti kapcsolat tanulmányozására, olyan **ATP depléciós modellt** hozunk létre **humán vörösvértestekkel**, amelyben külön **kémiai anyag hozzáadása nem** feltétlenül szükséges az ATP depléció létrehozásához. Így próbáltuk minimálisra csökkenteni a külső beavatkozás okozta zavaró hatásokat.

1.2.2 A direkt bioautográfia hatékonyságának növelése

Célunk a vékonyréteg kromatográfiával elválasztott vegyületek antimikrobás aktivitásának detektálását (direkt bioautográfia) megbízhatóbbá, érzékenyebbé, és a lehető leggyorsabbá tenni. Ennek érdekében, alaposan megvizsgáltuk a **direkt bioautográfia hatékonyságát befolyásoló tényezőket**:

- a.) a vékonyréteg kromatográfiás **adszorbensek** alkalmasságát előnyös és nem előnyös körülmények között,
- b.) a vékonyréteg kromatográfiában **mozgófázisként** elterjedt oldószerek alkalmasságát,
- c.) a különféle **mikroorganizmusok** (baktériumok, gombák) **metabolikus aktivitását** a TLC lemezen levő mikrobák optimális életfeltételeinek biztosítása érdekében,
- d.) a TLC lemezeken történő tenyésztés **inkubációs idejét**, vajon jelentősen különbözik-e az egyes mikroba típusok esetében.

Amennyiben sikerül megvalósítani a mikrobák intracelluláris ATP mérését a TLC lemezeken, úgy információt szerezhethünk a TLC lemezen használatos tesztmikrobák életkörülményeiről, és ezzel a módszer tökéletesíthető.

1.2.2.1 Új alkalmazási terület: gyógyszer hatóanyag-leadás biológiai aktivitásának detektálása

A gyógyszerkészítmények hatóanyag-leadása az egyik legfontosabb biofarmáciai információ. Ha antibiotikumok esetében a kioldódott **hatóanyag mennyiségét**, hagyományos módon (közvetlen spektrofotometriás UV vagy HPLC elválasztást követő UV detektálással) határozzák meg, akkor **nem képesek követni** egy másik fontos paramétert, **a biológiai aktivitás időbeni változását**. Célul tűztük ki intézetünkben (Gyógyszertechnológiai Intézet) új, **mikrobiológiai detektálással végezhető gyógyszer-hatóanyag kioldódásvizsgáló módszer (microbiologically detected dissolution) kidolgozását**.

2. Anyagok és módszerek

2.1 Kémiai anyag hozzáadása nélküli ATP depléció megvalósítása és követése vörösvértestekben

A frissen vett CPD-s (citrát-foszfát-dextróz) vért [48] két részre osztva inkubáltuk, az egyik részt 37°C-on, a másik részt 4°C-on tartottuk 110 órán át. A steril feltételeket fenntartva homogenizálás után 12 óránként mintát vettünk, ezeket két részre osztottuk. A sterilitást inkubálás után ellenőriztük.

2.2 A jellemző metabolikus paraméterek követése a vörösvértest ATP depléció során

2.2.1 A teljes vér jellemző paraméterei

A teljes vér egyik részletéből vörösvértest számot (CellDyn 3500, Abbott) és a pH-értéket (ABL 300 Radiometer Copenhagen, Denmark), vércukrot (3 %-os TCA kicsapás után glükóz oxidáz-peroxidáz (GOD / POD) módszerrel), teljes Na^+ -, K^+ -szintet lángfotometriával, ATP szintet biolumineszcens módszerrel mértünk. A plazma hemoglobint és a teljes vér hemoglobint, módosított Drabkin módszerrel (Moore [49]) határoztuk meg.

2.2.2 A vörösvértetek jellemző paraméterei

A másik részletet centrifugáltuk és a plazmából, valamint a vörösvértetekből hasonló paramétereket határoztunk meg, mint a teljes vérből. A nátrium-, kálium-ion koncentráció méréseket lángfotometriával, külső standard és kontroll szérum felhasználásával (Eppendorf EFOX 5053), az ATP méréseket biolumineszcens, belső standard addíciós

módszerrel (Berthold Luminométer Biolumat LB 9505 és Berthold Lumat LB 9507, Germany) végeztük [50-52].

A vörösvértest nátrium-, kálium-, és víztartalmának meghatározására kétlépcsős centrifugálást alkalmaztunk. Először a plazma szupernatant és buffy coatot választottuk el. A pellet vörösvértesteket második, 10 min, 16000g centrifugálással tömörítettük. Ezt követően a tömörített vörösvértestek 1-2 mm-es felületi rétegét egy finom pipettával távolítottuk el. A nedves tömeget analitikai mérlegen mértük. A sejteket vákuumszárítóval (Savant speed vacuum SC – 110) szárítottuk, majd ismételten mértük a tömeget. A nedves és száraz tömeg különbségéből kaptuk a vörösvértest víztartalmát. A szárított pellet vörösvértesteket 1 M HCl-val 24 órán át extraháltuk. A Na^+ , K^+ , glükóz és ATP koncentrációméréseket az előzőekben leírtak szerint végeztük.

2.3 Mikrobiális ATP meghatározása optimális mikroba metabolikus aktivitás elérésére

E módszert részletesebben bemutatom a 3. ábrán. Két TLC lemezre visszük fel a mintát. Mind a kettőt egyformán futtatjuk (Ha szükség van elválasztásra. Futtatás nélkül is dolgoztunk, ha nem cél az elválasztás vagy ha egy komponenst vizsgáltunk.). Az egyik lemezt hagyományosan kémiai detektálásra visszük. A másik TLC lemezt az előzetesen előkészített (növesztés, $\text{OD}_{600\text{nm}}$ mérés) mikroba szuszpenzióba merítjük, majd 37°C-os pára kamrában inkubáljuk. A TLC lemezeket MTT-oldatba merítjük és ismételten 37°C-os pára kamrában inkubáljuk. Az inkubálások időtartama mikrobától függően különböző. Az inkubálások végén a

rétegek 70%-os etanolos mosása, szárítása, valamint értékelése, archiválása történik.

2.3.1 Mikroorganizmusok és táptalajok

A teszt mikroorganizmusok az amerikai törzsgyűjteményből (American Type Culture Collection - ATCC) származnak: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Escherichia coli* (ATCC 25922). Ezek reprezentatív Gram-pozitív vagy Gram-negatív törzsek. A gombák közül *Candida albicans-t* (ATCC 90028) használtunk. A baktériumokat Mueller-Hinton táptalajon (pH=7,3±0.2) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 6-8 órán keresztül tenyésztettük, 37°C-os rázótenyészet alkalmazásával.

A csíraszámot kétféle módon határoztuk meg:

- fotométerrel, 600 nm-en turbidimetriás méréssel (OD_{600nm})
- tenyésztéssel, c.f.u. (colony forming unit): 10 - 10 µl mikroorganizmus minta szuszpenziót 1 - 1 ml fiziológias sóoldatban 100x-ra hígítottunk. Minden egyes csőből 10 - 10 µl -t Mueller - Hinton agarra vittünk, 24 órán át, 37°C-on inkubáltuk, majd a hígítást figyelembe véve meghatároztuk a kolóniák számát.

2.3.2 Vékonyréteg kromatográfia

Az alkalmazott TLC állófázisok:

(10x10 cm-es TLC lemezeket használtunk)

- a.) TLC DC-Alufolien Silica Gel 60 F₂₅₄ (Art. 5554. Merck. Darmstadt, Germany).
- b.) DC-Alufolien Polyamid 11 F₂₅₄ (Art. 5555, Merck),

- c.) HPTLC-Alufolien Cellulose (Art.16092),
- d.) DC-Alufolien Aluminiumoxid 60 (Art. 5550 semleges),
- e.) HPTLC-Alufolien Kieselgel 60 (Art. 5547, Merck),
- f.) HPTLC Fertigplatten RP - 2 F₂₅₄ (13726, Merck).

Megvizsgáltuk, hogy milyen vegyületek alkalmazása jöhet szóba direkt bioautográfiára, azaz milyen mikrobakárosító hatása van a TLC során szokás szerint alkalmazott vegyületeknek. Ezért a vékonyréteg kromatográfiában széles körben alkalmazott mozgófázisok (metanol, etanol, etilacetát, kloroform, aceton, toluol, tetrahidrofurán), továbbá néhány egyszerű adalékvegyület (sósav, kénsav, ecetsav, ammónium-hidroxid) mikrobaéletképességre gyakorolt hatását teszteltük: nem okoznak-e önmagukban alkalmazva gátlási zónát. A mozgófázisokból 5 és 10 µl-t vittünk fel a TLC lemezre, az adalékvegyületekből 5 és 10 µl 5% koncentrációjú vizes oldatot. Ezeket a lemezeket szárításuk után a szokásos bioautográfias eljárással kezeltük.

2.3.3 Direkt bioautográfia optimalizálás megvalósítása ATP mérésén keresztül

2.3.3.1 Mintafelvitel és bioautogram készítés

A 0.01-100ng cefazolint közvetlenül, kifejlesztés nélkül cseppentettük fel és melegítés nélküli légáramban, szobahőmérsékleten szárítottuk be a TLC lemezeken. A tesztmikroba-szuszpenzióba mártva a lemezeket 37°C-on inkubáltuk különböző ideig (néhány órától 12 órán át), majd MTT-be mártás után egy órán keresztül inkubáltuk azokat ugyanazon a hőmérsékleten. Az inkubálást követően 70%-os etanolba

merítettük a lemezeket. A keletkező bioautogramot fénymásoltuk ill. képét szkenneléssel (HP Desk Scan II) számítógépbe vittük.

2.3.3.2 Mikrobák metabolikus aktivitásának követése ATP mérésel a bemerítő mikroba szuszpenzióban

A mikroba számot OD_{600nm} turbidimetriás mérésel követtük, de meghatároztuk táptalajon a c.f.u. értékeket is (lásd a 2.3.1 részben). Különböző mennyiségű cefazolint vittünk fel a TLC lemezekre. Az eredeti bemerítő mikroba-szuszenzió ATP és fehérjetartalmát határoztuk meg. A bemerítő mikroba-oldatból vettünk mintát biolumineszcens ATP mérésre [53-56], majd külön mértük a fehérjetartalmát protein festékkötési módszerrel [57].

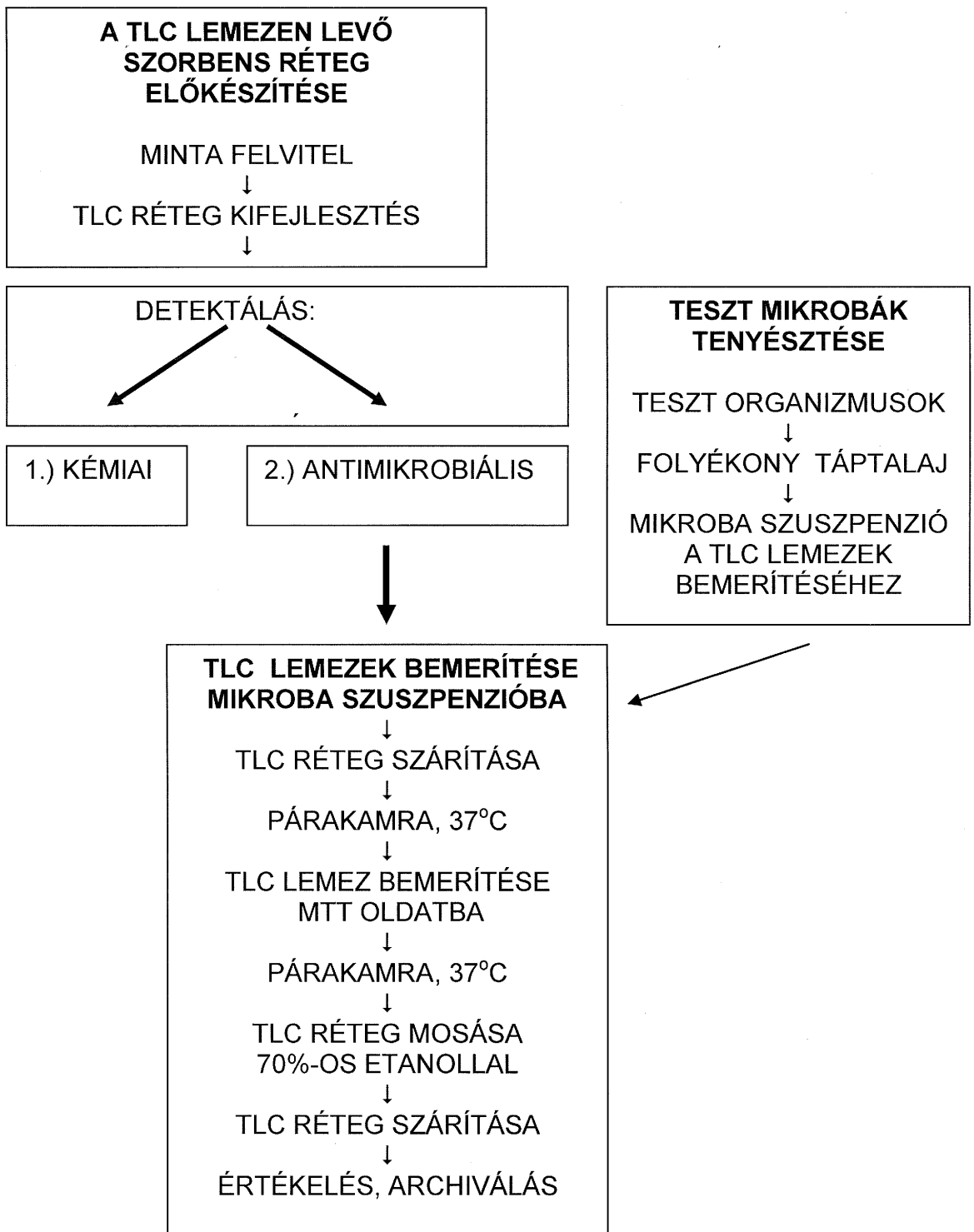
2.3.3.3 Mikrobák metabolikus aktivitásának követése ATP mérésel a TLC lemezeken

A szilikagél egy részét (6 cm^2) lekapartuk. $0,5\text{ cm}^3$ hideg, 7% PCA-t adtunk a lekapart mintához és 30 s-on belül -70°C -ra lefagyasztottuk. ATP- [54, 56] és protein- [57] -tartalmat mértünk a mintákból az előző rész végén említett módszerekkel.

2.3.3.4 Szkenning elektronmikroszkópia

A TLC lemezeken levő mikrobákat 2,5%-os glutáraldehid vizes oldatával fixáltuk és acetonnal majd levegőáram segítségével szárítottuk

[58, 59]. A minták kezelése JEOL Fine Coat (Ion Sputter JFC -1100) készüléssel történt. Az elektronmikroszkópos képeket JEOL JSM 6300 szkennig elektronmikroszkóppal készítettük.



3. ábra. A direkt bioautográfia megvalósítása

3. Eredmények

3.1 Vörösvértetek ATP depléciójának megvalósítása metabolikus folyamatokra ható vegyület hozzáadása nélkül

Létezik-e szoros összefüggés a vörösvértetek ATP depléciója és integritása között? A kérdés megválaszolásához vörösvértest-modell rendszert készítettünk. Az intra- és extracelluláris változások kinetikájának monitorozása ATP depléció során alkalmas modell az ATP függő életfolyamatok tanulmányozására. A kinetikai görbe az ionkiáramlás és ATP csökkenés közötti összefüggésbe engedett bepillantást.

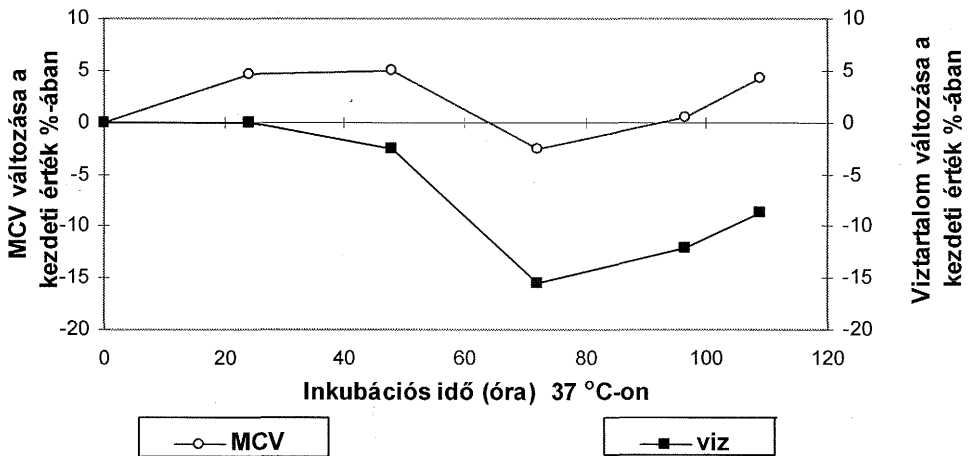
Modellünkben a vörösvérteteket néhány napon át saját plazmájukban inkubáltuk, egyik részét 4 °C-on, másik részét 37 °C-on.

Metabolizmust befolyásoló vegyület hozzáadása nélkül csökkentettük az intracelluláris ATP-t 37°C-on. Ezt a különbséget határozottan ki kell hangsúlyoznunk, mert az irodalmi közlemények többsége valamilyen kívülről bevitt vegyület alkalmazásáról számol be az ATP depléció elérésére! Az ATP-t, glükózt, K⁺-, Na⁺-, Ca²⁺-, víz-tartalmat, átlagos vörösvértest térfogatot (MCV) és a pH-t mértük az idő függvényében.

3.1.1 A vörösvértest térfogat (MCV), víztartalom és ATP szint

időbeli változásának összehasonlítása 4°C-on és 37°C-on

5 különböző vérmintát elemeztünk. Ezek közül itt két reprezentatív ábrát mutatunk be. 4°C-on a vörösvértetek átlagos térfogata (MCV) és víztartalma nem változott. Ezzel szemben a 37°C-on történt inkubáláskor az MCV átmeneti (24-48 óra között) emelkedést mutatott, a víztartalom pedig 48 óra inkubálás után csökkent (4. ábra).



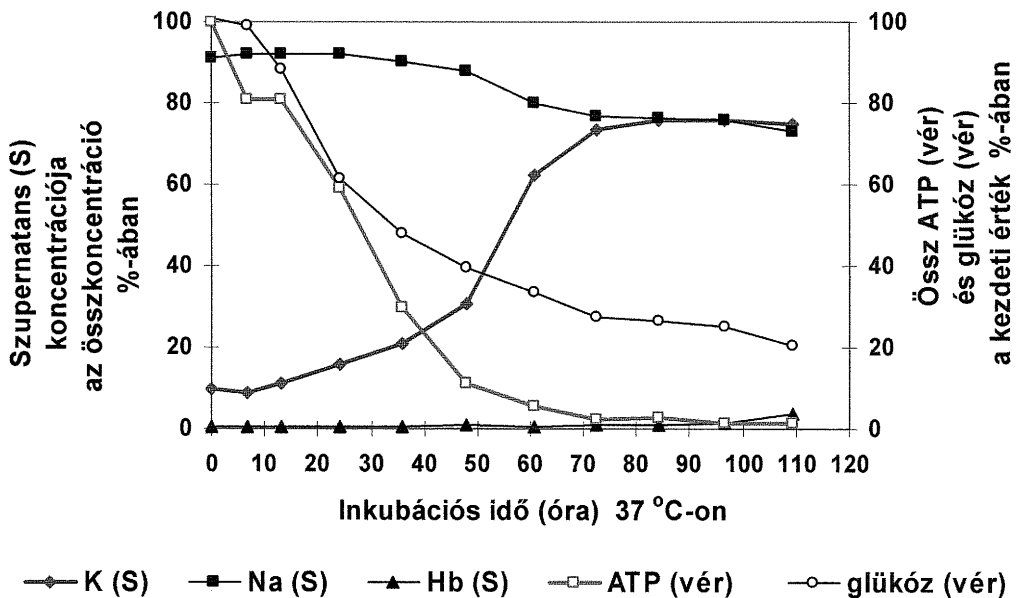
4.ábra. Humán vörösvértestek átlagos térfogatának (MCV) és víztartalmának változása az idő függvényében, 37°C-os inkubálás folyamán

3.1.2 A metabolikus paraméterek (K^+ , Na^+ , Hb, ATP és glükóz koncentráció) időbeli változása 4°C-on a 110 órás inkubálási idő alatt

A metabolikus paraméterek (K^+ , Na^+ , Hb, ATP és glükóz) 4°C-on csak **limitált változást mutattak**, a teljes, 110 órás inkubálási idő alatt az intracelluláris kálium és ATP csökkenés 20%-on belül maradt, a plazma Na^+ -koncentráció látszólag konstans, míg a plazma K^+ -koncentráció sem változott jelentősen (<10%, jelezte egy kevés kálium kiszabadulását a vörösvértestekből). A plazma hemoglobin ezen idő alatt állandó volt. A plazma ozmolaritás, kalcium-ion koncentráció és vörösvértest szám állandó maradt; a vér pH 0,1-t csökkent. A korábbi megfigyelésekkel [60] megegyezően a **4°C-os vörösvértest inkubálás során nem észleltünk ATP depléciót, K^+ kiszabadulást** és lényeges változást az egyéb vizsgált paraméterekben.

3.1.3 A metabolikus paraméterek (K^+ , Na^+ , Hb, ATP és glükóz koncentráció) időbeli változása 37°C -on a 110 órás inkubálási idő alatt

Az előzőekkel szemben humán vörösvértestekben - 37°C -on saját plazmájukban történő inkubálás során - drámai változások történtek a vizsgált paraméterekben. Jelentős és valószínűleg irreverzibilis intracelluláris K^+ veszteség akkor következett be, ha 90%-os volt az ATP depléció, vagyis a humán vér 48 órás, 37°C -os inkubálása után (5. ábra).

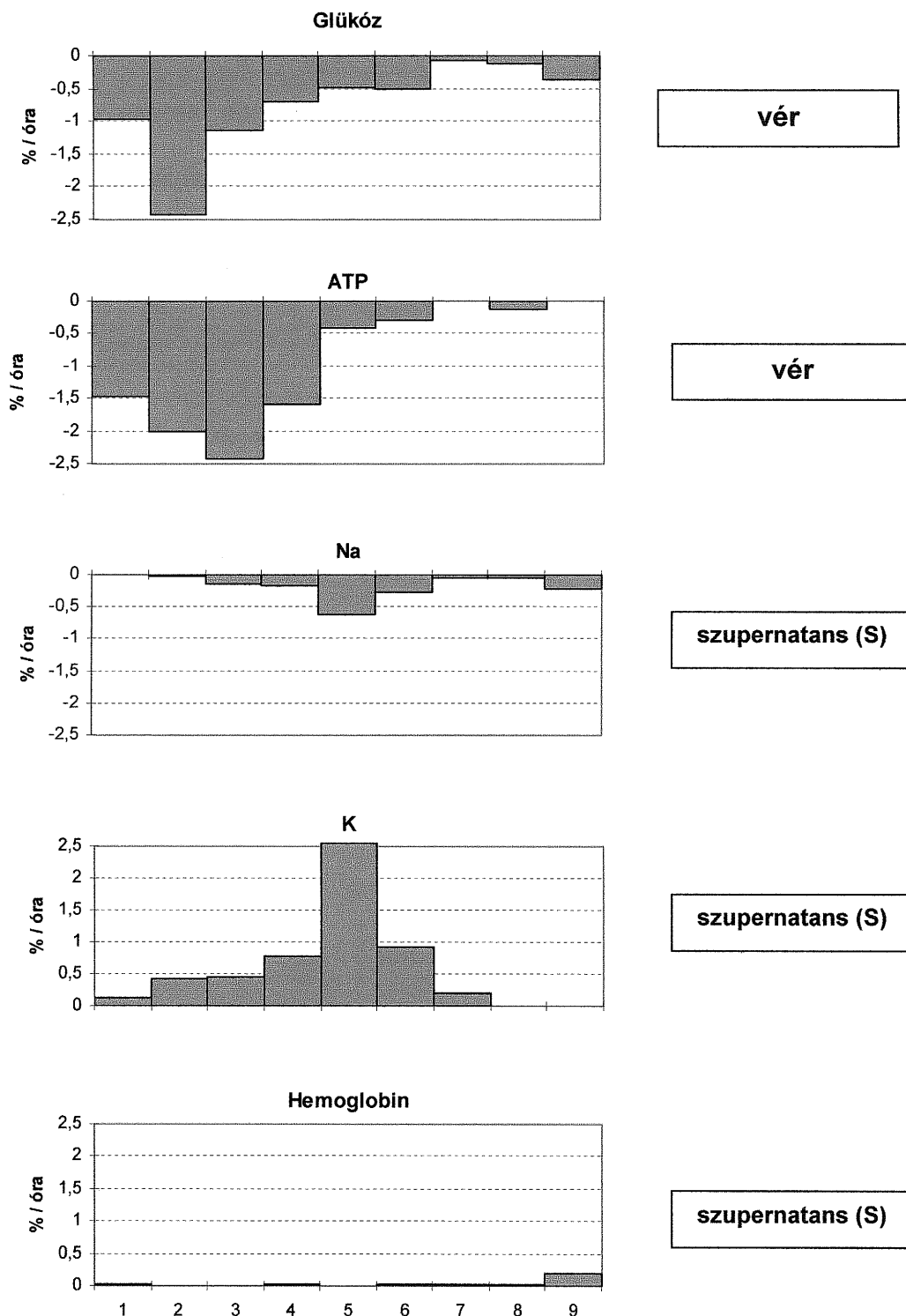


5. ábra. Az ATP és glükóz tartalom csökkenése mellett a K^+ , Na^+ és hemoglobin megoszlásának változása az intra- és extracelluláris tér között

Az 5. ábrán a teljes humán vér ATP és glükóz metabolizmusa (jobb y tengely) és a K^+ , Na^+ és hemoglobin megoszlása látható az intra- és extracelluláris tér között az idő függvényében, a teljes vér K^+ , Na^+ és hemoglobin %-ában kifejezve (bal y tengely). Inkubációs hőmérséklet: 37°C .

Egy további érdekes megfigyelést tettünk. A különféle paraméterek koncentráció-változási sebességét $\left(\frac{\Delta c}{\Delta t}\right)$ vizsgáltuk egymást követő 12 órás intervallumokban ($\Delta t = 12$). **Az egyes paraméterek koncentráció-változási maximuma lényegesen eltérő időtartományokban következett be**, például a glükóz esetén 12-24 óra (2.), az ATP-nél 24-36 óra (3.), a K^+ - Na^+ -ionnál 48-60 óra (5.) között érte el a koncentrációváltozás sebessége a legnagyobb értéket (6. ábra, lásd még az ábramagyarázatot az x tengely időintervallumairól).

A K^+ és Na^+ koncentráció-változási maximuma ugyanazon időtartományba (48-60h) esett, jelezve a kétféle ion-koncentráció közel egyidejű változását. Az ábrából az is világosan látszik, hogy a K^+ (és az inkubálás vége felé a hemoglobin) koncentráció emelkedik a plazmában, a többi vizsgált paraméter csökkenést mutat. Az is megfigyelhető, hogy a **hemoglobin koncentráció növekedés a plazmában a teljes kálium kiáramlást követően csak hosszú idő (legalább 12 óra) eltelte után következett be.**



6. ábra. A humán vörösvértestekből kiáramló komponensek koncentrációváltozás sebessége (%/óra) különböző időintervallumokban, 37 °C-on (A Na⁺ esetében beáramlás van!). Lásd az 5. ábrát is! Az ott ábrázolt ATP, glükóz, K⁺, Na⁺ és Hb koncentrációk változási sebességei $\left(\frac{\Delta c}{\Delta t}\right)$ találhatóak itt, 12

órás intervallumokat vizsgálva alatt ($\Delta t = 12$). Az ATP, glükóz és Na⁺-koncentráció csökken, míg a K⁺ és Hb koncentráció nő az extracelluláris térben (ezért szerepelnek negatív és pozitív előjellel a %-os koncentrációk és egymáshoz képest fordítottan az oszlopdiagramok). Az x tengelyen levő számok az egymás után következő 12 órás inkubálási időintervallumokat jelentik. (1: 1-12 óra, 2: 12-24 óra, 3: 24-36 óra ... stb.)

3.2 A direkt bioautográfia optimalizálása

Az esetek döntő többségében a szilikagélen, mint állófázison történő detektálás megfelelő. Némely vegyület azonban, pl. gentamicin direkt bioautográfiásan jobban detektálható alumíniumoxid TLC lemezen [23].

3.2.1 Mozgó fázisok alkalmassága

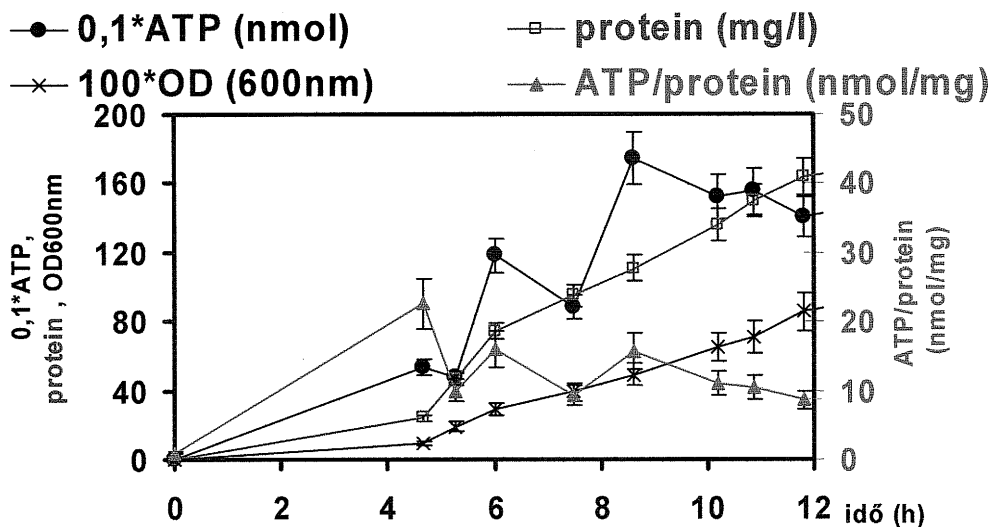
Fontos eredmény a direkt bioautográfia számára, hogy a **vékonyréteg kromatográfiában (TLC) gyakran használt szerves oldószerek** (etanol, metanol, etilacetát, kloroform, aceton, toluol) **nem adtak gátlási zónát** [23]. Ez azt jelenti, hogy az előzetes TLC futtatás nem zavarja a későbbi direkt bioautográfiás detektálást. Azonban 5%-os koncentrációban az ecetsav is és a kénsav is gátlási zónát mutatott. A TLC lemezek szárítása után visszamaradt savas gőzök hatására pusztulnak a mikrobák. Ezért a direkt bioautográfiát megelőző futtatáskor a **savtartalmú oldószerelegyet**, lehetőség szerint **kerülni kell** (futtatás után nehéz a savtartalmat maradéktalanul eltávolítani).

3.2.2 Mikroba tenyésztés és a mikrobiális ATP változása

Tesztbaktériumainknál, amelyek standard amerikai törzsgyűjteményből (ATCC) származnak, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) és *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) Mueller - Hinton táptalajban (húsleves) 37 °C-on, tenyésztés során az **intracelluláris ATP szint az idő függvényében oszcillált, időben periodikusan ismétlődően növekedett és csökkent a koncentrációja**. Példaként a *B. subtilis* baktérium tenyésztésekor észlelt ATP szint oszcillációt a 7. ábra mutatja

(lásd az ATP/protein görbét!). Egyúttal látható az oszcilláció periódusidejének növekedése az idő előrehaladtával. Megfigyelhető, hogy az ATP periodikusan változó koncentrációja mellett a fehérjetartalom (és $OD_{600nm} \sim$ sejtszám) monoton növekedést mutat. Most az ATP/protein görbét nézve ennek oszcillációja az ATP-től (ATP görbe), míg növekvő tendenciája a protein szint monoton növekedéséből ered. Egyúttal világosan látszik, hogy a protein-szint görbe az OD_{600nm} görbével együtt növekvő tendenciát mutat. Ez az újonnan keletkezett baktériumok számának időben közel azonos mértékű növekedésére utal.

***B. subtilis* baktérium ATP szintjének változása a tenyésztés során**



7. ábra. A *B. subtilis* baktérium Mueller-Hinton táptalajban (húsleves) történő tenyésztésekor észlelt ATP koncentráció oszcillációját mutatja

A $0,1*ATP$ ill. $100*OD_{600nm}$ szorzófaktorok az ábrázolás megkönnyítésére szolgálnak.

A többi tesztmikroba intracelluláris ATP oszcillációját is megfigyeltük, egymástól különböző periódusidővel és amplitudóval

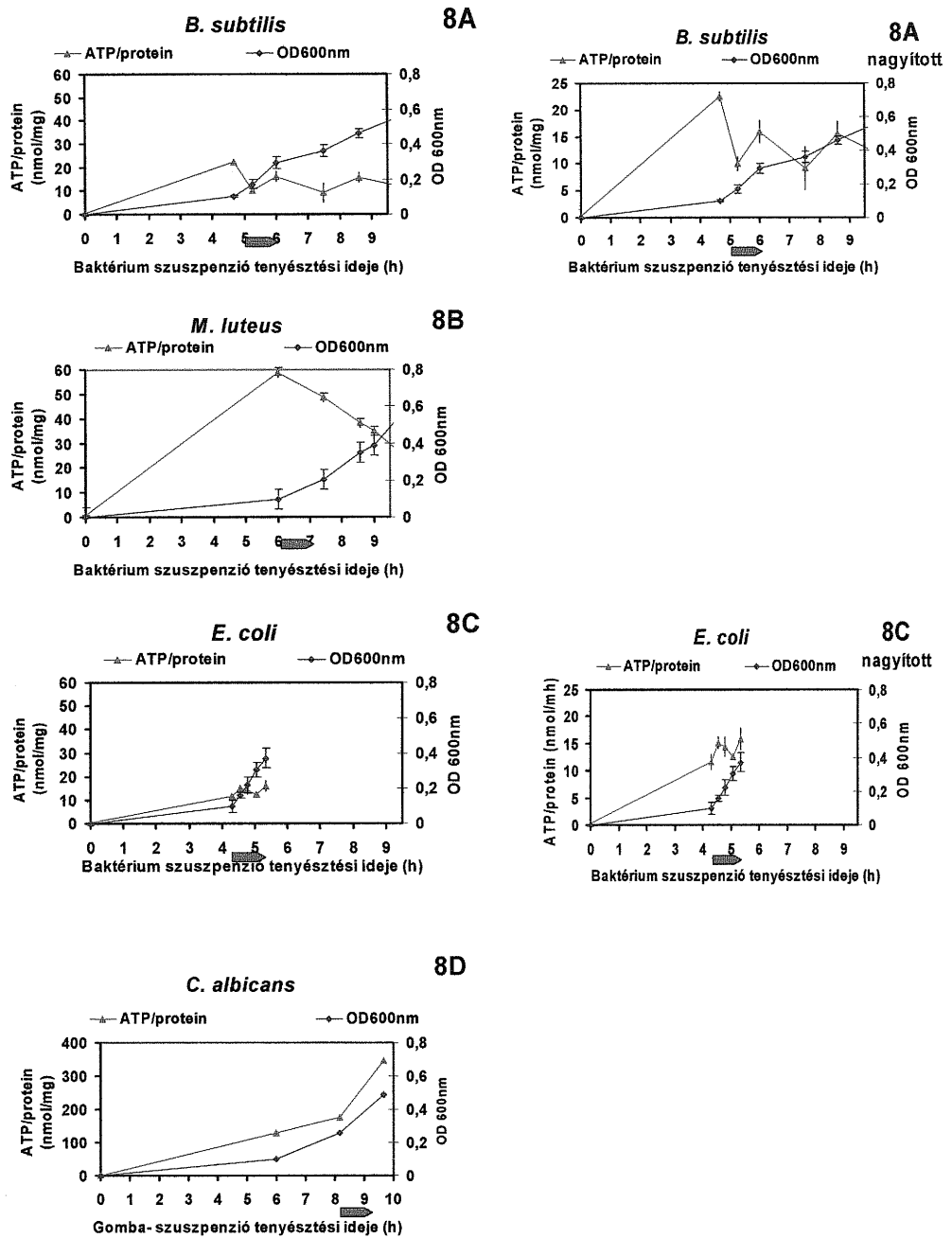
(8. ábra). Feltűnő az *E. coli* esetében az ATP szint oszcilláció alacsonyabb amplitudója. A 8.A „nagyított” ábrán jobban láthatjuk, hogy a *B. subtilis* ATP tartalma is jól észlelhetően oszcillál a baktérium szuszpenzióban.

3.2.3 A maximális intracelluláris ATP és a log fázis, valamint ezek eléréséhez szükséges idők meghatározása

A TLC bemerítő szuszpenzióban mértük a mikroba ATP tartalom változását, hogy meghatározzuk a különféle mikrobák maximális metabolikus aktivitását (ez maximális ATP szintnél várható) és az ennek eléréséhez szükséges legrövidebb időket (a 3.2.3 fejezetben részletezem). Erre azért volt lehetőség, mert a kezdeti **ATP/protein szint egy ideig növekedett, majd a log fázis elérése után egy közel állandó érték körül oszcillált.** Ez a 8. ábrán is látható.

A mikrobák növekedésének log fázisát az OD_{600nm} –görbe hirtelen emelkedő része mutatja. A **log fázis kezdetén az ATP szint helyi maximumát** észleltük mind a háromféle tesztbaktériumnál, a log fázis kezdete után viszont az ATP szintek mindegyiknél lecsökkentek (a periodikus változás lemenő szakasza). A leghamarabb a Gram-negatív *E. coli* és a Gram-pozitív *B. subtilis* log fázisa kezdődött, beoltás után kb. 4 - 5 órával. Az *E. coli* sejtszáma a log fázisban lényegesen gyorsabban növekedett (meredekebb OD-görbe), mint a *B. subtilis*-é. A Gram-pozitív *M. luteus* log fázisa csak 6 óra körül indult, kicsit meredekebben a *B. subtilis*-hez képest. Érdeemes megfigyelni a *B. subtilis* növekedési görbéjén a log fázis elején levő “púp”-ot, amely átmenetileg fokozottabb szaporodásra utalhat. A 8. A-C ábrákból egyértelműen látszik, hogy a leggyorsabban növekvő *E. coli* éri el leghamarabb a log fázist és ennek

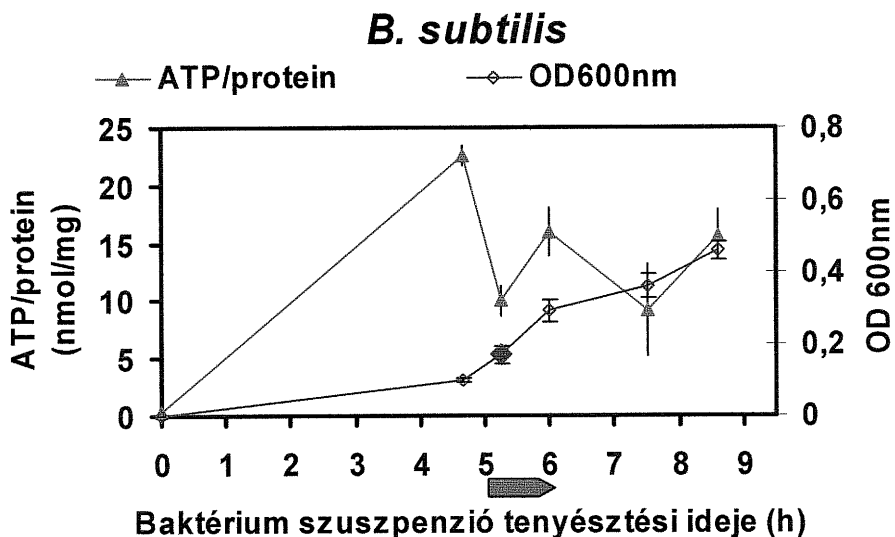
megfelelően a legnagyobb ATP szintet (azaz a legnagyobb metabolikus aktivitást). Az elmondottak szemléletesen követhetők a 8. ábrán [61]. A log fázisnál bekövetkező ATP/protein szint növekedést gomba (*C. albicans* – ATCC 90028) esetén is észleltük (8.D ábra) [62].



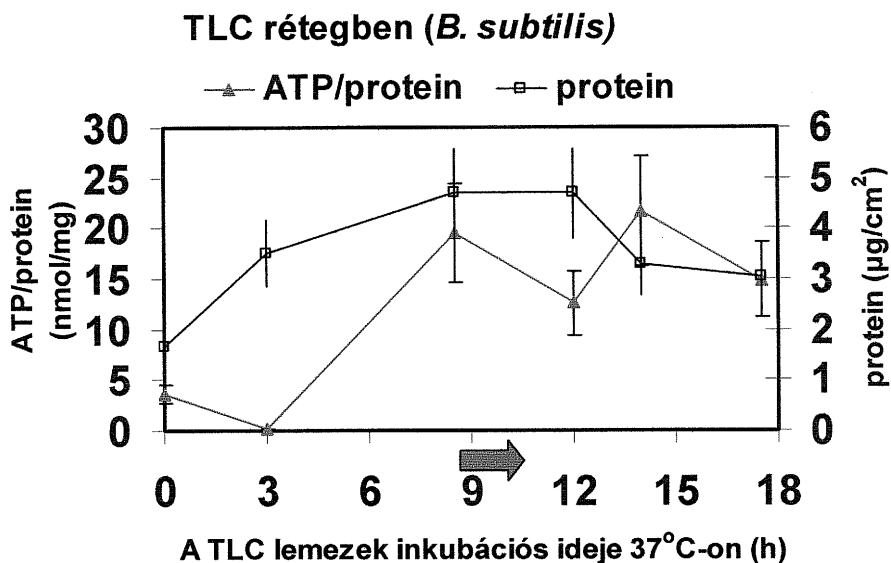
8. ábra. Különbéle mikrobák maximális metabolikus aktivitásának eléréséhez szükséges legrövidebb időinek összehasonlítása, a tenyésztési TLC bemejtő szuszpenzióban mért mikroba ATP tartalom változása alapján

3.2.4 Mikrobiális ATP mérése a bemerítő szuszpenzióban és a TLC lemezen

Az életképességet tekintve az ATP adatok alapján a bemerítő baktérium szuszpenzióban (9.A ábra) az OD_{600nm} 0,2 feletti legyen *B. subtilis* esetében. Ez jelenti a log fázis kezdetét. Ekkor a mikrobiális ATP szint átlaga a kiinduláshoz képest maximális értéket ér el (9.A ábra). A 9.A ábrán a kijelölt pontban egy átmeneti, rövid idejű ATP csökkenést észleltünk, amelyről részletesebben írok a 4.2 fejezet 48. oldalán. A 9.A ábrán jól látható pontig (külön kiemelt pont az ábrán!), a log fázis kezdetéig növesztett, friss baktérium-szuszpenzióba merítjük a TLC lemezeket. Ez a maximális ATP szint átlag egy előnyös életképességet jelent a baktériumok számára. Bár a 9.A ábra első pillantásra egyszerű tankönyvi ábrának látszik, fontos azonban megjegyeznünk, hogy itt a direkt bioautográfiás TLC lemezen aktuálisan alkalmazott tesztmikroba jellemző növekedési görbéje látható és **nemcsak arra utal**, hogy **meghatározott mikrobaszám** mellett történt a TLC lemezek bemerítése, hanem arra is, hogy a **mikrobák életképességét is figyelembe vettük** (lásd még a TLC lemezen mért ATP szint eredményeket is, 9.B ábra). Ennek legfontosabb következménye, hogy a baktérium szuszpenzióba merített TLC lemezek 37°C-on történő inkubációs idejét lerövidíthettük, $OD_{600nm}=0,2$ esetén 9 órára, $OD_{600nm}=0,4$ esetében pedig 5 órára [63], a korábbi [64, 65] „A” módszer helyett (18 órás, post-log fázisú, éjszakán át tenyésztett baktérium szuszpenzió). Lásd az 1. és 2. táblázatot is.



9.A ábra



9.B ábra

9. ábra. A folyékony táptalajban levő mikrobák élete (9.A ábra) és a TLC lemezen megkötött táptalajban (9.B ábra) folytatódik

A *B. subtilis* baktérium példáján az ATP/protein és protein tartalom változását láthatjuk az idő függvényében. A 9.A ábrán a piros nyíl a log fázis kezdetét jelenti a mikroba szuszpenzióban. (Ez a TLC lemezek bemerítésének legrövidebb ideje.) A 9.B ábrán a nyíl egy nagyobb ATP/protein szint kezdetét jelöli a TLC lemezekben. (egy nagyobb metabolikus aktivitás kezdete.)

1. táblázat

Az irodalmi adatok [64, 65] alapján végzett (A) és a javított módszerünk (B) műveleti időadatainak részletezése (óra)

A lényegesen eltérő adatokat vastag keretezéssel emeltük ki.

A zárójelben levő szám adatok a bemerítő baktérium szuszpenzió OD_{600nm} értékeit jelentik.

Módszer	Idő (óra)				
	Növesztés		(OD_{600nm})	MTT**	Össz
	Baktérium szuszpenzióban	TLC lemezen	Baktérium szuszpenzióban	TLC lemezen	
A	20	18	(0.4)*	1	39
B	5.5	18	(0.2)	1	24.5
B	5.5	8.5	(0.2)	1	15
B	7.5	4.8	(0.4)	1	13.3

*magasabb csíraszámú *B. subtilis* szuszpenzióból ($OD_{600nm} > 0.4$)

tápoldattal **hígítva**

**TLC lemezek inkubálási ideje (óra) 37°C-on MTT-be merítés után (óra)

2. táblázat

Az irodalmi adatok [64, 65] alapján végzett (A) és a javított módszerünk (B) műveleti időadatainak (óra) összehasonlítása

A TLC lemez rövidebb inkubációs időinél vastagítással emeltük ki az összehasonlított időadatokat. Ezen időadatokat a bemerítősuszpenzió mikrobaszámától függnek (a mikrobaszámmal arányos OD_{600nm} értékeket dőlt betűvel, zárójelbe tettük).

		Idő (óra)	
Teszt baktériumok	Növesztés bemerítő táplodtatban	20	5.5 – 7.5
		“A” módszer	“B” módszer
	Higitás OD _{600nm} = 0.4-re	0.1	0
T L C	Szorbens réteg előkezelése, 120°C	3	(3) ^x
	Minta felvitel	0.2	0.2
	TLC lemezek kifejlesztése	0.5	0.5
	Szorbens réteg szárítása	0.2	0.2
	Detektálás és denzitometria	0.5	0.5
Direkt bioautográfia	TLC lemezek előkezelése nedves atmoszférában	3	0
	TLC lemezek bemerítése	0.003 (10sec)	0.003 (10sec)
	Szárítás	0.03	0.03
	A beoltott lemezek nedves légtérben	18	4 – 8 (OD=0,4) (OD=0,2)
	MTT festés	0.003 (10sec)	0.003 (10sec)
	MTT –be mártott lemezek inkubálása nedves atmoszférában	1	1
	TLC lemezek mosása etanollal	0.003 (10sec)	0.003 (10sec)
	Szárítás	0.1	0.1

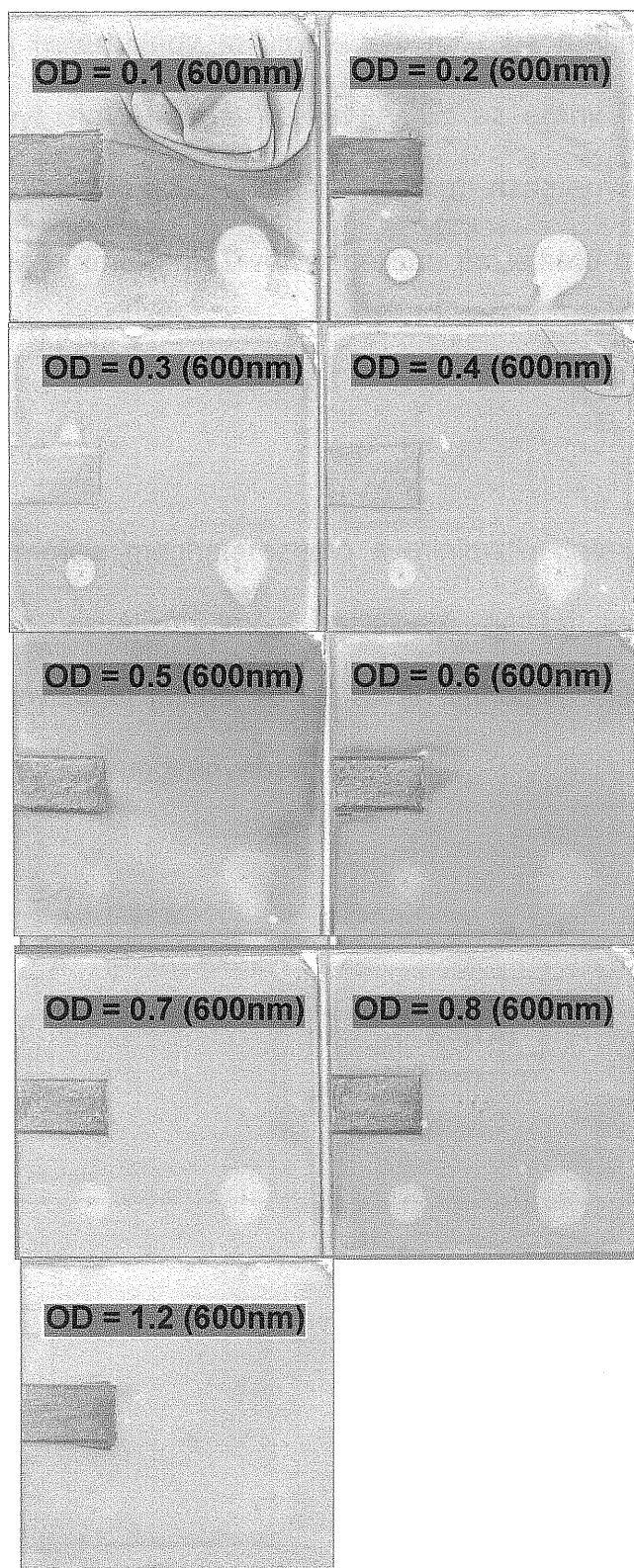
^xelhagyható

3.2.5 Bioautogram készítés

A korábbi kísérleteinkben irodalmi adatokból [64, 65] vett, egy éjszakán át tenyésztett (ún. post-log fázisú) baktérium szuszpenzióval dolgoztunk. Ezzel nem kaptunk jó eredményeket, vagyis hosszú idejű (több, mint 10 óra) lemez inkubálások után, elmosódott szélű gátlási zónák keletkeztek. Az OD_{600nm} méréssel a baktérium összcsíraszám nagyságának változását követhetjük, de ez a mikrobák életképességére nem ad felvilágosítást (9.A ábra és lásd az 1. és 2. táblázat "A" módszer eredményeit [63] is). A spektrofotométerrel meghatározott OD_{600nm} értékek ugyanis az élő és az elhalt mikrobákat egyaránt tartalmazzák.

A kiindulási problémához mutatom be a 10. ábrát, amely különböző csíraszámú baktérium szuszpenzióba ($OD_{600nm}=0,1 - 1,2$) mártott TLC lemezeken azonos körülmények mellett keletkezett gátlási zónák különbségét mutatja be. Jól megfigyelhető, hogy lényeges eltérés van az egyes gátlási foltok kontrasztossága között. Ezen megfigyelés adta az ötletet, hogy érdemes lenne megvizsgálni a baktérium életképességgel összefüggő mikrobiális ATP tartalmat mind a tenyésztési szuszpenzióban mind a bemerítés utáni TLC lemezeken.

A baktériumszám és metabolikus aktivitás együttes hatását *B. subtilis* esetében a 9.B ábra mutatja. Igazolódott, hogy az OD_{600nm} és ATP/protein arány alapján meghatározott $OD_{600nm} = 0,2$ feletti tartományt kell tartani a bemejtő baktérium szuszpenzióban. Ilyen bemejtő szuszpenzióba mártott TLC lemezeken kapunk kellően kontrasztos gátlási foltokat *B. subtilis* esetében a vizsgált körülmények között. (Ebben az OD_{600nm} 0,2 feletti, a magas ATP tartalom metabolikusan aktív mikrobákat jelez). Kb. $OD_{600nm} = 0,5$ fölé nem érdemes menni, mert hosszú lesz a tenyésztési idő (nem optimális) és a gátlási zóna határok elmosódottá válnak [63] (lásd a 10. ábrát is).

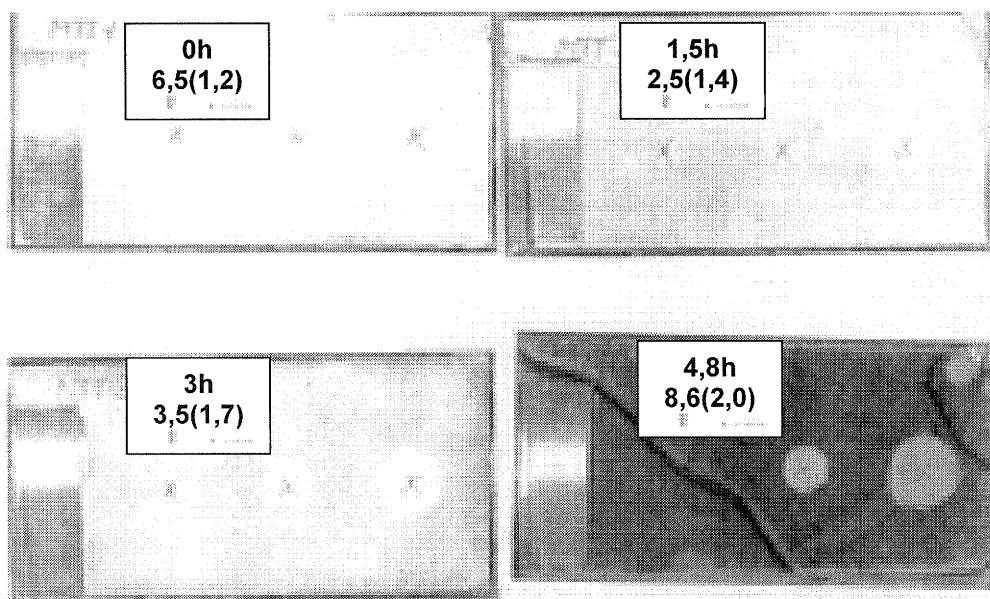


10. ábra. Növekvő csíraszámú baktérium szuszpenzióba merített TLC lemezeken kialakult bioautogramok

A TLC lemezeken a bemerítési baktérium szuszpenzió OD_{600nm} értékei láthatók. Tesztbaktérium : *B. subtilis*. 37 °C-os inkubálás. Tesztantibiotikum: cefazolin 0,01 – 100ng.

A direkt bioautográfiában a sikeres MTT reakció számára meg lehet adni azt a detektálási határt, (egy minimális élő mikroba mennyiséget) egy ATP/protein arányt, nmol/mg-ban kifejezve. Ez az arány TLC lemezen kísérleteinkben *B. subtilis* esetén kb. 7 nmol/mg, azaz egy minimális élő mikroba mennyiség, amely MTT-vel vizuálisan észlelhető bioautogramot ad (11. és 12. ábra) [63].

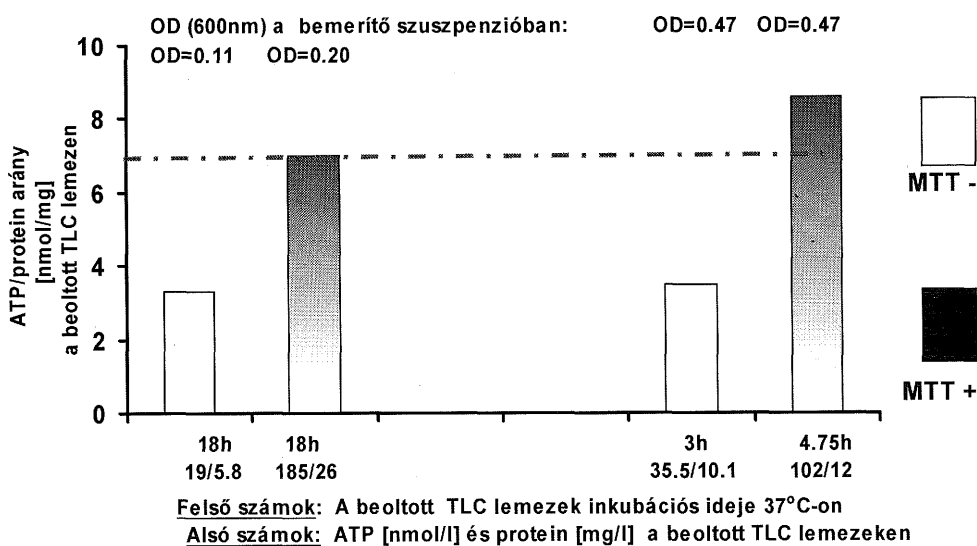
Tesztantibiotikumokra meghatározható a minimális detektálható dózis (MDD). Ez itt a vizuálisan még észlelhető gátlási foltokhoz tartozó antibiotikum mennyiséget jelenti. A 11. ábrán láthatjuk, miként alakul ki egy bioautogram az idő függvényében [63].



11. ábra. Bioautogram kialakulása a tesztmikrobák ATP szintjének követésével a *B. subtilis* példáján.

A felső számok a beoltott TLC lemezek 37 °C-os inkubációs idejét mutatják, míg az alsó számok az ATP/protein (nmol/mg) arányt és zárójelben a fehérjetartalmat ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) jelzik.

A 4. lemez (alsó sor jobboldali lemez) jól mutatja, hogy a Gram-pozitív *B. subtilis* (ATCC 6633) tesztbaktérium esetén 4,8 óra a minimálisan szükséges lemez inkubálási idő (adott $OD_{600nm} = 0.3$ bemerítő szuszpenzió mellett). Ez az érték hasonlóan más mikrobák esetében is megállapítható. Érdeemes megfigyelni, hogy a 4,8 órán át inkubált lemezen levő mikrobák ATP/protein értéke lépi át először a 7 nmol/mg körüli küszöbértéket, a rövidebb inkubálási idejű lemezeké nem (11. ábra).



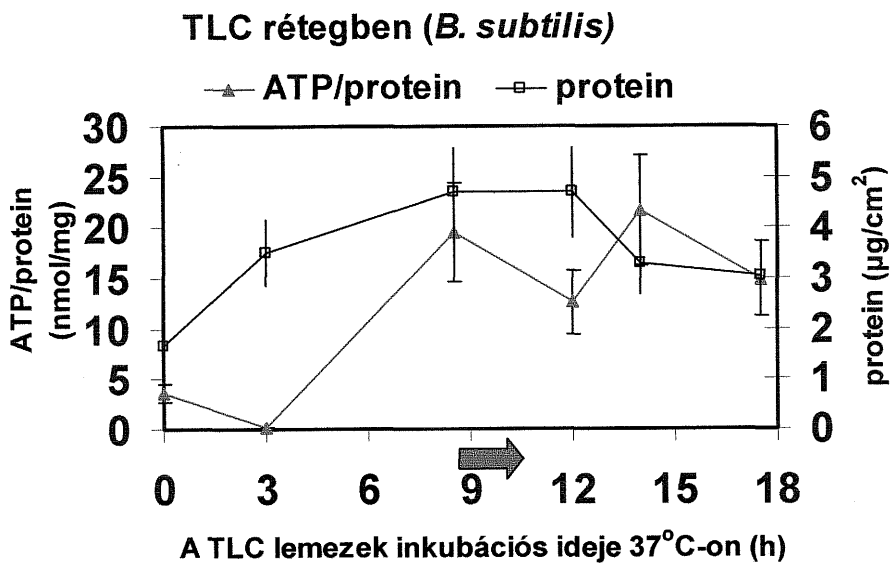
12. ábra. A vizualitást biztosító legkisebb mikrobiális ATP koncentráció az MTT direkt bioautográfiában (ezt az ATP/protein szintet az ábrán pont-vonal jelöli)

A 12. ábrán különböző mikrobaszámú (eltérő OD_{600nm}) szuszpenzióba merített és 37°C -on különböző ideig (4,8 – 18h időintervallumban) inkubált TLC lemezeken meghatározott ATP/protein arányokat ábrázoltuk. Jól látszik, hogy a különböző körülmények mellett a lemezeken élő mikroba együttesnek egy minimális ATP/protein arányt át

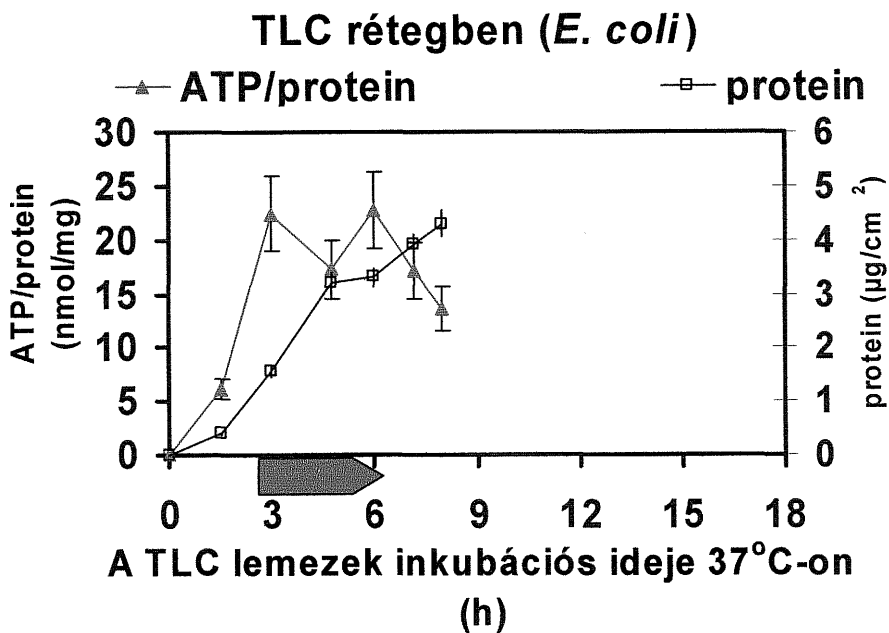
kell lépniük, hogy az MTT –vel láthatóvá váljanak a kioltási zónák (lásd a 11. ábrát is!).

3.2.6 Tesztmikrobák optimális metabolikus aktivitása a direkt bioautográfiában

Az optimalizálásról összefoglalóan egy könyvfejezetben írtunk [23]. Egyik tanulmányunkban [61] részletesebben vizsgáltuk a Gram-negatív *E. coli* optimális metabolikus aktivitását TLC lemezen. A metabolikus aktivitás optimális tartománya TLC lemezen a *B. subtilis* esetén csak 9 óra inkubálás után kezdődik, míg az *E. coli*-nál már 3 óra inkubációs időnél. Ez azt jelenti a gyakorlatban, hogy az $OD_{600nm} = 0.4$ -ig növesztett *E. coli* baktérium-szuszpenzióba merítve a szilikagél TLC lemezeket, már 3 óra lemez inkubáció elteltével optimális bioautogram érhető el. A *B. subtilis* esetében csak lényegesen hosszabb TLC lemez inkubálás után kaphatunk optimális eredményeket (lásd a 13. ábrát).



13.A ábra (azonos 9.B ábrával)



13.B ábra

13. ábra: A Gram-pozitív *B. subtilis* és a Gram-negatív *E. coli* baktérium szilikagél TLC lemezen meghatározott optimális metabolikus aktivitásának összehasonlítása

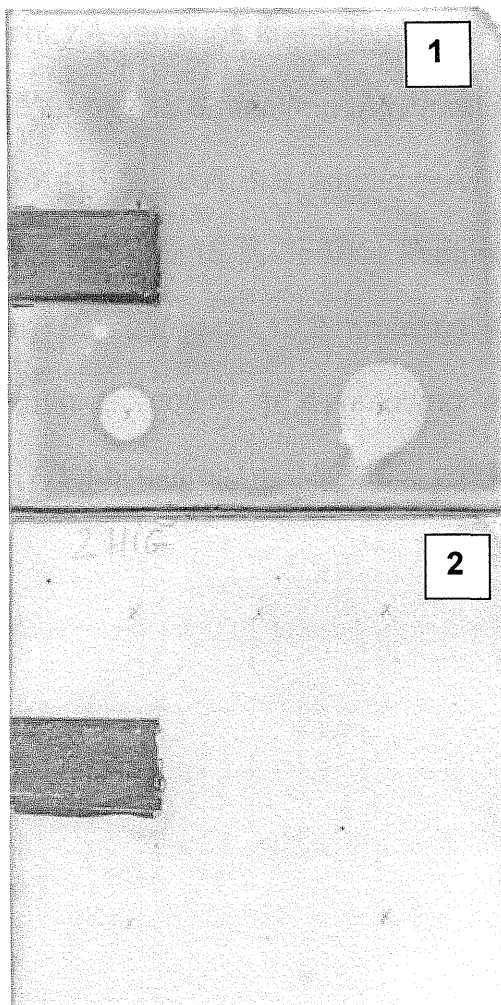
A *B. subtilis* ábráját nézve, kb. 12 óra után erőteljesebb protein degradációra utaló jeleket észleltünk, amely arra mutat, hogy a táptalajban

a glükóz valószínűleg már elfogyott, a baktériumok a rendelkezésre álló fehérjéket fogyasztják energiaforrásként.

A mikrobák optimális életkörülményeinek megválasztásával, rövidebb idő alatt kontrasztosabb bioautogramot kaptunk. Ennek szép példáját mutatja *B. subtilis* esetében a 14. ábra.

Az ábra két bioautogramot mutat, amelyek azonos antibiotikum koncentrációk mellett, de különböző körülmények között készültek. Az antibiotikum felvitele után az egyes TLC lemezeket különféle baktérium-szuszpenziókba merítettük. Ezek a szuszpenziók abban különböztek, hogy azonos tápoldatokból kiindulva egymástól eltérő módon tenyésztett baktériumokat tartalmaztak. Az **1. számú lemezt** direkt, visszahígítás nélkül **log fázisig** tenyésztett szuszpenzióba merítettük. A **2.számú lemez** bemerítő szuszpenziója még a korábbi „A” módszerrel, sűrű ($OD_{600nm} = 0,8$ körüli, **post-log fázisú**) baktérium szuszpenzióból steril tápoldattal való hígítással készült,

Az eredmény egyértelmű: az **új módszerrel kezelt (direkt növesztés a log fázisig) 1.számú lemez** adott jó bioautogramot.



14. ábra: Előnyös és nem előnyös körülmények között készült direkt bioautográfiás TLC lemezek (bioautogramok) összevetése

Az ábra két bioautogramot mutat, amelyek azonos antibiotikum mennyiség mellett, de különböző körülmények között készültek. Először felvisszük az antibiotikumot a TLC lemezre. Ezután a lemezeket előzetesen különféleképpen tenyésztett baktériumokat tartalmazó szuszpenzióba merítettük. Az **1. számú lemezt** direkt, visszahígítás nélkül log fázisig tenyésztett szuszpenzióba merítettük, míg a **2 számú. lemez** bemerítő szuszpenziója a korábbi „A” módszerrel, sűrű ($OD_{600nm} = 0,8$ körüli) baktérium szuszpenzióból steril tápoldattal való hígításával készült.

A variációs koefficiens meghatározásához 10x10 cm –es szilikagél TLC lemezeket, 6 cm²-es részekre osztottunk fel (a lemezt nem daraboltuk szét, csak kijelöltük a szegmenseket!). Minden egyes szegmensben (n=12) meghatároztuk az ATP/protein arányt, az „Anyagok és módszerek”-

ben leírtak szerint. A variációs koefficiens (VK) **TLC lemezen** *B. subtilis* esetén $VK=12,5\%$ volt, $15,5 \text{ nmol/mg ATP/protein}$ hányados esetén, míg *E. coli* esetén $VK=15,5\%$ volt, $9,9 \text{ nmol/mg ATP/protein}$ mellett. A többi mikroba esetén is ilyen 10-15 %-os VK-t kaptunk. **Bemerítő baktérium szuszpenzióban** *B. subtilis*-re $13,2 \text{ nmol/mg ATP/protein}$ mellett $VK=9,7\%$ adódott, míg *E. coli*-ra $16,4 \text{ nmol/mg}$ átlagértékhez $VK=7,5\%$ tartozott ($n=10$). A többi mikrobára $VK<10\%$ volt jellemző.

4. Megbeszélés

4.1 ATP depléció vörösvértestekben

Jelen fejezetben összefoglaltam az ATP deplécióval kapcsolatos tanulmányzásainknak a gyakorlatban is jól hasznosítható élettani és mikrobiológiai eredményeit.

4.1.1 A 4 °C-on kapott eredmények értékelése

Bár a vörösvértest ATP tartalom nem változott 4°C-on, nem tudtunk különbséget tenni két lehetőség között:

- 1.) az ATP turnover teljesen gátolt,
- 2.) az ATP turnover finoman kiegyenített egy nagyon alacsony sebesség mellett.

E két lehetőséggel kapcsolatban meg kell jegyeznünk, hogy az általánosan elfogadott Na⁺-K⁺-ATPáz pumpa 4°C-on gyakorlatilag inaktív [60]. Automatikusan felmerül a kérdés, hogyan marad fenn a K⁺/Na⁺ gradiens a vörösvértestekben, ha a feltételezett pumpa vagy pumpák nem működnek. Ez kérdéses a kísérleti idő közel 5 napjára, de kérdéses a szokásos vértárolás 20-35 napjára is. A hagyományos teória mellett más mechanizmusok szerepe is felmerül az élő sejtben, amelyek a K⁺ szelektív adszorpciójával [66-68] vagy a K⁺-ionok fehérjékkel való kompartmentalizációjával kapcsolatosak [69]. A kérdés eldöntése, természetesen nem célja e dolgozatnak, csak az újabb tény adatok serkentenek továbbgondolkozásra.

4.1.2 A 37 °C-on kapott eredmények értékelése

A vörösvértestekben - saját plazmájukban, 37°C-on történő inkubálás során - **jelentős** és valószínűleg irreverzibilis intracelluláris **K⁺-vesztés, csak 48 órás inkubálás után következett be, vagyis, ha 90%-os volt az ATP depléció** (5. ábra). A K⁺ kiáramlás szigmoid kinetikát mutatott, erőteljesen felgyorsulva 90%-os ATP depléciónál. A K⁺ kiáramlással párhuzamosan, Na⁺ beáramlás ment végbe az ionegyensúly eléréséig (kb. 84 óra). Az ábra jól mutatja, hogy az ATP a glükózzal együtt csökken. De míg az ATP gyakorlatilag teljesen elfogyott, a **glükózból elegendő mennyiségű maradt a vörösvértest metabolizmusára a kísérlet végén is**. Az ionegyensúly kialakulása és a teljes ATP elfogyása (84 óra) után **nagy késéssel, csak 96 óra körül indult a hemoglobin kiáramlás**.

A **hemoglobin tehát nem került ki azonnal** a vörösvértestekből a környező közeggel való **teljes ionegyensúly** (a kezdetben jelentősen különböző intra- és extracelluláris ionkoncentrációk kiegyenlítődése) kialakulása **után**. Ez azt jelenti, hogy a vörösvértest sejthalál nem okoz hemoglobin kiáramlást.

A mintákat 37°C-on inkubálva, az ATP depléció gyorsan bekövetkezett és meglepetésre az **energia depléciót nem követte azonnal K⁺ kiáramlás**. Más módon végzett kísérletekben, amelyekben vörösvértest membránt permeabilizáltak detergenssekkel (Brij 58, Triton X-100), az intra- és extracelluláris ionkoncentráció nem egyenlítődt ki azonnal, ahogy ez várható akkor, ha az iongradiens fenntartásában a membrán jelenti az egyedüli szerepet [70].

Ling [66] sokkal nagyobb szinkronitást tapasztalt e két metabolikus paraméter között. Szeretnénk megjegyezni az eltérő körülményeket: ő mosott vörösvértesteket és metabolikus inhibitort alkalmazott. Adataink arra utalnak, hogy az **ATP vesztes a vörösvértest teljes makromolekuláris szerkezetét befolyásolja**, nemcsak egyes részeit. Az eddigi eredményeink részletesebben megtalálhatók korábbi közleményünkben [71]. E téma aktualitását jól mutatja, hogy nemrég jelent meg egy biofizikusok által írt cikkben: részletesebb elméleti levezetés után kísérletek igazolták a vörösvértest citoskeleton és ATP mélyebb összefüggését [72].

ATP depléciós modellünknek a vértárolásban van klinikai jelentősége: külön kémiai anyag hozzáadása nélküli ATP depléció előidézése, így például ATP csökkenés tanulmányozására van lehetőség a vértárolás feltételei között, kontamináló Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok, endotoxinok hatásának követésére vörösvértesteken, vagy pl. nem vörösvértestes élő rendszerek vizsgálatára. **Monolayer sejtkulturákkal** végzett kísérleteink eredményeit közlésre összeállítottuk [73].

Az egyik fontos eredményünket, az **ATP depléció katasztrofális 10%-ra csökkenését, és ennek gyakorlati jelentőségét 2001-ben Leitner [74] vértárolásra vonatkozó tanulmányozása igazolta is!** Ők GTP-re és ITP-re is ilyen megállapítást tettek.

4.2 Direkt bioautográfia tesztmikrobái

A direkt bioautográfia tesztmikrobái számára az előnyös életfeltételek biztosítása a TLC lemezeken, egyúttal a biolumineszcens ATP mérés

alkalmazhatóságának kiterjesztését is jelenti.

A direkt bioautográfia gyakorlatában különbséget találtunk a különféle **adszorbensek** között, az antibiotikus hatás detektálása tekintetében (pl. gentamicin direkt bioautográfias detektálása jobb alumíniumoxid TLC lemezen.)

A munkánk során optimalizált direkt bioautográfias módszer lehetővé teszi szilikagéltől eltérő rétegek (pl. cellulóz) alkalmazását. Összegezve elmondható, hogy a vékonyréteg kromatográfiában általában szilikagélt használnak, mely a direkt bioautográfiasban is használható, néhány speciális eset kivételével.

Az előzőekben már megfogalmaztuk, hogy a vékonyréteg kromatográfiában (TLC) hagyományosan elválasztott komponensek biológiai aktivitásának detektálását az ún. direkt bioautográfia közvetlenül a TLC lemezeken valósítja meg. Éppen ezért fontos eredmény a direkt bioautográfia számára, hogy a szokásos **vékonyréteg kromatográfias szerves oldószerek, mint mozgó fázisok** (etanol, metanol, etilacetát, kloroform, aceton, toluol) **nem adtak gátlási zónát**, vagyis ezek az oldószerek **elpárolgás után** nem hagytak annyi szennyezést a TLC lemezen, hogy az akadályozza a mikrobák szaporodását [23]. Ez azt jelenti, hogy a szokásos vékonyréteg kromatográfias elválasztás, valamint az oldószerek elpárologtatása után azonnal alkalmazható a direkt bioautográfia, vagyis a TLC lemezek bemeztése mikroba szuszpenzióba és a mikrobák szaporodása a TLC lemezeken. Az oldószerekhez kevert **savaktól** (némely futtatószerben alkalmaznak ilyen) a futtatás után nehéz megszabadulni, így a visszamaradó **savnyomok** már komoly problémát, a

mikrobák pusztulását okozhatják. Lehetőség szerint **más oldószerrendszerrel helyettesítsük a savtartalmú oldószerkeleget.**

Kísérleteink másik fontos eredménye: a mikroba-szuszpenzióba merített **TLC lemezek 37°C-on történő inkubációs idejének jelentős lerövidítése.** A mikrobák életképességének vizsgálata után a mikrobákat csak a detektálhatósághoz valóban szükséges tenyésztési ideig kell a vékonyréteg lemezen tartani. Így **lehetségessé vált** a direkt bioautográfiában aminosavak, mesterséges édesítőszer, szénhidrátok, peptidek elválasztására használt [75, 76, 77], **korábban leázó pl. cellulóz, poliamid vékonyrétegek alkalmazása.**

Érdemes megfigyelni a *B. subtilis* növekedési görbéjén (9.A ábra) a log fázis elején levő "púp"-ot, amely átmenetileg fokozottabb szaporodásra utalhat. Mivel a *B. subtilis* spórás baktérium, ezt a jelenséget valószínűleg az okozza, hogy a spórás forma vegetatív formává alakul át.

A korábbi gyakorlat szerint hosszan (éjszakán át, post-log fázisú mikrobaszuszpenziók) tenyésztett, igen nagy mikrobaszámú szuszpenziókat alkalmaztak ($OD_{600nm}=0.6-0.8$) a vékonyréteg lemezek bemerítésére. Itt utalunk régi közleményekre, amelyek fontosnak tartják a post-log (éjszakán át tenyésztett) baktérium szuszpenziókkal szemben a log fázisig tenyésztést [78, 79]. Ez sajnos csaknem teljesen feledésbe merült a direkt bioautográfia alkalmazásánál. Eredményeinkből kiderült, hogy **nem a baktériumok spektrofotométerrel mérhető nagy összcsíraszám** (élő + elpusztult baktériumok) a fontos a TLC lemezekben, **hanem azok életképessége a döntő** [23, 61-63, 80]. **Mind a bemerítő szuszpenzióban, mind a TLC lemezekben érvényes ez.**

Ismereteink szerint, a **direkt bioautográfiában** (TLC lemezeken) **elsőként gondoltunk erre**. Ezekon kívül az is fontos körülmény, hogy a **közvetlenül log fázisig** növesztett mikroba **szuszpenzióban** sokkal **kevesebb az elpusztult mikroba, a metabolikus bomlási termék**, mint egy túlnövesztett és előregedett kulturában. Ismeretes, hogy a vékonyréteg kromatográfiás elválasztás hatékonyságát ronthatja a lemezre kerülő számtalan szennyező anyag is. Az optimalizált módszer képes minimálisra csökkenteni az ilyen problémákat. A táptalaj felvitele a vékonyréteg lemezre, amúgyis nagy kihívás és kockázat a TLC réteg számára. Ezt a szennyezési veszélyt tovább fokozzuk, ha kontroll nélkül növesztett mikroba elegyet viszünk fel a TLC rétegre.

Korábban más élő rendszereknél (pl. élesztő [81], *Klebsiella aerogenes* [82]), már észlelték az intracelluláris ATP koncentráció oszcillációját.

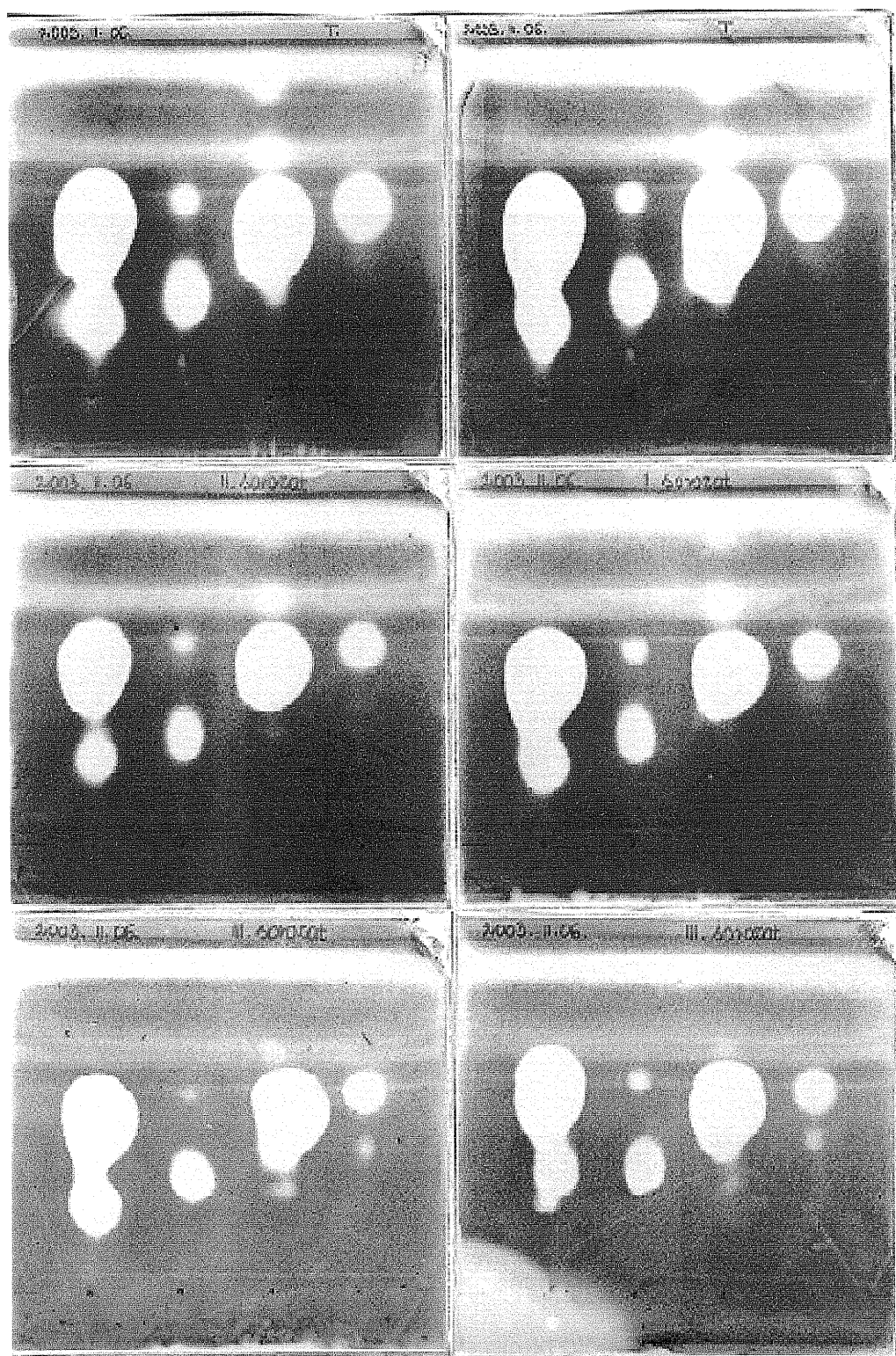
Kurokawa és munkatársai [83] *E. coli* szinkronizált kultúrában a fehérjéhez kötött ATP (ATP-dnaA) szint oszcillációját mutatták ki. (Prokariota sejtekben az ATP a replikációban szereplő dnaA proteinhoz kapcsolódik [84].) A replikáció kezdetén jelentős ATP-dnaA szint csökkenést észleltek, mely teljes összhangban van mért eredményeinkkel. A bemeztető mikroba szuszpenzióban észleltük az intracelluláris ATP koncentráció oszcillációját (az ATP szint a mérés szórását meghaladóan az idő függvényében periódikusan emelkedett és csökkent). A TLC lemezekon mért ATP szintek esetében nem tudtunk kimutatni szignifikáns ATP ingadozást. (Természetesen, ebben az esetben is lehetséges oszcilláció, de annak mértéke az alacsony csíraszám miatt a szórás határán belül van). Ennek a jelenségnek az észlelése és egyezése az

irodalomban talált megfigyelésekkel, jól mutatja a biolumineszcens ATP mérési módszer érzékenységét. Egyúttal kitűnően utal az egyes mikrobák egymástól különböző metabolikus folyamataira is. **Sherma [85] 2004-ben a vékonyréteg kromatográfiáról írott összefoglalójában, kiemeli optimalizálásunk fontosságát a bioautográfia antimikrobás detektálásában.**

Optimalizálásunk eredményességét szemlélteti a 15. ábra. A legújabb kutatási eredményeink igazolják Sherma megállapítását: a gyógyszertechnológiában a különféle antibiotikum-tartalmú gyógyszerformák hatóanyag-leadásának vizsgálatában új lehetőséget teremtettünk az optimalizált direkt bioautográfia **alkalmazásával.**

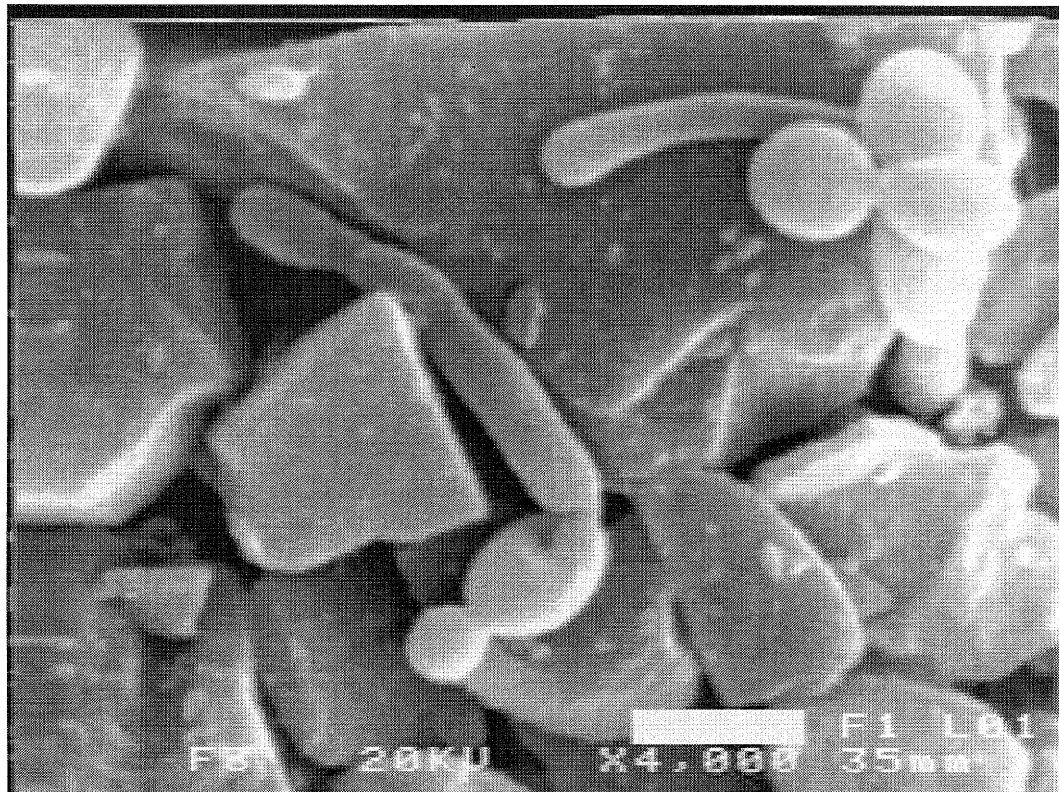
Hagyományosan az adott gyógyszerformából leadott hatóanyag **mennyiségét** detektálják (spektrofotometriás UV vagy HPLC elválasztás utáni UV detektálással), amely nem képes figyelembe venni az antibiotikum biológiai aktivitásának időbeli változását.

Összefoglaltam egy **új alkalmazás** kísérleti tapasztalatait: a **gyógyszer-hatóanyag leadás biológiai aktivitás követés** megvalósítására tett kísérleteinket, melyeket néhány fontos antibiotikum csoport jellegzetes képviselőjének, a ciprofloxacín (fluorokinolon), klaritromicin (makrolidok) és a doxiciklin (tetraciklinek) vizsgálata során kaptunk [86].



15. ábra. Optimált direkt bioautográfiával készült bioautogram. Teszbaktérium: *B. subtilis* (ATCC 6633), antibiotikumok: Ampicillin, Amoxicillin mindegyik 20-40 µg. Futtatószer: acetonitril – víz = 80 :20.

Direkt bioautogramról szkennung elektronmikroszkópos felvételt készítettünk (16. ábra). Kitűnően látható az antibiotikum fokozatos hatása a *C. albicans*-ra, az eredeti ovoid alak pszeudohyphará változott.



16. ábra. Bioautogram szkennung elektronmikroszkópos felvételén antibiotikum hatása látható *C. albicans*-ra (ATCC 90028), szilikagél TLC rétegen. Nagyítás: 4000x

Ez a módszer **további lehetőségeket rejt** a szokásostól eltérő életkörülmények közé került mikrobák, antibiotikumok és a TLC lemezek kölcsönhatásának tanulmányozására a direkt bioautográfiában.

5. Összefoglalás

5.1 Humán vörösvértestek ATP depléciója

A humán vörösvértestek esetében az élő sejt ATP és nátrium- , kálium- ionmiliő kapcsolatát vizsgáltuk a vörösvértestek integritásával összefüggésben. E vizsgálataink eredménye: a vörösvértestekben saját plazmájukban történő inkubálás (ATP depléciós modell) során jelentős, és valószínűleg **irreverzibilis intracelluláris K⁺ vesztes** csak 48 óras inkubálás után következett be, vagyis **ha 90%-os volt az ATP depléció** (ha az ATP szint a kezdeti érték 10%-ára csökkent). Az eredmények arra utalnak, hogy az **ATP vesztes** a vörösvértest **teljes makromolekuláris szerkezetét** befolyásolja, nemcsak egyes részeit.

5.2 Az ATP biolumineszcens mérése alkalmas módszer tesztmikrobák metabolikus aktivitásának követésére a direkt bioautográfia TLC rétegében is

Az ATP tartalmat a teljes mikrobiális fehérje értékekre vonatkoztattuk. A **mikrobák** optimális életfeltételeinek biztosításával igyekeztünk elérni a **log fázist a TLC lemezen**. Ehhez közvetlenül log fázisig növesztettük a mikrobákat, a TLC lemezek bemeztető mikroba szuszpenziójában. Így **jelentős mértékben csökkentettük a TLC lemezek 37°-on történő pára kamrás inkubálás idejét**, ezzel **nagymértékben növeltük a direkt bioautográfias módszer felhasználási területét**. Mint ismeretes, cellulóz vékonyrétegek alkalmasak erősen poláros vegyületek (szénhidrátok, karbonsavak, aminosavak, nukleinsav származékok) elválasztására. A cellulóz természetes királis tulajdonságai lehetővé teszik, hogy a cellulóz

vékonyrétegeket régóta alkalmazzák királis vegyületek szeparálására. Például lehetségessé vált a párakamrában korábbi módszerekkel leázó cellulóz rétegek felhasználása a direkt bioautográfiában. Az említetteken kívül lehetővé vált, poliamid vékonyrétegen ciklodextrinekkel kapcsolódott izomer vegyületek direkt bioautográfiás detektálása is (ez is fontos gyógyszerkutatási terület) [76].

Kísérleteink folyamán világossá vált, hogy **a tesztmikrobák optimális életkörülményei egymástól jelentősen eltérnek**. Ezért fontos azon tesztmikrobák adott típusára jellemző optimális életkörülmények meghatározása, amelyekkel dolgozunk. *E. coli* (Gram-negatív baktérium), *M. luteus*, *B.subtilis* (Gram-pozitív baktériumok) és *C. albicans* (sarjadzó gomba) mikrobák optimális életfeltételeit vizsgáltuk a direkt bioautográfia számára a bemelegítő szuszpenzióban és szilikagél TLC lemezen [61-63].

5.3 Szkenning elektronmikroszkópos felvétel direkt bioautogramról

Az elsők között készítettünk direkt bioautogramról szkenning elektronmikroszkópos felvételt, **amely új lehetőségeket nyit a további kutatások számára.**

5.4 Új módszer gyógyszerek in vitro antimikrobás hatóanyag-leadás biológiai aktivitás változás követésére

Tudomásunk szerint, az optimalizált bioautográfiás TLC-t **elsők között alkalmaztuk** antimikrobás hatással rendelkező **gyógyszerek in vitro hatóanyag kioldódásának követésére, mikrobiológiai detektálására** [86, 87]. Ez új módszert jelent a kioldódás vizsgálatok

tanulmányozásában. A biológiai aktivitást (a teszt mikroba növekedésének elősegítését vagy gátlását) közvetlenül TLC lemezeken detektálja (ha szükséges, egy megelőző TLC elválasztás után). Ez nagyjelentőségű a gyógyszerkutatókban az antimikrobás hatás vizsgálatára.

Így gyógyszerek stabilitása is detektálható. Ha a gyógyszer hatóanyagok metabolitjai antimikrobás hatással rendelkeznek, monitorozhatók ezzel a módszerrel.

5.5 BioAréna™ : az optimális TLC (OPLC) és az optimált bioautográfia együttes megvalósítása

A BioAréna™ egy komplex bioautográfias rendszer, amely a direkt bioautográfia eredményeit integrálja a vékonyréteg kromatográfia (TLC) professzionális módszerével, az OPLC-vel [14,80, 88-90]. Ez egy új elválasztási és detektálási rendszer, amely kiválóan hasznosítja a mikroba és festékvegyületek, kis- és makromolekulák közötti kölcsönhatási lehetőségeket. Ennek a módszernek a jobb megvalósítását is lehetővé teszi, az OPLC szeparálást követően a szorbens rétegen levő baktériumok életképességének vizsgálata.

Munkacsoportunk bioautográfiaiban végzett eredményeiből **könyvfejezetben (Springer) [23]** és a **2005-ben megjelent Encyclopedia of Analytical Science, Bioassays: Bioautography [91]** összefoglalót készítettünk, mely tartalmazza az újabban talált megfigyeléseinket is.

6. Ábrák és táblázatok

6.1 Ábrák

1. ábra

Az antimikrobás hatással rendelkező természetes anyagok kimutatásának módszerei

2. ábra

Toxikus anyagok TLC lemezeken történő néhány detektálási lehetősége

3. ábra

A direkt bioautográfia megvalósítása

4. ábra

Humán vörösvértestek átlagos térfogatának (MCV) és víztartalmának változása az idő függvényében, 37°C-os inkubálás folyamán

5. ábra

Az ATP és glükóz tartalom csökkenése mellett a K^+ , Na^+ és hemoglobin megoszlásának változása az intra- és extracelluláris tér között humán vörösvértestek esetében

6. ábra

A humán vörösvértestekből kiáramló komponensek koncentrációváltozás sebessége (%/óra) különböző időintervallumokban, 37 °C-on (A Na^+ esetében beáramlás van!)

7. ábra

A *B. subtilis* baktérium húslevesben történő tenyésztésekor észlelt ATP koncentráció oszcillációját mutatja

8. ábra

Különbéféle mikrobák maximális metabolikus aktivitásának eléréséhez szükséges legrövidebb időinek összehasonlítása a tenyésztési szuszpenzióban (TLC bemerítő szuszpenzió) mért mikroba ATP tartalom változása alapján

9. ábra

A folyékony táptalajban levő mikrobák élete (9.A ábra) és a TLC lemezen megkötött táptalajban (9.B ábra) folytatódik. A *B. subtilis* baktérium példáját mutatja az ábra.

10. ábra

Növekvő csíraszámú baktérium szuszpenzióba merített TLC lemezeken kialakult bioautogramok

(A TLC lemezeken a bemerítési baktérium szuszpenzió OD_{600nm} értékei láthatók zárójelben. Tesztbaktérium : *B. subtilis*. 37 °C-os inkubálás. Tesztantibiotikum: cefazolin 0,01 – 100ng.)

11. ábra

Bioautogram kialakulása a tesztmikrobák életképességének (ATP szintjének) követésével a *B. subtilis* példáján. Az ábra részletes magyarázata a szövegben az ábra megnevezésénél található.

12. ábra

A vizualitást biztosító legkisebb mikroba ATP koncentráció az MTT direkt bioautográfiában

13. ábra

A Gram-pozitív *B. subtilis* és a Gram-negatív *E. coli* baktérium szilikagél TLC lemezen meghatározott optimális metabolikus aktivitásának összehasonlítása

14. ábra

Előnyös és nem előnyös körülmények között készült direkt bioautográfiás TLC lemezek (bioautogramok) összevetése

15. ábra

Optimált direkt bioautográfiával készült bioautogram. Tesztbaktérium: *B. subtilis* (ATCC 6633), antibiotikumok: Ampicillin, Amoxicillin mindegyik 20-40 µg. Futtatószer: acetonitril – víz = 80 :20.

16. ábra

Bioautogram szkennung elektronmikroszkópos felvételén antibiotikum hatása látható *C. albicans*-ra (ATCC 90028), szilikagél TLC rétegen. Nagyítás: 4000x

6.2 Táblázatok**1. táblázat**

Az irodalmi adatok [64, 65] alapján végzett (A) és a javított módszerünk (B) műveleti időadatainak részletezése (óra)

2. táblázat

Az irodalmi adatok [64, 65] alapján végzett (A) és a javított módszerünk (B) műveleti időadatainak (óra) összehasonlítása

7. Irodalom

- [1] Encyclopaedia Britannica, 1997
- [2] Press Release: The 1997 Nobel Prize in Chemistry (Kungl. Vetenskapsakademien, The Royal Swedish Academy of Sciences)
- [3] *D.N. Bailey és J.R. Bove*, Chemical and hematological changes in stored CPD blood
Transfusion **15** (1975) 244-249.
- [4] *K. Nakao, T. Wada, T. Kamiyama, M. Nakao, K. Nagano*, A direct Relationship between Adenosine Triphosphate-level and in vivo Viability of Erythrocytes,
Nature **4831** (1962) 877-878.
- [5] *Y. Marikovsky*, The cytoskeleton in ATP-depleted erythrocytes: the effect of shape transformation,
Mechanisms of Ageing and Development **86** (1996) 137-144.
- [6] *R.R. Goodall, A.A. Levi*, A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture
Nature **4019** (1946) 675-676.
- [7] *B.J.R. Nicolaus, C. Coronelli, A. Binaghi*, Applicazione agli antibiotici della cromatografia su strato sottile,
Il farmaco **16** (1961) 349-370.
- [8] *R. Fischer, H. Lautner*, Zum paperchromatographischen Nachweis von Penicillinpräparaten,
Archiv der Pharmazie **294 / 66** (1961) 1-7.
- [9] *H. Kalász*, Az antibiotikumok kimutatása; Bioautográfiás kimutatás, A rétegekromatográfia zsebkönyve (szerk. Dr. Tyihák Ernő), Műszaki Könyvkiadó, Budapest 1979., 514-517.
- [10] *C.F. Poole*, Thin-layer chromatography: challenges and opportunities,
J. Chromatography A **1000** (2003) 963-984.
- [11] *J. L. Rios, M. C. Recio, A. Villar*, Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature
J. Ethnopharmacol. **23** (1988) 127 - 149.
- [12] *V. Betina*, Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field
J. Chromatography **78** (1973) 41 - 51.

- [13] *L. Botz, S. Nagy, B. Kocsis, L.Gy. Szabó*, Chromatographic aspects of direct bioautography and its use for detecting antimicrobial activity of compounds from higher plants. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **13/ Suppl 1** (1999) 359s
- [14] *E. Tyihák, Á.M. Móricz, P.G. Ott, Gy. Kátay, Zs. Király-Véghelyi*, The Potential of BioArena in the Study of the Formaldehyde, *J. Planar Chrom.* **18** (2005) 67-72.
- [15] *H. Nakayama, R. Hayashi*, Biosynthetic Pathway of Thiamine Pyrophosphate: a Special Reference to the Thiamine Monophosphate-Requiring Mutant and the Thiamine Pyrophosphate-Requiring Mutant of *Escherichia coli*, *J. Bacteriology* **112** (1972) 1118-1126.
- [16] *S.L. Naylor, R.J. Klebe, T.B. Shows*, Argininosuccinic aciduria: Assignment of the argininosuccinate lyase gene to the pter→q22 region of human chromosome 7 by bioautography *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS)* **75** (1978) 6159-6162.
- [17] *S.L. Naylor, R.J. Klebe*, Visualization of Isozymes by Bioautography, *Biochem. Genet.* **15** (1977) 1193-1211.
- [18] *A. Balinova*, Extension of the bioautograph technique for multiresidue determination of fungicide residues in plants and water *Anal. Chim. Acta* **311** (1995) 423-427.
- [19] *I.M. Choma, A. Choma, K. Staszczuk*, Determination of Flumequine in milk by thin-layer chromatography-bioautography *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **25** (2002) 1579-1587.
- [20] *I.M. Choma, A. Choma, I. Komanińska, K. Pilorz, K. Staszczuk*, Semiquantitative Estimation of Enrofloxacin and Ciprofloxacin by Thin-Layer Chromatography-Direct Bioautography, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **27** (2004) 2071-2085.
- [21] *J.N. Eloff, D.R.P. Katerere*, Isolation of an antibacterial stilbene from *Combretum woodii* (Combretaceae) leaves, *African J. of Biotechnology* **4** (2005) 1167-1171.
- [22] *F. Aqil, M.S.A. Khan, M. Owais, I. Ahmad*, Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of β -lactamase producing methicillin resistant *J. Basic Microbiol.* **45** (2005) 106-114.
- [23] *L. Botz, S. Nagy, B. Kocsis*, Detection of microbiologically active compounds: in *Planar Chromatography* (Ed.: Sz. Nyiredy) Springer, Budapest, 2001, pp. 489-516.

- [24] Lumineszcencia a biológiában és az orvostudományban (szerk. Szalay László és Damjanovich Sándor) 31.o., Akadémiai Kiadó, Budapest, 1983.
- [25] *J.W. Hastings*, Biological Diversity, Chemical Mechanisms, and the Evolutionary Origins of Bioluminescent Systems
J.Mol.Evol. **19** (1983) 309-321.
- [26] *B.R. Branchini, T.L. Southworth, M.H. Murtiashaw, H. Boije, S.E. Fleet*, A mutagenesis study of the putative luciferin binding site residues of firefly luciferase,
Biochemistry **42** (2003) 10429-10436.
- [27] *T. Nakatsu, S. Ichiyama, A. Saldanha, N. Kobashi, K. Sakata, H. Kato*, Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence,
Nature **440** (2006) 372-376.
- [28] *B.L. Strehler, J.R. Totter*,
Firefly Luminescence in the Study of Energy Transfer Mechanisms I.
Arch Biochem Biophys **40** (1952) 28 – 41.
- [29] *A. Lundin, A. Thore*, Analytical Information Obtainable by Evaluation of the Time Course of Firefly Bioluminescence in the Assay of ATP,
Anal Biochem **66** (1975) 47-63.
- [30] *W.D. McElroy, M. DeLuca*, Chemical and Enzymatic Mechanisms of Firefly Luminescence, pp. 285-311, eds. M.J.Cormier, D.M.Hercules, J. Lee, Plenum Press, New York, 1973.
- [31] *S.M. Steinberg, E.J. Poziomek, W.H. Engelmann, K.R. Rogers*, A review of environmental applications of bioluminescence measurements,
Chemosphere **30** (1995) 2155-2197.
- [32] *D.M. Karl*, Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology
Microbiol Rev **44** (1980) 740 – 796.
- [33] *Y. Maehara, H. Anai, R. Tamada, K. Sugimachi*, The ATP assay is more sensitive than the succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability
Eur J Cancer Clin Oncol **23** (1987) 273 – 276.
- [34] *F.R. Ahmann, H.S. Garewal, R. Schiffman, A. Celniker and S. Rodney*, Intracellular adenosine triphosphate as a measure of human tumor cell viability and drug modulated growth,
In Vitro Cellular and Developmental Biol **23** (1987) 474 – 480.

- [35] *L. Kangas, M. Grönroos, A.L. Nieminen*, Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents in vitro
Med Biol **62** (1984) 338 - 343.
- [36] *B.U. Sevin, Z.L. Peng, J.P. Perras, M. Ganje, M. Penalver, H.E. Averette*, Application of an ATP-Bioluminescence Assay in Human Tumor Chemosensitivity Testing
Gynecol. Oncology **31** (1988) 191 - 204.
- [37] *L. Möllgård, U. Tidefelt, B. Sundman-Engberg, C. Löfgren, C. Paul*, In vitro chemosensitivity testing in acute non lymphocytic leukemia using the bioluminescence ATP assay,
Leukemia Res **24** (2000) 445 - 452.
- [38] *H. Yamaue, H. Tanimura, T. Tsunoda, M. Tani, M. Iwahashi, K. Noguchi, M. Tamai, T. Hotta and K. Arai*, Chemosensitivity Testing with Highly Purified Fresh Human Tumour Cells with the MTT Colorimetric Assay,
Eur.J.Cancer **27** (1991) 1258 – 1263.
- [39] *C. Weins, H. Jork*, Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography
J.Chrom.A **750** (1996) 403-407.
- [40] *A. Marston, J. Kissling, K. Hostettmann*, A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitor in Plants
Phytochem. Anal. **13** (2002) 51-54.
- [41] *I.A. Ramallo, S.A. Zacchino and R.L.E. Furlan*, A rapid TLC Autographic Method for the Detection of Xanthine Oxidase Inhibitors and Superoxide Scavengers,
Phytochem. Anal. (in press) 2005
- [42] *A.W. Nineham*, The chemistry of formazane and tetrazolium salts, in:
Chemical Reviews **55** (1955) 355-483.
- [43] *E.M. Massa and R.N. Farías*, Effect of phospholipids, Triton X-100 and biological membranes on redox systems involving tetrazolium salt reduction Its implications for the assay of enzymatic activities,
Biochem. Biophys.Res.Comm. **104** (1982) 1623-1629.
- [44] *U.H. Bergmeyer*, Redox Reactions With NAD(P)H as Intermediate Methods of Enzymatic Analysis. 3rd edn, Vol I., Fundamentals, Verlag Chemie, Weinheim, 1974, pp.198-209.
- [45] *R. Kuhn und D. Jerchel*, Invertseifen VIII. Reduction von Tetrazoliumsalzen durch Bakterien, gärende Hefe und keimende Samen,
Ber.dt.chem. Ges. **74** (1941) 949-952.

- [46] *J. Zhang and X. Liu*, Study on tetrazolium salt colorimetric assay for growth and survival of bacteria,
Wei Sheng Yan Jiu **31** (2002) 361-3.
- [47] *R.D. Petty, L.A. Sutherland, E.M. Hunter, I.A. Cree*, Comparison of MTT and ATP-Based Assays for the Measurement of Viable Cell Number
J Biolumin Chemilumin **10** (1995) 29-34.
- [48] *J.G. Gibson, S.B. Rees., T.J. McManus, és W.A Scheitlin*, A citrate-phosphate-dextrose solution for the preservation of human blood
Am.J.Clin.Pathol **28** (1957) 569-578.
- [49] *G.L. Moore, M.E. Ledford and A. Merydith*, A micromodification of the Drabkin hemoglobin assay for measuring plasma hemoglobin in the range of 5 to 2000 mg/dl
Biochem Med **26** (1981) 167 – 173.
- [50] *T. Kőszegi*, Rapid Bioluminescent Measurement of Human Erythrocyte ATP Content
Clin.Chem. **34** (1988) 2578.
- [51] *T. Kőszegi, M. Kellermayer, F. Kövecs., K. Jobst*, Bioluminescent Monitoring of ATP Release from Human Red Blood Cells Treated with Nonionic Detergent
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. **26** (1988) 599 - 604.
- [52] *G.K. Turner*, in: *Bioluminescence and chemiluminescence: instruments and applications* (Van Dyke K. ed.), Boca Raton, Florida: CRC Press 1985: 56.
- [53] *P.E. Stanley*, A Review of Bioluminescent ATP Techniques in Rapid Microbiology,
J. Bioluminescence and Chemiluminescence **4** (1989) 375 – 380.
- [54] *A.S. Bagnara, L.R. Finch*, Quantitative Extraction and Estimation of Intracellular Nucleoside Triphosphates of *Escherichia coli* ,
Anal. Biochem. **45** (1972) 24 – 34.
- [55] *G. Guinn, M.P. Eidenbock*, Extraction, purification, and Estimation of ATP from Leaves, Floral Buds, and Immature Fruits of Cotton,
Anal. Biochem. **50** (1972) 89 – 97.
- [56] *A. Lundin, A. Thore*, Comparison of Methods for Extraction of Bacterial Adenine Nucleotides Determined by Firefly Assay,
Appl. Microbiology **30** (1975) 713 – 721.
- [57] *M.M. Bradford*, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,
Anal. Biochem. **72** (1976) 248 - 254.

- [58] *M. Hoppert and A. Holzenburg*, Electron Microscopy in Microbiology, Handbooks 43. Bios Scientific Publishers, page 79 – 82, 1998.
- [59] *T. Fujita, J. Tokunaga, H. Inoue*, Atlas of Scanning Electron Microscopy in Medicine, Ikagu Shoin Ltd. Tokyo, Elsevier Publishing Company, Amsterdam – London – New York, page 2, 1971
- [60] *L. Wood, E. Beutler*, Temperature dependence of sodium-potassium activated erythrocyte adenosine triphosphatase, Lab. Clin. Med. **70** (1967) 287-294.
- [61] *S. Nagy, T. Kőszegi, L. Botz, B. Kocsis*, Optimization of Conditions for Culture of the Test Bacteria Used for Direct Bioautographic TLC Detection. 2. The Gram-negative Test Bacterium: *Escherichia coli*, J. Planar Chrom. **16** (2003) 121-126.
- [62] *S. Nagy, B. Kocsis, T. Kőszegi, L. Botz* Determination of Optimum Conditions for Test Microbes Used in Direct Bioautographic TLC Detection 3. Test Fungus: *Candida albicans*, 4. Comparison and summary of detections with Gram-negative and Gram-positive bacteria and fungi. 2006 (közlésre összeállítva)
- [63] *S. Nagy, B. Kocsis, T. Kőszegi, L. Botz*, Optimization of Conditions for Culture of the Test Bacteria Used for Direct Bioautographic Detection. 1. The Gram-positive Test Bacterium *Bacillus subtilis*, J. Planar Chrom. **15** (2002) 132-137.
- [64] *M.O. Hamburger and G.A. Cordell*, A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity J. Natural Products **50** (1987) 19 - 22.
- [65] *R. Eymann, H.E. Hauck*, Chrom Biodip® Antibiotics – A High-Performance Bioautographic Test Kit, Proceedings of the International Symposium on Planar Separations, Planar Chromatography 2000, 67 - 75, Lillafüred, Hungary
- [66] *G.N. Ling*, Physical Theory of the Living State: the Association-Induction Hypothesis, Blaisdell Publishing Company, New York, London (1962) 253-254.
- [67] *G.N. Ling and Y. Fu*, What Befalls the Proteins and Water in Living Cell When the Cell Dies? Physiol.Chem.Phys.& Med.NMR **37** (2005) 141-158.
- [68] *P. Bogner, E. Nagy, A. Miseta*, On the Role of Na,K-ATPase: a challenge for the Membrane-Pump and Association-Induction Hypotheses Physiol.Chem.Phys.& Med.NMR **30** (1998) 81-87.

- [69] *M. Kellermayer, A. Ludány, K. Jobst, Gy. Szűcs, K. Trombitás, C.F. Hazlewood*, Cocompartmentation of Proteins and K^+ within the Living Cell,
Proc.Natl.Acad.Sci. USA **83** (1986) 1011-1015.
- [70] *M. Kellermayer, A. Ludány, A. Miseta, T. Kőszegi, G. Berta, P. Bogner, C.F. Hazlewood, I.L. Cameron, D.N. Wheatley*, Release of Potassium, Lipids, and Proteins From Nonionic Detergent Treated Chicken Red Blood Cells
J. Cell. Physiol. **159** (1984) 197-204.
- [71] *S. Nagy, M. Paál, T. Kőszegi, A. Ludány, M. Kellermayer*, ATP and Integrity of Human Red Blood Cells
Phys.Chem.Phys.Med.NMR **30** (1998) 141-148.
- [72] *N.S. Gov and S.A. Safran*, Red Blood Cell Membrane Fluctuations and Shape Controlled by ATP-Induced Cytoskeletal Defects,
Biophys. J. **88** (2005) 1859-1874.
- [73] *T. Kőszegi, J. Petrik, S. Valdimir-Knezevic, S. Nagy*, Bioluminescent co-determination of ATP and proteins in Triton X 100 nonionic detergent opened monolayer cultured cells (közlésre összeállítva)
- [74] *G.C. Leitner, M. Neuhauser, G. Weigel, S. Kurze, M.B. Fischer, P. Höcker*, Altered intracellular purine nucleotides in gamma-irradiated red blood cell concentrates,
Vox Sanguinis **81** (2001) 113-118.
- [75] *C.F. Poole, S.K. Poole*, Chromatography today, Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo 1981, page 681.
- [76] *D.W. Armstrong*, J. Liq. Chromatogr. **3** (1980) 895.
- [77] *J. Sherma, B. Fried* (Ed.) Handbook of Thin-Layer Chromatography Lafayette College Easton, Pennsylvania, 1991, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, Chromatographic Sciences Series Vol. 55
- [78] *G. Toennies, H.G. Frank and D.L. Gallant*, Single system for measuring growth responses of three organisms to folacin and related factors,
Growth **16** (1952) 287-295.
- [79] *E. Usdin, G.D. Schockman and G. Toennies*, Tetrazolium Bioautography,
Applied Microbiology **2** (1954) 29-33.
- [80] *E. Tyihák, L. Botz, S. Nagy, B. Kocsis, E. Mincsovcis*, BioArena™ as a Complex Bioautographic System, Proceedings of the International Symposium on Planar Separations, Planar Chromatography 2001, 3 - 13, Lillafüred, Hungary

- [81] *P.M. Doran és J.E. Bailey*, Effect of Immobilization on the Nature of Glycolytic Oscillation in Yeast
Biotechnology and Bioengineering **29** (1987) 892-897.
- [82] *C.P.P. Bowden and A.M. James*, Microcalorimetry studies of energy changes during the growth of *Klebsiella aerogenes* in simple salts/ glucose media; correlation of specific power and size of the ATP pool,
Microbios **43** (1985) 93-105.
- [83] *K. Kurokawa, S. Nishida, A. Emoto, K. Sekimizu and T. Katayama*, Replication cycle – coordinated change of the adenine nucleotide-bound forms of DnaA protein in *Escherichia coli*,
The EMBO J. **18** (1999) 6642-6652.
- [84] *V. Ádám, L. Dux, A. Faragó, L. Fesüs, R. Machovich, J. Mandl, B. Sümegi*, szerk. : V. Ádám, Orvosi biokémia,
Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2001, 336-343.
- [85] *J. Sherma*, Planar Chromatography,
Anal. Chem. **76** (2004) 3251 – 3262.
- [86] *A. Dévay, B. Kocsis, Sz. Pál, A. Bodor, K. Mayer, S. Nagy*,
New method for microbiological detection of delivery process from dosage forms containing antibiotics,
Eur.J. Pharm. Sci. **25** (2005) S81-S83.
- [87] *A. Dévay, B. Kocsis, Sz. Pál, A. Bodor, K. Mayer, S. Nagy*,
A new microbiological detection method for investigation of dissolution from antibiotic drug delivery systems, 2006
(közlésre elküldve)
- [88] *E. Tyihák, P. Ott, Á.Móricz, Gy. Kátay,, Zs. Király-Véghelyi*,
Antibiosis, Antibiotics, and Formaldehyde Cycle: Unique Importance of Planar Chromatographic Techniques in this Progress Direction
International Symposium on Planar Separations, Planar Chromatography 2003, 61 - 70, Budapest, Hungary
- [89] *E. Tyihák, L. Botz, P. Ott, S. Nagy, B. Kocsis, Zs. Király-Véghelyi, E. Mincsovics*,
The Combination of the Overpressured Layer Chromatography and Bioautography and Its Applications to the Analysis of Molecules Influencing Cell Proliferation
Chem Anal (Warsaw) **48** (2003) 543-553.
- [90] *E. Tyihák, L. Trézl, B. Szende*,
Ann. N.Y. Acad. Sci. **851** (1998) 259-270.
- [91] *L. Botz, B. Kocsis, S. Nagy*: Bioautography, BIOASSAYS in Encyclopedia of Analytical Science, Second Edition (Paul J. Worsfold, Alan Townshend and Colin F. Poole, eds.)
Elsevier, Oxford (2005) Vol. 1, pp. 271-276.

A témában megjelent saját publikációk jegyzéke

Cikkek

S. Nagy, M. Paál, T. Kőszegi, A. Ludány, M. Kellermayer,
ATP and Integrity of Human Red Blood Cells
Phys.Chem.Phys.Med.NMR **30** (1998) 141-148. (IF 0,854)

S. Nagy, B. Kocsis, T. Kőszegi, L. Botz, Optimization of Conditions for Culture of the Test Bacteria Used for Direct Bioautographic Detection.
1. The Gram-positive Test Bacterium *Bacillus subtilis*,
J Planar Chrom **15** (2002) 132-137. (IF 1,047)

S. Nagy, T. Kőszegi, L. Botz, B. Kocsis, Optimization of Conditions for Culture of the Test Bacteria Used for Direct Bioautographic TLC Detection. 2. The Gram-negative Test Bacterium: *Escherichia coli*,
J Planar Chrom **16** (2003) 121-126. (IF 0,879)

E. Tyihák, L. Botz, P. Ott, S. Nagy, B. Kocsis, Zs. Király-Véghelyi, E. Mincsovics,
The Combination of the Overpressured Layer Chromatography and Bioautography and Its Applications to the Analysis of Molecules Influencing Cell Proliferation
Chem Anal (Warsaw) **48** (2003) 543-553. (IF 0,539)

S. Nagy, B. Kocsis, T. Kőszegi, L. Botz Determination of Optimum Conditions for Test Microbes Used in Direct Bioautographic TLC Detection
3. Test Fungus: *Candida albicans*, 4. Comparison and summary of detections with Gram-negative and Gram-positive bacteria and fungi.
(közlésre elküldve)

T. Kőszegi, J. Petrik, S. Valdimir-Knezevic, S. Nagy, Bioluminescent co-determination of ATP and proteins in Triton X 100 nonionic detergent opened monolayer cultured cells (közlésre összeállítva)

A. Dévay, B. Kocsis, Sz. Pál, A. Bodor, K. Mayer, S. Nagy,
A new microbiological detection method for investigation of dissolution from antibiotic drug delivery systems (közlésre elküldve)

Könyvfejezetek:

L. Botz, S. Nagy, B. Kocsis, Detection of microbiologically active compounds: in Planar Chromatography (Ed.: Sz. Nyiredy) Springer, Budapest, 2001, pp. 489-516.

L. Botz, B. Kocsis, S. Nagy: Bioautography, BIOASSAYS in Encyclopedia of Analytical Science, Second Edition (Paul J. Worsfold, Alan Townshend and Colin F. Poole, eds.) Elsevier, Oxford (2005) Vol. 1, pp. 271-276.

Absztraktok impakt faktoros folyóiratban

L. Botz, S. Nagy, B. Kocsis, L.Gy. Szabó, Chromatographic aspects of direct bioautography and its use for detecting antimicrobial activity of compounds from higher plants.

Fundamental & Clinical Pharmacology **13/** Suppl I (1999) 359s
(IF 0,810)

A. Dévay, B. Kocsis, Sz. Pál, A. Bodor, K. Mayer, S. Nagy, New method for microbiological detection of delivery process from dosage forms containing antibiotics,

Eur.J.Pharm.Sci. **25** (2005) S81-S83. (IF 1,949)

A témához kapcsolódó kongresszusi előadások, poszterek jegyzéke

Nagy, S., Miseta A., Kőszegi T.

Kemilumineszcenciás és folyadékkromatográfiás ATP mérés emberi vörösvértetekben

XVII. Országos Lumineszcencia-spektroszkópia Konferencia, Pécs, 1995

Botz L., Nagy S., Kocsis B.

Növényi kivonatok antimikrobás hatásának vizsgálata

Pécsi Fitoterápiás Napok, 1996

Nagy S., Paál M., Kőszegi T., Ludány A., Kelermayer M.

Az emberi vörösvértest ATP tartalmának követése

kemilumineszcenciás módszerrel

XX. Országos Lumineszcencia Spektroszkópia Konferencia,
Balatonföldvár, 1997

Nagy S., Szabó I., Kőszegi T.

Egyszerű módszer sejtkultúrák ATP tartalmának

biolumineszcens mérésére

XXI. Országos Lumineszcencia Spektroszkópia Konferencia,
Balatonföldvár, 1998

Botz, L., Nagy, S., Kocsis, B., Horváth, Gy.

Planar Chromatographic Aspects of Direct Bioautography,

in: Sz. Nyiredy (Ed.) Proc.Int.Symp. Planar Chromatography,
Planar Chromatography 2000, Lillafüred, Hungary pp.77-87.

Tyihák, E., Botz, L., Nagy, S., Kocsis, B., Mincsvics, E.

BioArena™ as a Complex Bioautographic System,

in: Sz. Nyiredy (Ed.) Proc.Int.Symp. Planar Chromatography,
Planar Chromatography 2001, Lillafüred, Hungary, pp.3-13.

Nagy, S., Kocsis, B., Kőszegi, T. Botz, L.

Optimal Life Condition of Test Bacteria for Direct Bioautographic Detection. in: Sz. Nyiredy (Ed.) Proc.Int.Symp. Planar Chromatography, Planar Chromatography 2001, Lillafüred, Hungary, pp.173-179.

Nagy, S., Kocsis, Dolgos, B., Kőszegi, T. Botz, L.

Optimized Detection Condition for Direct Bioautography
Proc. Int. Symp. Planar Separation, Planar Chromatography
2003, Budapest, Hungary

A témában megjelent saját publikációk, könyvfejezet, absztraktok
impakt faktoros folyóiratban

Optimization of Conditions for Culture of the Test Bacteria Used for Direct Bioautographic Detection.

1. The Gram-Positive Test Bacterium *Bacillus subtilis*

Sándor Nagy*, Béla Kocsis, Tamás Kőszegi, and Lajos Botz

Key Words:

TLC

Direct bioautography

Dehydrogenase activity-detecting reagent

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

Adenosine-5'-triphosphate (ATP)

Bioluminescent ATP assay

Thin layer destruction

Summary

The main purpose of this study was to determine optimum conditions for culture of a test microbe *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) which enabled us to establish its use for direct bioautography. The viability of the bacteria on TLC plates was measured on the basis of their adenosine-5'-triphosphate (ATP) content as determined by bioluminescent luciferin/luciferase assay, the data being referred to values for total bacterial protein. In the first experiments, we used a '20-h' culture of *B. subtilis* prepared by dilution of an optical density (OD) $\gg 0.4$ culture to furnish a culture of $OD = 0.4$ (Method A). Later, on the basis of our optimization experiments we found that a '5-9-h' broth culture of *B. subtilis* was suitable. Under these conditions the bacteria remained in the log phase ($OD = 0.2-0.4$) for 5-9 h (Method B) in immersion bacterial suspension. Because the test bacteria were in the log phase a much shorter incubation time (4-8 h) was sufficient for TLC plates instead of the original 18 h in a previous study. One advantage of this method, in addition to the shorter incubation time, is that we can use TLC plates coated with adsorbents other than silica.

1 Introduction

Bioautographic methods (contact, immersion, and direct) are based on the biological - antibacterial, antitumor, antiprotozoae, etc. - effects of the substances under study [1, 2]. The steps of direct bioautography - separation, preconditioning, seeded incubation, and visualization - are performed on the chro-

matography plates. The main benefit of direct bioautography is that it gives information about the antimicrobial properties of a compound separated from a complex material containing different substances [3].

In direct bioautography the test microorganisms grow directly on the developed TLC plate. For visualization and location of antibacterial activity we exploit the capacity of dehydrogenases of living microorganisms to convert tetrazolium salts into the corresponding, intensely colored, formazan. Antibacterial compounds on the TLC plate kill the test bacteria and appear as clear spots against a colored background. The presence of detergents (for example Triton X-100) accelerates the reduction of tetrazolium salts manyfold [4-7].

Formerly agar gel was almost essential for direct bioautography - TLC plates were employed for separation only. Agar gel containing the test bacteria was poured on to the surface of a developed TLC plate to enable contact between the bacteria and antimicrobial substances. Working with agar gel containing living test bacteria is a complicated task - the agar layer dilutes the antibacterial compounds and reduces the sensitivity of direct bioautography. In this paper we will show that direct bioautography is possible without agar gel. We will also show that for direct bioautography the test bacteria must be in logarithmic phase on the TLC plate. We must, therefore, cultivate the test organisms in broth and immerse the developed plates in this broth culture.

The viscosity of the culture broth is also important [8]. If the broth is not sufficiently viscous the culture medium can run off the plate surface during the immersion process and wash test compounds from the plate, resulting in poorly visible inhibition zones.

The broth medium captured by the silica particles of the TLC plates acts as a source of food and energy for the test bacteria.

S. Nagy, Pécs University, Faculty of General Medicine, 1st Internal Medicine, H-7624 Pécs, Ifjúság út 13, Hungary; B. Kocsis, Pécs University, Faculty of General Medicine, Department of Medical Microbiology and Immunology, H-7643 Pécs, Szigeti út 12, Hungary; T. Kőszegi, Pécs University, Faculty of General Medicine, Department of Clinical Chemistry, H-7624 Pécs, Ifjúság út 13, Hungary; and L. Botz, Pécs University, Faculty of General Medicine, Pharmacy Center, H-7624 Pécs, Honvéd u. 3, Hungary.

There is no doubt that the use of optimized living conditions and the viability of the test bacteria are important for correct bioautographic evaluation. Despite many good publications on bioautography, test bacteria living conditions on TLC plates have hardly been examined.

Within the microbial cell the concentration of ATP (adenosine-5'-triphosphate) plays a special role, not only as an energy source but also as a regulator. ATP determination has been one of the best methods of checking the viability of eukaryotic cells and bacteria for a long time [9, 10]. We supposed that the bioluminescent ATP assay was suitable and sufficiently sensitive for study of conditions affecting the viability of test bacteria on TLC plates also. The chosen gram-positive test bacterium, *B. subtilis* ATCC 6633, is a microbe very sensitive to most antibacterial agents. This strain is generally used in antibacterial sensitivity tests.

The major aim in our experiments was to determine the conditions with the largest effect on direct bioautography without use of agar gel. We studied the following conditions in dipping bacterial suspension:

- optimum optical density (OD_{600nm}) range of the culture used to dip the TLC plates;
- optimum immersion time for TLC plates and
- the number of TLC plates which can be dipped into the same dipping bacterial suspension.

We studied the following conditions on the TLC plates:

- the proper incubation time for *B. subtilis* on TLC plates;
- optimum range of ATP/protein ratio (in dipping bacterial suspension also); and
- the minimum bacterial activity as a detection limit for successful functioning of the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) used for visualization in direct bioautography.

2 Experimental

2.1 Chemicals

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA), Cefazolin (Totacef) was from Bristol-Myers Squibb (Sermoneta (Latina) Italy) and Triton X-100, non-ionic detergent, was from Merck (Darmstadt, Germany). Ethanol was purchased from Reanal (Budapest, Hungary).

2.2 Microorganism and Medium

The test strain, obtained from the American Type Culture Collections, was *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Mueller-Hinton broth, pH = 7.3 ± 0.2 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) was used for cultivation. The broth (100 mL) in a 500-mL flask was inoculated with 5 mL broth suspension of *B. subtilis* ATCC

6633 containing 10⁵ colony-forming units (c.f.u.) mL⁻¹. The flask was incubated in an incubator shaker at 37°C and 100 r.p.m. In *Method A* we used a culture of *B. subtilis* made by dilution of an $OD \gg 0.4$ culture to furnish $OD = 0.4$. Later, in *Method B* we used a culture of *B. subtilis* grown freshly to the log phase ($OD = 0.2-0.4$, during 5–9 h).

2.2.1 Determination of the Number of Colony-Forming Units

Ten μ L of cultures were diluted in tubes containing physiological saline (1 mL) solution and a 100-fold dilution series was prepared. Bacterial suspension from each tube (10 μ L) was plated on Mueller-Hinton agar media. After incubation (24 h, 37°C) the number of colonies was determined and multiplied by the degree of dilution.

2.3 Bioautography

TLC was performed on aluminum foil-backed plates coated with silica gel 60F₂₅₄ (Merck #1.05554), with aluminum oxide 60F₂₅₄ with cellulose (HPTLC plates, Merck #16092), and with polyamide 11F₂₅₄. All were cut into 10 cm × 10 cm plates.

2.3.1 Modes of Sample Application

Cefazolin (0.01–100 ng) was applied to plates as test substance and the undeveloped plates were dipped and dried.

2.4 Determination of Bacterial Viability in Immersion Suspension

Bacillus subtilis strain was grown in Mueller-Hinton broth and incubated in an incubator shaker (New Brunswick, NJ, USA) at 37°C (details are given in Section 2.2). Bacterial number was followed by spectrophotometry (Perkin-Elmer C4B) by determining the OD at 600 nm. Viability testing began at a minimum $OD = 0.1$ (600 nm); 50 mL portions were taken for immersion of TLC plates with spots containing different amounts of cefazolin. In the immersing bacterial suspension ATP was determined by the bioluminescence method [11–14] and protein content by protein-dye binding (Coomassie brilliant blue G-250) assay [15].

2.5 Determination of Bacterial Viability on the TLC Plate

B. subtilis strain was grown in Mueller-Hinton broth at 37°C (details are given in Section 2.2). When the OD reached the minimum value (0.2) at 600 nm a few TLC plates were immersed into 50 mL bacterial suspension and bacteria were grown further on the TLC plates. The TLC plates were processed individually after different times. Part of their silica surface (6 cm²) was removed by scraping for ATP and protein determination. The inhibition spots of cefazolin on the unscratched surface of the plates were then visualized by MTT as part of the bioautographic process.

In the scraped silica the bacterial viability was determined by ATP bioluminescent assay in accordance with the work of

Stanley [11], Lundin [12], Turner [13], and Kőszegi [14]. Scraped samples were added to cold perchloric acid (7%, w/w; 0.5 mL) which was then frozen immediately (within 30 s) at -70°C . Protein content was determined by the method of Bradford [15] by means of a protein-dye binding (Coomassie brilliant blue G-250) assay.

3 Results and Discussion

3.1 Determination of the Optimum $OD_{600\text{nm}}$ Range of the Culture Used for Dipping of TLC Plates

The TLC plates were immersed in bacterial suspension of different $OD_{600\text{nm}}$. ATP/protein ratio was determined in the dipping bacterial suspension and on the TLC plate after immersion and incubation for 18 h at 37°C . (These conditions were obtained from the literature [8, 16].) To achieve maximum metabolic activity of test bacteria, i.e. to achieve the maximum ratio of ATP/protein on the TLC plate, the $OD_{600\text{nm}}$ in the immersing suspension of *B. subtilis* must be 0.2–0.5 ($5\text{--}15 \times 10^6$ c.f.u. mL^{-1}). The maximum ATP/protein ratio was 7–14 nmol mg^{-1} . In further experiments, therefore, TLC plates were immersed in *B. subtilis* suspension with $OD_{600\text{nm}} = 0.2\text{--}0.5$ and the plates were incubated for 18 h at 37°C .

3.2 Determination of the Optimum Immersion Time for Plates

Silica TLC plates were dipped into *B. subtilis* suspension ($OD_{600\text{nm}} = 0.2\text{--}0.5$) for 0, 5, 10, and 20 s. Dipping for 10 s was usually the most suitable on the basis of maximum metabolic activity on TLC plates dipped into $OD_{600\text{nm}} = 0.4$ bacterial suspension. Summarizing our results, if immersion times were longer the sample compounds could be washed from the plates and the thin layer could be soaked off.

3.3 Determination of the Number of TLC Plates which Can be Dipped into 50 mL Bacterial Suspension ($OD_{600\text{nm}} = 0.2$)

For 10 s dipping time we observed that for a given bacterial number and ATP/protein ratio we could develop readily visible, undeformed inhibition spots of the antibacterial compounds by MTT. On the last three of ten plates, however, the ATP/protein ratio and the intensity of the blue color of formazan were decreasing. So under these conditions seven plates can be safely dipped.

3.4 Determination of the Optimum Incubation Time for *B. subtilis* on TLC Plates

The minimum number of bacteria ($OD_{600\text{nm}} = 0.2$) was reached directly in the dipping bacterial suspension after 5 h incubation (Figure 1) and TLC plates were immersed into this logarithmic phase suspension. This figure shows the beginning of the log

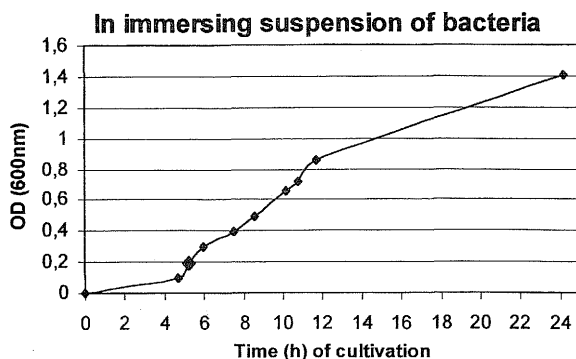


Figure 1

Dependence on time of bacterial growth ($OD_{600\text{nm}}$) in immersing suspension – change of $OD_{600\text{nm}}$ (bacterial number) as a function of cultivation time in the immersing suspension of *B. subtilis* (ATCC 6633).

phase in *B. subtilis* culture. The viability of the test bacteria (ATP/protein ratio) was checked on TLC plates. These data are given as a function of the incubation time of seeded TLC plates after dipping into *B. subtilis* culture ($OD_{600\text{nm}} = 0.2$, Figure 2). Bacterial life continued on (and in) the TLC plates. The concentration of protein increased continuously for 12 h. Later protein degradation (most probably) was detected. We hypothesize that after consumption of glucose in the TLC plate trapped broth proteins and amino acids are used as an energy source by bacteria. The ATP concentration oscillated as a function of time. This surprising and interesting phenomenon has also been found in other living systems [17]. The ATP/protein ratio reached a maximum after 8.5–9.5 h and not after 18 h, the incubation time given in the literature.

3.5 Determination of the Optimum ATP/Protein Ratio both in the Dipping Bacterial Suspension and on TLC Plates

The ATP/protein ratio in the dipping bacterial suspension was 7–14 nmol mg^{-1} ; on the TLC plate it was 10–20 nmol mg^{-1} during the time interval examined (Figure 2).

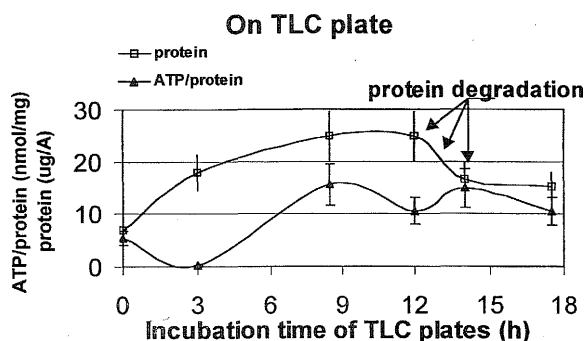


Figure 2

ATP/protein ratios on TLC plates as a function of incubation time. ATP/protein ratios [nmol mg^{-1}] on TLC plates as a function of the time of incubation of TLC plates after immersion into *B. subtilis* culture suspension ($OD_{600\text{nm}} = 0.2$); the area, A , = 6 cm^2 of the surface of the silica TLC plate (details are given in the text). It is apparent that growth of *B. subtilis* continued on (and in) the TLC plate.

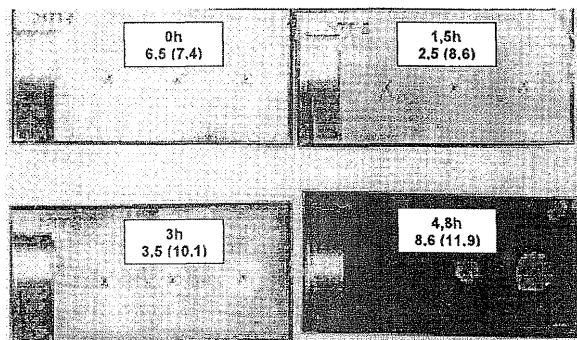


Figure 3

Optimization of the incubation time of bacteria on TLC plates for MTT reaction. Direct bioautography on TLC plates by use of the MTT reaction (Method B). The upper numbers denote the time of incubation of seeded plates at 37°C – 0, 1.5, 3, or 4.8 h. The lower numbers show the ATP/protein ratio [nmol mg⁻¹]. Values of the protein content [µg/6 cm²] are given in parentheses. Development of the bioautogram after 4.8 h incubation of the seeded TLC plates gives the best result.

The viability of test bacteria was maximum on seeded TLC plates after an incubation time (8.5 h, 37°C) much shorter than that given in the literature. For maximum viability (ATP/protein) on the silica TLC plate the OD_{600nm} of the dipping bacterial suspension must be at least 0.2 (5×10^6 c.f.u. mL⁻¹).

If the bacteria were grown in suspension until $OD_{600nm} = 0.4$ the incubation time was even shorter – 4.8 h was enough for direct

Table 1

Execution time data for direct bioautography from the literature (Method A) and for our improved method (Method B). The shorter incubation times on the plates are shown in bold. These incubation times depend on the OD_{600nm} of the bacterial suspension used for immersion. OD_{600nm} values are given in italics between parentheses.

Method	Time [h]				
	Growth		(OD_{600nm}) In suspension	MTT On plate	Total
	In broth for dipping	On plate			
A	20	18	<i>(0.4)^{a)}</i>	1	39
B	5.5	18	<i>(0.2)</i>	1	24.5
	5.5	8.5	<i>(0.2)</i>	1	15
	7.5	4.8	<i>(0.4)</i>	1	13.3

^{a)}Dilution of *B. subtilis* broth culture from $OD_{600nm} \gg 0.4$

bioautography on TLC plates. This result is shown in **Figure 3**. Development of the bioautogram can be seen after incubation of seeded TLC plates for 4.8 h. This incubation time for plates is one third of that previously described and used (18 h). This shorter incubation time is advantageous, because the possibility of destruction of the layer on TLC plates is obviously reduced. This means that silica plates can be used without pretreatment

Table 2

Detailed summary of execution time data for direct bioautography by the literature method (Method A) and by use of our improvement (Method B). The different times are indicated in bold. Preparation of TLC plates and bacterial cultures for dipping was performed at the same time.

		Time [h]	
		Method A	Method B
Test bacteria	Growth in broth for dipping	20	5.5–7.5
	Dilution to $OD_{600nm} = 0.4$	0.1	0
TLC	Pretreatment of adsorbent (120°C)	3	(3) ^{a)}
	Sample application	0.2	0.2
	Development of plates	0.5	0.5
	Drying of adsorbent	0.2	0.2
	Detection and densitometry	0.5	0.5
	Humid atmosphere before dipping	3	0
Direct bioautography	Immersion of plates	0.003 (10 s)	0.003 (10 s)
	Drying	0.03	0.03
	Humid atmosphere for seeded plates	18	4–8
			<i>OD = 0.4 or 0.2</i>
	MTT staining	0.003 (10 s)	0.003 (10 s)
	Humid atmosphere for staining	1	1
	Washing of plates with ethanol	0.003 (10 s)	0.003 (10 s)
	Drying	0.1	0.1

^{a)}Can be omitted

for separation by optimum-performance laminar chromatography (OPLC) and subsequent direct bioautography. BioArena, the complex bioautographic system [18, 19] can be improved on the basis of our findings. It is also possible to use plates coated with other adsorbents (aluminum oxide, cellulose, and polyamide) were tested for 4 h without detachment of the layer during soaking).

The results summarized in **Tables 1** and **2** confirm that the realization (or performance) time of direct bioautography can be reduced to one third of the original 39 h by application of Method B instead of Method A. **Figure 4** shows that the metabolic activity of the bacteria depended on whether the plates were immersed in Method A or Method B bacterial suspension. The best plate is apparent in the first row (1) in Figure 4. Culture conditions were: Method B dipping bacterial suspension ($OD = 0.4$), 4.8 h incubation of seeded TLC plate at 37°C , without pre-incubation in a moisturized chamber. Incubation for 4.8 h is not sufficient for visualization by MTT for plates (3) and (4).

The coefficient of variation (CV) of the ATP/protein ratio was determined by use of $10\text{ cm} \times 10\text{ cm}$ TLC plates divided into 6 cm^2 segments and measuring the ATP/protein ratio for all the segments. The CV was 12.5% for an ATP/protein ratio of 15.5 nmol mg^{-1} . On the basis of this finding we conclude that our method is suitable for determination of viability of test bacteria on TLC plates.

3.6 Determination of the Minimum Bacterial Activity Necessary on the Plate for Successful Functioning of MTT

We observed that MTT could be used to indicate the presence of living bacteria only when the ATP/protein ratio on silica TLC plates was approximately 7 nmol mg^{-1} or more. Under these conditions the plates are blue or violet instead of yellow, i.e. the number and activity of the living bacteria are sufficient for detection (Figures 3–5). **Figure 5** shows that not only a minimum amount of ATP but also a minimum number of bacteria must be present for development of a bioautogram.

4 Conclusion

The bioluminescent ATP method is suitable for determination of the viability of test bacteria on TLC plates in direct bioautography without agar gel.

Incubation of seeded TLC plates for 4.8 h at 37°C is sufficient for maximum metabolic activity of the test bacterium *B. subtilis* on silica TLC plate. This is approximately one third of the time previously recommended (18 h) [16]. This short incubation time enables the use of adsorbents other than silica (alumina, cellulose, and polyamide were tested) for TLC plates in direct bioautography without agar gel.

To achieve the maximum metabolic activity of *B. subtilis* on silica TLC plates the $OD_{600\text{nm}}$ of the suspension used for immersion must be between 0.2 and 0.4 (number of bacteria $5\text{--}9 \times 10^6\text{ c.f.u. mL}^{-1}$) for TLC plate incubation times of 8.5 or 4.8 h.

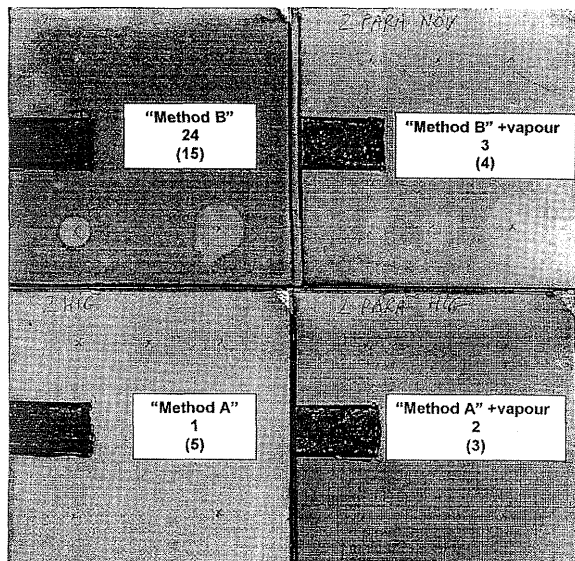


Figure 4

Optimum conditions for direct bioautography on TLC plates with detection by use of the MTT reaction. The upper number denotes the time of incubation for *B. subtilis* at 37°C : "overnight growth and diluted culture" (Method A) and "direct growing until the log phase culture" (Method B). The middle numbers show the ATP/protein ratio [nmol mg^{-1}]. Values of the protein content [$\mu\text{g}/6\text{ cm}^2$] are given in parentheses. "+ vapor" indicates pre-incubation for 3 h in a moisturized chamber before dipping into the bacterial suspension. In the first row the TLC plates were immersed in Method B bacterial test suspension (1, without incubation in a humid atmosphere; 2, with incubation in a humid atmosphere). In the second row the TLC plates were immersed in Method A bacterial test suspension (3, without incubation in a humid atmosphere; 4, with incubation in a humid atmosphere). The optimum conditions were those used for (1).

When the number of living bacteria was sufficient (approx. $9\text{--}10\text{ mg L}^{-1}$ protein) the minimum value of ATP/protein ratio giving a clearly visible color change in the MTT reaction was found to be 7 nmol mg^{-1} . The lowest bacterial activity for suc-

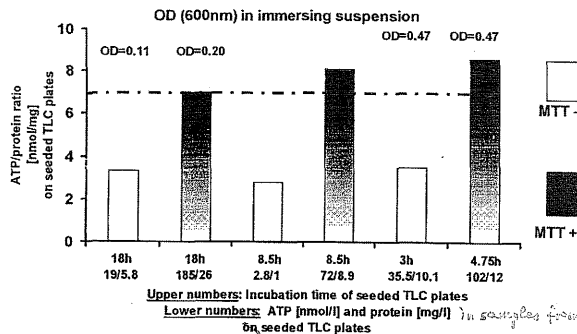


Figure 5

Viability data for detection of bacterial life by use of the MTT reaction. The detection limit for direct bioautography – minimum bacterial activity, as ATP/protein ratio – was given for successful operation of the MTT reaction. The ATP/protein ratio [nmol mg^{-1}] is given on the y axis. The figures 4.8–18 h indicate the incubation time at 37°C for bacteria on seeded TLC plates. The unshaded blocks represent negative MTT reaction (yellow color) whereas the degree of darkness of the blocks is indicative of the extent of the MTT reaction (blue color).

cessful visualization by use of the MTT reaction in direct bioautography was an ATP/protein ratio of 7 nmol mg⁻¹ on the surface of the seeded TLC plate.

References

- [1] *J.L. Rios, M.C. Recio, and A. Villar*, *J. Ethnopharmacol.* **23** (1988) 127–149.
- [2] *V. Betina*, *J. Chromatogr.* **78** (1973) 41–51.
- [3] *L. Botz, S. Nagy, B. Kocsis, and L. Gy. Szabó*, *Fundam. Clin. Pharmacol.* **13** (Suppl I) (1999) 359s.
- [4] *L. Botz, S. Nagy, and B. Kocsis*, *Proc. Int. Symp. Planar Separations, Planar Chromatography 2000*, Lillafüred, Hungary, pp. 77–87.
- [5] *H.U. Bergmeyer*, *Redox Reaction with NAD(P)H as Intermediate. Methods of Enzymatic Analysis. 3rd edn, Vol. I., Fundamentals*, Verlag Chemie, Weinheim, 1974, pp. 198–209.
- [6] *M. Massa and R.N. Farias*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104** (1982) 1623–1629.
- [7] *A. Helenius and H. Soderlung*, *Biochim. Biophys. Acta* **307** (1973) 287–300.
- [8] *M.O. Hamburger and G. A. Cordell*, *J. Nat. Prod.* **50** (1987) 19–22.
- [9] *Y. Maehara, H. Anai, R. Tamada, and K. Sugimachi*, *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.* **23** (1987) 273–276.
- [10] *F.R. Ahmann, H.S. Garewal, R. Schiffman, A. Celniker, and S. Rodney*, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **23** (1987) 474–480.
- [11] *P.E. Stanley*, *J. Biolumin. Chemilumin.* **4** (1989) 375–380.
- [12] *A. Lundin and A. Thore*, *Appl. Microbiol.* **30** (1975) 713–721.
- [13] *G.K. Turner*, In: *K. Van Dyke* (Ed.) *Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1985, pp. 43–78.
- [14] *T. Kőszegi*, *Clin. Chem.* **34** (1988) 2578.
- [15] *M.M. Bradford*, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248–254.
- [16] *R. Eymann and H.E. Hauck*, *Proc. Int. Symp. Planar Separations, Planar Chromatography 2000*, Lillafüred, Hungary, pp. 67–75.
- [17] *P.P.C. Bowden and A.M. James*, *Microbios* **43** (1985) 93–105.
- [18] *E. Tyihák, L. Botz, S. Nagy, B. Kocsis, and E. Mincsovics*, *Proc. Int. Symp. Planar Separations, Planar Chromatography 2001*, Lillafüred, Hungary, pp. 3–13.
- [19] *L. Botz, S. Nagy, and B. Kocsis*, *Detection of Microbiologically Active Compounds*, in: *Sz. Nyiredy* (Ed.) *Planar Chromatography*, Springer, Budapest, 2001, pp. 489–516.

Ms received: December 14, 2001

Accepted by SN: March 8, 2002

Optimization of Conditions for Culture of Test Bacteria used for Direct Bioautographic TLC Detection.

2. Gram-Negative Test Bacterium: *Escherichia coli*

Sándor Nagy*, Tamás Kőszegi, Lajos Botz, and Béla Kocsis

Key Words:

TLC
Direct bioautographic TLC
Dehydrogenase activity-detecting reagent
MTT, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
ATP, adenosine-5'-triphosphate
ATP-DnaA, ATP-bound form of DnaA protein
Bioluminescent ATP assay
Thin layer damage
Escherichia coli

Summary

Direct bioautography is a potent means of obtaining information about the antimicrobial activity of a compound separated from a complex mixture. In this process the developed TLC plate is dipped into a broth culture of a test bacterium and the bacterium will grow directly on the plate. Optimum experimental conditions must, however, be used for each test bacterium.

The main purpose of this study was to find optimum culture conditions for a Gram-negative test bacterium, *Escherichia coli* (ATCC 25922) enabling us to establish a direct bioautographic method with the shortest possible performance time. Because the intracellular adenosine-5'-triphosphate (ATP) level is a direct and sensitive measure of bacterial well-being, ATP assay was used for this purpose. As far as we know this is the first report of the use of an ATP method for optimization of direct bioautography with *E. coli*. Our optimizing experiments on *E. coli* culture showed that the bacteria had to be in the log phase (optical density, $OD_{600nm} = 0.1-0.4$) in the bacterial suspension used for dipping. TLC plates immersed in the log-phase culture needed a shorter incubation time for bacterial growth on the TLC plate (3 h) than for the original 'overnight' culturing suggested in studies by others.

In this paper we will show that:

- ATP assay is a valid method for optimizing *E. coli* direct bioautography.
- Bacterial ATP level oscillates during the growth phase in culture media.
- TLC plates should be immersed in *E. coli* dipping suspension with $OD_{600nm} = 0.1-0.4$.

- Dipping a developed TLC plate for 10 s gave acceptable results.
- Incubation of the seeded TLC plate at 37°C for 3 h was found to be optimum.
- An ATP/protein ratio of 10–15 nmol mg⁻¹ in dipping culture and ~5 nmol mg⁻¹ on seeded TLC plates were the minimum threshold values for visualization of living bacteria by means of the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reaction.
- With our optimized conditions the total performance time of *E. coli* direct bioautography is 9.6 h instead of the originally reported 11.5 h.
- Our procedure results in much sharper contrast of the inhibition zone than that without optimization.

1 Introduction

TLC direct bioautography [1, 2] is a method of locating antibacterial activity on a developed chromatogram obtained from a complex material containing different substances [3]. Originally, agar gel was an essential component in direct bioautography. TLC plates were employed only for separation and were then covered with an agar layer. This layer, containing the test bacterium, dilutes the separated antibacterial compounds and reduces the sensitivity of the method. In our experiments we used the direct bioautographic method without agar gel – we cultivated the Gram-negative test bacterium in broth and immersed the developed TLC plates directly into this broth culture. The broth medium captured by the silica particles of a TLC plate during dipping acts as a source of nutrients for the test bacteria.

There is no doubt that the use of optimized culture conditions to maintain good viability of the test bacteria on the TLC plates is essential for correct bioautographic evaluation. In a living, e.g.

S. Nagy, Pécs University, Faculty of General Medicine, 1st Internal Medicine, H-7624 Pécs, Ifjúság út 13, Hungary; T. Kőszegi, Pécs University, Faculty of General Medicine, Department of Clinical Chemistry, H-7624 Pécs, Ifjúság út 13., Hungary; L. Botz, Pécs University, Faculty of General Medicine, Pharmacy Centre, H-7624 Pécs, Honvéd u. 3., Hungary; and B. Kocsis, Pécs University, Faculty of General Medicine, Department of Medical Microbiology and Immunology, H-7643 Pécs, Szigeti út 12, Hungary.

microbial, cell ATP (adenosine-5'-triphosphate) content plays a special role, not only as an energy source but also as a regulator of the activity of many enzymes. Thus for a given set of intra- and extracellular conditions the amount of ATP remains fairly constant. The intracellular ATP level is a direct measure of bacterial well-being, and ATP determination has been one of the best methods to check the viability of eukaryotic cells and bacteria for a long time [4, 5]. For correct interpretation measured ATP values should be referred to a cellular property (protein, cell number, etc.). In earlier studies we studied chromatographic aspects and determined the optimum culture conditions for the Gram-positive bacterium, *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), used as a test organism for direct bioautography. We also showed that the bioluminescent luciferin/luciferase ATP assay is a sensitive and specific method for studying the viability of test bacteria on TLC plates [6, 7]. Because this bacterium is very sensitive to antimicrobial compounds, it is usually used for detection in this type of experiment. Many pathogenic bacteria are, however, Gram-negative and their cell wall contains an outer membrane which is sometimes impermeable to some chemicals. It is, therefore, also reasonable to test antimicrobial compounds against a Gram-negative test strain, e.g. *E. coli*.

The aim of this study was not only to determine the optimum culture conditions for the Gram-negative test bacterium, *E. coli* but also to obtain general knowledge about test organisms. Despite many good publications on bioautography, living conditions on TLC plates for test bacteria have hardly been examined. We studied the following conditions of *E. coli* bacterial suspension for plate dipping:

- the optimum OD_{600nm} range of culture used for dipping of TLC plates; and

- the optimum immersion time for TLC plates

We studied the following conditions on TLC plates seeded with bacterial suspension:

- proper incubation time of *E. coli* on TLC plates;

- optimum range of ATP/protein ratio (in bacterial suspension used for dipping also); and

- the minimal bacterial activity as a detection limit for successful function of MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), used for visualisation in direct bioautography.

2 Experimental

2.1 Chemicals

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA), Cefazolin (Totacef) from Bristol-Myers Squibb (Latina, Italy), Triton X-100, a nonionic detergent, from Merck, (Darmstadt, Germany) and ethanol from Reanal (Budapest, Hungary)

2.2 Microorganism and Medium

The test strains *Bacillus subtilis*, ATCC 6633, *Micrococcus luteus*, ATCC 9341 and *E. coli*, ATCC 25922 were obtained from the American Type Culture Collections. *Mueller-Hinton* broth, pH 7.3 ± 0.2 was from Difco Laboratories (Detroit, MI, USA).

Mueller-Hinton broth (100 mL) in a 500-mL flask was inoculated with 5 mL broth suspension of *E. coli*, ATCC 25922 containing 10^5 colony-forming units (c.f.u.) mL^{-1} . The flask was kept in an incubator shaker at $37^\circ C$ and 100 r.p.m. We used a broth culture of bacteria in the freshly growing log phase.

To determine the number of c.f.u. bacterial culture (10 μL) was diluted in a tube containing 1 mL physiological saline solution and a series of 100-fold dilutions were prepared in test tubes. Bacterial suspension from each tube (10 μL) was plated on *Mueller-Hinton* agar media. After incubation (24 h, $37^\circ C$) the number of colonies was determined and multiplied by the degree of dilution.

2.3 Bioautography

Most TLC was performed on aluminum-backed silica gel 60 F₂₅₄ TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany; #1.05554); other plates investigated were aluminum-backed alumina 60F₂₅₄ HPTLC plates, cellulose plates (Merck #16092), and polyamide 11F₂₅₄ plates. All plates were used and cut into 10 cm \times 10 cm squares. Without development a series of spots containing 0.01–100 ng cefazolin were applied to the plates as test substance and the spots were left to dry.

2.4 Determination of Bacterial Viability in Immersion Suspension

Test strains were grown in *Mueller-Hinton* broth and kept in a shaker (New Brunswick, New Jersey, USA) at $37^\circ C$ (Section 2.2). The bacterial number was followed by spectrophotometry (Perkin Elmer C4B) by determining of the OD at 600 nm. The bacterial viability in the immersing bacterial suspension was determined by a bioluminescence ATP method [8–11] and the protein content by Protein-Dye Binding (Coomassie Brilliant Blue G-250) assay [12].

2.5 Determination of Bacterial Viability on the TLC Plate

The test strains were grown in *Mueller-Hinton* broth at $37^\circ C$ (Section 2.2). When the OD reached a minimum value of 0.1 (*E. coli*) at 600 nm a few TLC plates were immersed in 50 mL of the bacterial suspension. The bacteria were grown further on the TLC plates at $37^\circ C$ in a moisturized chamber. The TLC plates were processed singly at different times. After incubation part of their silica surface (6 cm²) was scraped from the plate for ATP and protein determination. The cefazolin inhibition spots on the unscraped surface of the TLC plates were visualised by MTT as part of the bioautographic process.

The samples scraped from the plates were added to 0.5 mL 7% (w/w) ice-cold perchloric acid and then were frozen immediate-

ly (within 30 s) at -80°C . In the diluted samples the bacterial viability was determined by a bioluminescent ATP assay in accordance with Stanley's [8], Lundin's [9], Turner's [10], and Kőszegi's work [11]. The protein content was determined by Bradford's method [12] – a protein–dye binding (Coomassie brilliant blue G-250) assay.

3 Results and Discussion

3.1 Differences in Viability of Growing Test Bacteria

The OD values at 600 nm, i.e. the number of bacteria, increased in a function of time (Figure 1). The measured ATP content of bacterial suspensions of *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, and *Escherichia coli* bacteria oscillated as a function of time at 37°C . The oscillation of the ATP level in these suspensions of the three test bacteria, with different time period and amplitude, is shown in Figures 1A–C. This phenomenon for *E. coli* has been

reported in the literature [14] and has been observed for other living systems also [13].

3.2 Determination of Optimum $OD_{600\text{nm}}$ Range of the Culture Used for Dipping of TLC Plates

It is apparent from Figure 1 that the ATP content was maximum in bacterial suspension at the start of log phase of *E. coli* bacterium growth. If the log phase of bacterial growth started later then the maximum of ATP content also developed later. This increased ATP level was at $OD_{600\text{nm}} \approx 0.2$ for *B. subtilis* and at $OD_{600\text{nm}} \approx 0.1$ for *E. coli* and *M. luteus*. These starting times after inoculation were approximately 4 h for Gram-negative *E. coli*, approximately 5 h for Gram-positive *B. subtilis* and approximately 7 h for *M. luteus*. The slope of the growth curve for *E. coli* was steeper than for *B. subtilis*.

The ATP content decreased after the starting of the log phase. This observation was related to initiation of replication and agreed with an earlier study by Kurokawa [14]. In his experiments the level of the ATP-bound form of DnaA protein (ATP-

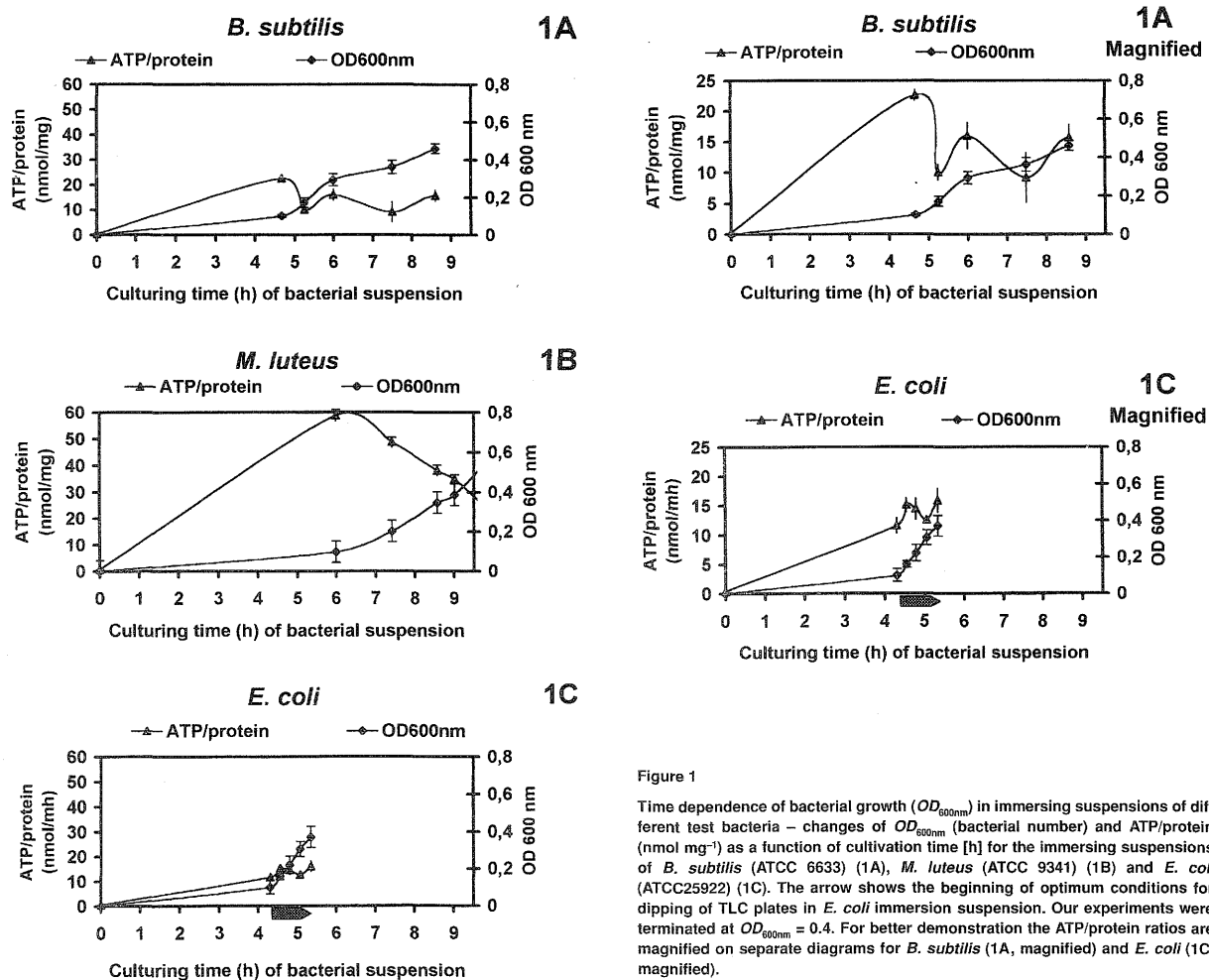


Figure 1

Time dependence of bacterial growth ($OD_{600\text{nm}}$) in immersing suspensions of different test bacteria – changes of $OD_{600\text{nm}}$ (bacterial number) and ATP/protein (nmol mg^{-1}) as a function of cultivation time [h] for the immersing suspensions of *B. subtilis* (ATCC 6633) (1A), *M. luteus* (ATCC 9341) (1B) and *E. coli* (ATCC25922) (1C). The arrow shows the beginning of optimum conditions for dipping of TLC plates in *E. coli* immersion suspension. Our experiments were terminated at $OD_{600\text{nm}} = 0.4$. For better demonstration the ATP/protein ratios are magnified on separate diagrams for *B. subtilis* (1A, magnified) and *E. coli* (1C, magnified).

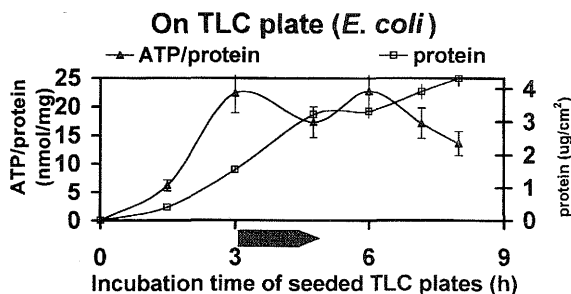


Figure 2

ATP/protein ratios on TLC plates as a function of incubation time. The figure shows ATP/protein ratios and protein contents from bacteria *E. coli* growing on a TLC plate. ATP/protein ratio [nmol mg^{-1}] and protein content [$\mu\text{g cm}^{-2}$] on TLC plates are given as a function of the time of incubation [h] of the TLC plates after immersion into *E. coli* suspension ($OD_{600\text{nm}} = 0.4$). A 6-cm² of portion of the surface of silica TLC was the sampling area. The arrow denotes the optimum incubation for seeded TLC plates for the best visualisation of bacterial activity including the sharpest inhibition zones.

DnaA) oscillated with a temporal increase at approximately the time of initiation of replication, and decreased rapidly after initiation [14].

The ATP/protein contents were determined in the bacterial suspension used for dipping (Figure 1C) and on TLC plate (Figure 2) for *E. coli* as a function of time.

To afford different numbers of bacteria on the TLC plates they were immersed in *E. coli* bacterial suspension of different $OD_{600\text{nm}}$. ATP/protein ratio was determined in the bacterial suspension used for dipping and on the TLC plates. To achieve maximum metabolic activity of test bacteria, i.e. to achieve the maximum ratio of ATP/protein on the TLC plate, $OD_{600\text{nm}}$ in the suspension of *E. coli* used for immersion has to be at least $OD = 0.1$ (10^5 c.f.u. mL^{-1}). In this bacterial suspension the optimum ATP/protein ratio was 10–15 nmol mg^{-1} . To obtain these results in subsequent experiments the TLC plates were immersed in *E. coli* suspension with $OD_{600\text{nm}} = 0.1$ –0.4. These conditions resulted in the sharpest inhibition zones on TLC plates whereas using a bacterial suspension with $OD_{600\text{nm}} > 0.4$ resulted in much less sharp inhibition zones (not shown here).

Table 1

Comparison of performance time for direct bioautography with the Gram-positive test bacterium *B. subtilis* (ATCC 6633) and the Gram-negative test bacterium *E. coli* (ATCC 25922). Data for *B. subtilis* are taken from our earlier experiments [6].

Bacterium		Preparation of bacterial suspension	Incubation time [h]		Total
			Growth on TLC plate	MTT development on TLC plate	
<i>B. subtilis</i>	Before optimization	20	18	1	39
	After optimization	7.5	5	1	13.5
<i>E. coli</i>	Before Optimization	5.5	5	1	11.5
	After Optimization	5.6	3	1	9.6

3.3 Determination of Optimum Immersion Time for the TLC Plates

The silica TLC plates were dipped into *E. coli* suspension ($OD_{600\text{nm}} = 0.1$ –0.4) for 5, 10, 20, or 30 s. We could not find any significant differences between the diameters of inhibition spots using $OD_{600\text{nm}} = 0.4$ bacterial immersing suspension. If the immersion times were longer the sample compounds could be washed from plates so we chose 10 s for immersion time of developed TLC plates.

3.4 Determination of the Optimum Incubation Time for *E. coli* on TLC Plates

The optimum number of bacteria ($OD_{600\text{nm}} = 0.4$) was reached in the bacterial suspension used for dipping after incubation for 5.6 h (Table 1) and TLC plates were immersed into this logarithmic phase suspension. Figure 1C shows the beginning of the log phase in the *E. coli* culture.

TLC plates were incubated at 37°C in a moisturized chamber for different times (0; 1,5; 3; 4,8; 6; 8; 10 h) and the viability of the test bacterium, *E. coli*, on TLC plates was checked by determination of ATP/protein ratio. These data are given (Figure 2) as a function of the incubation time of seeded TLC plates after dipping into *E. coli* culture ($OD_{600\text{nm}} = 0.4$, Figure 1C).

The '3 h' was the shortest incubation time for the seeded TLC plate if it was dipped into an *E. coli* suspension in log phase and $OD_{600\text{nm}} = 0.4$. It can be seen that the start of optimum range for *E. coli* – 3h – was significantly shorter than incubation times given for *B. subtilis* (4.8 h) [6]. Our performance times were much less than suggested by the literature ('overnight' for bacterium *E. coli* [16] and 18 h for bacterium *B. subtilis* [15]).

3.5 Determination of Optimum ATP/protein Ratio both in the Bacterial Suspension used for Dipping and on the TLC Plates

ATP/protein ratio in bacterial suspension of *E. coli* used for dipping was 10–15 nmol mg^{-1} ; on the TLC plate it was 17–23 nmol mg^{-1} during the time interval examined (Figures 1C and 2).

The minimal OD_{600nm} of the bacterial suspension used for dipping for maximum viability (ATP/protein) on the silica TLC plate has to be at least 0.1 (so the minimum number of bacteria was 10^5 c.f.u. mL⁻¹). The shortest time to reach the maximum viability of the test bacterium *E. coli* on seeded TLC plates was found to be 3 h at 37°C ($OD_{600nm} = 0.4$ for bacterial suspension used for dipping). In the literature [16] "overnight" incubation time is used. The possibility of layer damage on the TLC plates is obviously reduced if this shorter 3 h incubation time is used (Table 1) What does this mean? It means that silica TLC plates can be used without heat pretreatment (120°C, 3 h) for separation in OPLC (optimum-performance laminar chromatography) and for direct bioautography. Our findings are advantageous for using the complex bioautographic system, called BioArena, also detected by Gram-negative bacteria [17, 18].

3.6 Determination of the Minimum Bacterial Activity on the TLC Plate Necessary for Successful Function of MTT

We observed that MTT was able to act as an indicator of living bacteria only when a threshold level of ATP/protein ratio of approximately ~ 5 nmol mg⁻¹ or more was achieved on silica TLC plates. Under these conditions the plates are blue or violet (successful reaction for detection of bacteria) instead of yellow (unsuccessful reaction for indication of bacteria) at the end of the process, i.e. the number and activity of living bacteria are sufficient for detection.

The coefficient of variation (CV) for the ATP/protein ratio was determined by use of 10 cm × 10 cm TLC plates divided into 5 cm × 5 cm segments and measuring the ATP/protein ratios in all the segments. CV was 15.5% for an ATP/protein ratio of 9.9 nmol mg⁻¹ ($n = 10$). On the basis of on this finding we conclude that our bioluminescent ATP method is suitable for determination of the viability of Gram-negative test bacteria on TLC plates.

Tables 1 and 2 summarise our data which confirm that the time for direct bioautography could be reduced to 9.6 h, or 83% of the original time of 11.5 h, by application of our method.

Differences between use of Gram-positive and Gram-negative test bacteria for direct bioautographic use are also compared in Tables 1 and 2. Our earlier results on optimization of direct bioautography have been summarized in a book chapter [17].

4 Conclusion

For all three test bacteria (*B. subtilis*, *E. coli*, and *M. luteus*) the ATP content, as detected by a bioluminescence method, was highest in bacterial suspension at the start of log phase of growth and decreased after the start of the log phase. This observation was related to initiation of replication and was consistent with results from an earlier study of *E. coli* [14]. The bioluminescence method for determinations of ATP is suitable and sufficiently sensitive for determination of the viability of Gram-negative test bacterium, *Escherichia coli* (ATCC 25922) on TLC plates used for direct bioautography without agar gel.

We found that incubation of seeded TLC plates for a shorter time (3 h) is sufficient to reach the maximum metabolic activity of the test bacterium *E. coli* on silica gel TLC plate, instead of the overnight incubation at 37°C previously recommended [16]. To reach maximum metabolic activity of *E. coli* on a silica TLC plate the number of bacteria in the suspension used for immersion must be between 10^5 and 9×10^6 c.f.u. mL⁻¹ ($OD_{600nm} = 0.1-0.4$). Under these conditions the incubation time for the seeded TLC plate is 3 h. The cutoff value of ATP/protein ratio for a positive MTT reaction was ~ 5 nmol mg⁻¹. Under these conditions the colour change on the TLC plates from yellow to blue or violet is clearly visible. This result is similar to that previously obtained for the Gram-positive *B. subtilis* [6].

Table 2
Growing times in broth prepared for dipping and on TLC plate of the Gram-positive test bacterium *B. subtilis* and the Gram-negative test bacterium *E. coli*.

	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
<i>Growing in broth for dipping of TLC plate</i>		
Beginning of logarithmic phase, after inoculation [h]	4.7	4.2
Time [h] to reach $OD_{600nm} = 0.4$	7.5	5.6
Time [h] of growth from the beginning of log phase until $OD = 0.4$	7.5 - 4.7 = 2.8	5.6 - 4.2 = 1.4
<i>Growing on TLC plate</i>		
Start time of optimum range for viability after dipping of TLC plates [h]	4.8	3
Sensitivity (minimum detectable amount of cefazolin) [ng]	10	100
Diameter of inhibition zone [mm]		
10 ng cefazolin	8	0
100 ng cefazolin	12	5

References

- [1] J.L. Rios, M.C. Recio, and A. Villar, *J. Ethnopharmacol.* **23** (1988) 127–149.
- [2] V. Betina, *J. Chromatogr.* **78** (1973) 41–51.
- [3] L. Botz, S. Nagy, B. Kocsis, and L.Gy. Szabó, *Fundam. Clin. Pharmacol.* **13** (Suppl. I) (1999) 359s.
- [4] Y. Maehara, H. Anai, R. Tamada, and K. Sugimachi, *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.* **23** (1987) 273–276.
- [5] F.R. Ahmann, H.S. Garewal, R. Schiffman, A. Celniker, and S. Rodney, *In Vitro Cellular Dev. Biol.* **23** (1987) 474–480.
- [6] S. Nagy, B. Kocsis, and L. Botz, *J. Planar. Chromatogr.* **15** (2002) 132–137.
- [7] L. Botz, S. Nagy, and B. Kocsis, Detection of Microbiologically Active Compounds, in: Sz. Nyiredy (Ed.) *Planar Chromatography*, Springer, Budapest, 2001, pp. 489–516.
- [8] P.E. Stanley, *J. Biolum. Chemilum.* **4** (1989) 375–380.
- [9] A. Lundin and A. Thore, *Appl. Microbiol.* **30** (1975) 713–721.
- [10] G.K. Turner, in: K. Van Dyke (Ed.) *Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 43–78, 1985.
- [11] T. Kőszegi, *Clin. Chem.* **34** (1988) 2578.
- [12] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248–254.
- [13] P.P.C. Bowden and A.M. James, *Microbios* **43** (1985) 93–105.
- [14] K. Kurokawa, S. Nishida, A. Emoto, K. Sekimizu, and T. Katayama, *EMBO J.* **18** (1999) 6642–6652.
- [15] R. Eymann and H.E. Hauck, *Proc. Int. Symp. Planar Separations, Planar Chromatography 2000*, Lillafüred, Hungary, pp. 67–75.
- [16] M.O. Hamburger and G.A. Cordell, *J. Nat. Prod.* **50** (1987) 19–22.
- [17] E. Tyihák, L. Botz, S. Nagy, B. Kocsis, and E. Mincsovcis, *Proc. Int. Symp. Planar Separations, Planar Chromatography 2001*, Lillafüred, Hungary, pp. 3–13.

Ms received: December 13, 2002
Accepted by SN: January 31, 2003

FORTHCOMING NOVEMBER 2004

ENCYCLOPEDIA
— OF —
ANALYTICAL
SCIENCE
SECOND EDITION

EDITORS

Paul J. Worsfold

University of Plymouth, Plymouth, U.K.

Alan Townshend

University of Hull, Hull, U.K.

Colin F. Poole

Wayne State University, Detroit, Michigan, U.S.A.

10-VOLUME SET

www.elsevier.com/reference/analytical

Register for free updates, see inside for details...

ARSENIC	<i>A Raab, J Feldmann</i>	132
ASBESTOS	<i>H Janik, M Wrona</i>	141
ASV	See VOLTAMMETRY: Anodic Stripping	
ATMOSPHERIC ANALYSIS	See AIR ANALYSIS: Sampling; Outdoor Air; Workplace Air	
ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY		
Principles and Instrumentation	<i>EH Ivanova</i>	149
Interferences and Background Correction	<i>DJ Butcher</i>	157
Flame	<i>SJ Hill</i>	163
Electrothermal	<i>P Fodor, I Ipolyi</i>	170
Vapor Generation	<i>R Sturgeon</i>	180
ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY		
Principles and Instrumentation	<i>RM Twyman</i>	190
Interferences and Background Correction	<i>RM Twyman</i>	198
Flame Photometry	<i>EE Pickett</i>	203
Inductively Coupled Plasma	<i>JM Mermet</i>	210
Microwave-Induced Plasma	<i>GM Greenway</i>	215
ATOMIC FLUORESCENCE SPECTROMETRY	<i>DJ Butcher</i>	221
ATOMIC FORCE MICROSCOPY	See MICROSCOPY TECHNIQUES: Atomic Force and Scanning Tunneling Microscopy	
ATOMIC MASS SPECTROMETRY		
Inductively Coupled Plasma	<i>EH Evans</i>	229
Laser Microprobe	<i>L Van Vaeck</i>	237
ATOMIC SPECTROMETRY		
Overview	<i>JA Holcombe</i>	249
AUGER ELECTRON SPECTROSCOPY	See SURFACE ANALYSIS: Auger Electron Spectroscopy	
B		
BACKGROUND CORRECTION	See ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY: Interferences and Background Correction. ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY: Interferences and Background Correction	
BIOASSAYS		
Overview	<i>J Chayen, L Bitensky</i>	259
Microbial Tests	<i>N Christofi</i>	265
Bioautography	<i>L Botz, B Kocsis, S Nagy</i>	271
BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND	See WATER ANALYSIS: Biochemical Oxygen Demand	
BIOLUMINESCENCE	<i>LJ Kricka</i>	277
BIOSENSORS	See SENSORS: Overview	
BLEACHES AND STERILANTS	<i>MA Busch, KW Busch</i>	284
BLOOD AND PLASMA	<i>EA Stein, J Purn</i>	294
BOD	See WATER ANALYSIS: Biochemical Oxygen Demand	

requiring histidine (*his*) for growth. The test involving *his* mutants of *S. typhimurium* relies on point mutations of one or more DNA base pairs reversing the initial mutation in the test organism enabling it to become prototrophic for the essential amino acid (non-histidine-requiring). Point mutations are often the cause of many genetic diseases in humans. The Ames test is a relatively complex procedure requiring numerous manipulations and more than one day to perform. Genotoxicity can be detected using reporter gene technology where the reporter gene is associated with genes involved in DNA repair (SOS response involving >30 genes such as *Rec*, *Lex*, *uvrA*, etc.). Thus, in the case of bioluminescence genes, DNA damage will activate the stress promoter which will lead to light emission.

See also: **Bioluminescence**. **Chemiluminescence**: Overview. **Enzymes**: Enzyme-Based Assays. **Microbiological Techniques**. **Water Analysis**: Biochemical Oxygen Demand.

Dalzell DJB, Alte S, Aspichueta E, *et al.* (2002) A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere* 47: 535–545.

D'Souza SF (2001) Review: microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 16: 337–353.

Hastings JW, Potrikus CJ, Gupta SC, Kurfurst M, and Makemson JC (1985) Biochemistry and physiology of bioluminescent bacteria. In: Rose AH and Tempest DW (eds.) *Advances in Microbial Physiology*, vol. 26, pp. 235–291. London: Academic Press.

ISO 8192 (1986) *Water Quality Test for Inhibition of O₂ Consumption by Activated Sludge*, pp. 1–9. Geneva: International Standards Organization.

King EF and Dutka BJ (1996) Respirometric techniques. In: Dutka BJ and Bitton G (eds.) *Toxicity Testing Using Microorganisms*. Florida: CRC Press.

Landis WG and Ming-Ho Y (1995) *Introduction to Environmental Toxicology*. Boca Raton: Lewis Publishers.

Wells P, Lee K, and Blaise C (eds.) (1998) *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques and Practice*. Boca Raton: CRC Press.

Bioautography

L Botz, B Kocsis, and S Nagy, University of Pécs, Pécs, Hungary

© 2005, Elsevier Ltd. All Rights Reserved.

Introduction

Bioautography is a postchromatographic detection method that is widely used for the bioassay of antimicrobial effects. This technique is based on paper or thin-layer chromatography (TLC) separations. Bioautography detects the growth-inhibiting or growth-promoting biological effects of the applied substances. Various bioautographic assays may be used to detect antibacterial, antifungal, antiprotozoal, and cytotoxic substances. The bioactivity-based bioautographic analysis is the most effective method to detect antimicrobial compounds because it detects activity even in complex sample material. Paper chromatography or TLC combined with other analytical techniques is the best separation techniques for bioautography. The combined chromatographic and microbiological assays must be carried out under controlled conditions as the experimental circumstances significantly influence the results. The combination of microbial bioassay with extraction and separation methods is summarized in Figure 1.

The potential applications of bioautography are the following:

1. Additional detection methods in the screening of samples.
2. Targeted or bioactivity-driven isolation processes.
3. Detection of antibiotic residues in human or animal food.

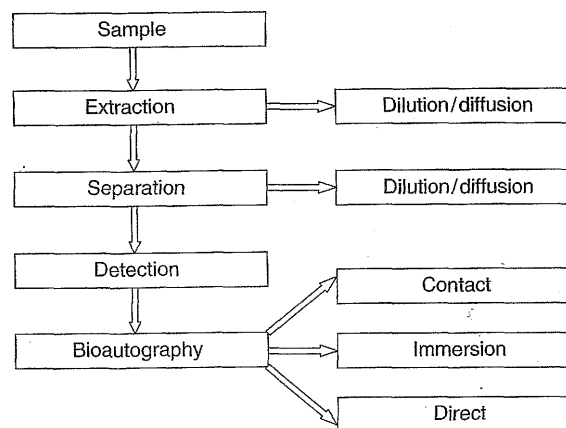


Figure 1 Flowchart illustrating the combination of the microbial bioassay with the separation techniques.

bioautography, where the microorganisms can be grown directly on the chromatoplate.

The dilution and diffusion methods mentioned above are all well-known classical microbial assays. Only the bioautographic methods are suitable for direct combination of the detection techniques with any kind of chromatographic separation methods. This technique opens up new avenues to detect the effects of samples on microbes after separation of the compounds by opened sorbent-bed (e.g., TLC) chromatography.

First, it is essential to ensure the appropriate transport (diffusion) of the compounds from the sample layer to the appropriate medium where the microbes can grow, or to create the suitable conditions for the microbial growth directly on the sorbent material. Second, the selection of microbes suitable for detecting the inhibitory effects of the sample substance is also a crucial step.

Microbe Selection

The selection of the appropriate test organism depends on the purpose of the assay. In a general-purpose test the selected microorganisms must be as diverse as possible. They must represent all important groups of bacteria with group-characteristic physical and chemical compositions and resistance patterns. It is important to take into account that many crude extracts from medicinal plants have specific inhibitory activity against *Staphylococcus aureus*. This is the result of the synergistic effects of various plant constituents. The conditions required for bacterial growth also affect the bacteria selected. It is general practice that pathogenic and apathogenic aerobic microbes, which can be easily cultivated and sensitive to antimicrobial substances, are chosen. These are the Gram-positive *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium xerosis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Streptococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, and the Gram-negative *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia atroseptica*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae* bacteria. From amongst fungi *Cladosporium cucumerinum*, *Candida albicans*, *Fusarium* species, *Penicillium expansum*, *Saccharomyces cerevisiae* are usually chosen.

Sterilization is expensive, time consuming, and requires suitable microbial laboratory conditions. Sometimes it is sufficient to protect samples from contaminating bacteria by using ethanol as an extraction solvent. The TLC plates should be sterile, but generally this is not essential, because the large population of test bacteria will overgrow the few contaminant species. Irradiation of the chromatographic

plate with ultraviolet light is an acceptable method to reduce contamination.

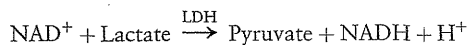
Cultivation of Test Bacteria

Most bacteria and yeasts can be cultivated on standard Müller-Hinton broth. This broth is a general-purpose liquid medium for the cultivation of large amount of bacteria and may be used to test the antimicrobial susceptibility. Standard test microbes should be obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) or from other recognized culture collections, otherwise results cannot be comparable. Sometimes it is necessary to use clinical isolates, when multiresistant microorganisms are selected for the screening studies. Anaerobe bacteria, because of the exposure to oxygen, and slowly growing microbes (e.g., *Mycobacterium tuberculosis*) are difficult or impossible to test by bioautography.

The standard procedure describes the growth conditions to be applied for the strain, age, and growth of the tested organism. When microbes are used the inoculum must be taken from cultures in the exponential logarithmic growth phase. This is the time when multiplication occurs and the culture is the most homogeneous. To evaluate the assay the inhibition effect has to be visualized, and the live, dead, or impeded microbes have to be distinguished.

Visualization of Inhibition of Separated Compounds

The zones or spots of separated compounds are generally visualized by detecting dehydrogenase activity with tetrazolium salt-based reagents. The metabolically active bacteria convert the tetrazolium salt into red formazan dye (2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride, tetrazolium red). A number of tetrazolium salts were evaluated as potential substrates for the enzymatic reaction, but *p*-iodonitrotetrazolium violet, tetranitro blue tetrazolium, and MTT were found to be suitable substrates. The equations below show the principle of the reaction with tetrazolium salt, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, tetrazolium dye).



NADH/NAD⁺ = nicotinamide adenine dinucleotide, pyruvate = pyruvic acid, formazan = tetrazolium dye, LDH = lactate dehydrogenase.

The MTT is reduced to formazan by the NADH, which is generated in the NAD-dependent lactate dehydrogenase reaction. The presence of detergents such as Triton X-100 surfactant (alkylaryl polyether alcohol) accelerates the reduction of the tetrazolium salt manifold. After an additional incubation inhibition zones become visible. The antibacterial compounds appear as clear spots on the colored formazan background.

The obligate aerobic bacterium like *Xanthomonas pruni* does not reduce tetrazolium dyes. The visualization can still be carried out by modification of the assay. The developed plate is pressed onto the agar plate that contains phytopathogenic microbes. These microbes hydrolyze the incorporated gelatin and starch in the nutrient agar, and produces acid from several sugars. The result can be detected by incorporation of bromocresol purple into the media. After transferring the chromatograms onto the agar medium the visualization of the separated cytotoxic antibiotics can be carried out with 2,6-dichlorophenolindophenol (Tillman's reagent, phenolindo-2,6-dichlorophenol). The viable test cells reduce the dye while the dead cells do not.

Contact or Agar Diffusion Bioautography

The typical bioautography method is based on the migration of the antibacterial compound from the chromatographic plate to the inoculated agar plate by diffusion. The chromatographic plates are placed on the surface of agar plates inoculated with microorganisms. After 15–30 min the chromatographic plates are removed and the substances that already diffused into the agar inhibit the growth of the test microbes. Inhibition zones can be easily visualized by the use of suitable microbe strains and mainly dehydrogenase-activity-detecting reagents. The advantage of this technique is that before the antimicrobial test the heterogeneous samples are separated by TLC. The antibacterially active spots can be located. Agar-diffusion assays are particularly applicable to polar and moderately polar compounds. It could be further improved for antitumor antibiotics by applying an appropriate filter paper placed between the inoculated agar and the plate.

Immersion or Agar-Overlay Bioautography

In agar-overlay or immersion bioautography, the developed plate is covered with agar medium. After solidification the plates are inoculated with the

microorganism and growth or inhibition bands can be visualized. Active compounds are transferred from the stationary phase to the agar layer by diffusion. Agar medium is essential in bioautography and provides optimum conditions for bacterial growth. The use of agar gel as a support medium has, however, considerable disadvantages including slow diffusion and bad contrast. In order to achieve longer incubation time, potassium nitrate is incorporated into the basal and seeded agar layers to overcome the problem of limited oxygen availability. After incubation, the plate is sprayed with a tetrazolium salt (e.g., MTT), which is converted to a formazan dye by the microorganism. This technique is a hybrid of the contact and direct bioautographies.

Generally, a less stringent mobile phase (appropriately altered solvent composition of the eluent) is recommended during chromatography in order to achieve increased sensitivity and selectivity of the microorganism in the agar plate or nutrient broth.

It must be noted that there are no sharp division lines between the different techniques. By the use of bioautographic methods great variety of assays can be carried out.

Preliminary screening of anthracycline antitumor antibiotics and the antifungal activity of polyphenols have been tested by the use of bioassay-driven fractionation. Sometimes the reduction of the thickness of the agar layer is beneficial. This is often the case when antifungal compounds are probed and activity-driven fractionated with indicator microorganism *C. albicans*. The essence of this modification is that the inoculated medium is poured rapidly onto the developed chromatogram. The agar overlay method requires the transfer of the active compounds from the stationary phase into the agar layer by diffusion. The thin agar films facilitate this process.

Direct Bioautography

In direct bioautography, the microorganism cultures grow directly on the TLC plate. Each step of the method is performed on the plate. Originally, this method was developed for spore-producing fungi like *Aspergillus*, *Penicillium* and for bacteria. The suspension of the microbial liquid culture is poured over the developed TLC plate. Incubation in a humid atmosphere enables growth of bacteria, and dehydrogenases from the living microorganisms convert tetrazolium salt into the corresponding red formazan. The locations of antibacterial activity can be easily visualized as the antibacterial compounds appear as clear spots on the red background. The sensitivity of the assay enables determination of the minimum active concentration or the minimum

amount of compound. The quantitative determination of compounds by bioautographic analysis can be also implemented by regression analysis of the sizes of the zones or bands. In a simple procedure, *Glomerella cingulata* is directly sprayed onto TLC plates and fungitoxic compounds detected. The detection of inhibitors of *Erwinia carotovora* and *E. herbicola* on TLC plates is also possible. In this case suspensions of the bacteria are sprayed onto the TLC plates by the use of a fine spray. Even the phototoxic furocoumarin compounds can be determined by using the fungus *Penicillium expansum* as the test organism, spraying the TLC plate with a suspension of conidia and irradiated with UV light. With the modification of this technique it is possible to detect the pollen germination inhibitors on TLC plates.

A ready-to-use kit (Merck, Germany), called Chrom Biodip Antibiotika, has recently become available. This was developed for special direct bioautographic detection. This kit contains a premixed culture medium, *Bacillus subtilis* spore suspension, nutrient medium, and MTT detection reagent. Generally, these methods require only heater and therefore it is possible to use this detection in a conventional chemical laboratory. The total determination time is ~21 h. The main advantages of this test kit are: (1) the test needs little laboratory time and cost, (2) the user does not need to maintain strains of bacteria for the test, and (3) the spore suspension can be used at any time.

Overpressured-layer chromatography, also called forced-flow planar chromatography, is an instrumental version of planar liquid chromatography. It develops TLC under controlled conditions. The advantages of this technique are the optimized flow of the mobile phase, the short separation time, the high resolution, the good reproducibility, the high sample throughput, the simple precleaning process, and, finally, the reduced spot or band broadening.

In direct bioautography there is usually no need for diffusion from the adsorbent to the agar medium. Both water-soluble and lipid-soluble substances are in direct contact with the bacteria and the growth medium on the surface of the adsorbent particles. There is no dilution and diffusive loss of the separated substances, and this results in low detection limits.

However, the planar chromatographic adsorbent material is, not always suitable for microbial studies. If the test bacterium requires special conditions (e.g., extremely long incubation time) the advantages of the method may not be exploited. The main factors influencing the evaluation of direct bioautography will be discussed below.

The direct bioautography process can be divided into three steps: (1) growing test bacteria cultures for

dipping, (2) separation of substances for assay by TLC, and (3) microbial assay on the TLC plate. A flowchart for the direct bioautography process is shown in Figure 3.

Factors Influencing the Microbial Assay

The bioautography screening tests are influenced by many chromatographic and microbial factors.

The chromatographic part of the assay is affected by solvents, additives, eluents, sorbents, spot volume, sample application, development mode, spot or band broadening, resolution of the separated compounds, the analytical detection, and the derivatization.

The microbial part of the assay depends greatly on the origin, contamination, pH of the samples, the composition of the culture medium, the chemical character of the analyzed material, the immersion suspension, the incubation temperature, the incubation time, and the visualization of the inhibition zones.

The components of the elution or extraction solutions are essential. Solvents can contain impurities and/or stabilizers, which might inhibit bacterial or fungal growths. Also, solvents or their residues in the adsorbents can alter results (e.g., traces of acetic acid remaining in the adsorbent inhibit bacterial growth). Tetrahydrofuran is not a suitable chromatographic solvent because even in a minute amount it inhibits bacterial growth. It is beneficial if the mobile phase contains highly volatile solvents, so they can be completely removed before the microbial assay. This is not the case with most of the acids and bases. The good eluents used in direct bioautography does not disturb the microbial detection.

The selection of the appropriate adsorbent is not simple. The adsorbent has to fulfill the requirements of the chromatographic and the microbial processes. Normally, precoated silica gel plates are used as it contains sufficient binding power. The TLC technique mainly uses silica gel. It is also very promising to use a water-resistant glass plate. In special circumstances other adsorbents (e.g., alumina for gentamicin) are more appropriate. The use of polyamide and cellulose layers for direct bioautography is limited. Precleaning of the chromatographic plates with appropriate solvent is vital.

The insoluble compounds in the bands can crystallize after drying. This reduces the sensitivity of the assay considerably. Drying of compounds on silica gel plates can be also detrimental for some fungicides, probably because of their inherent chemical reactivity. Very concentrated sample loads, in terms of

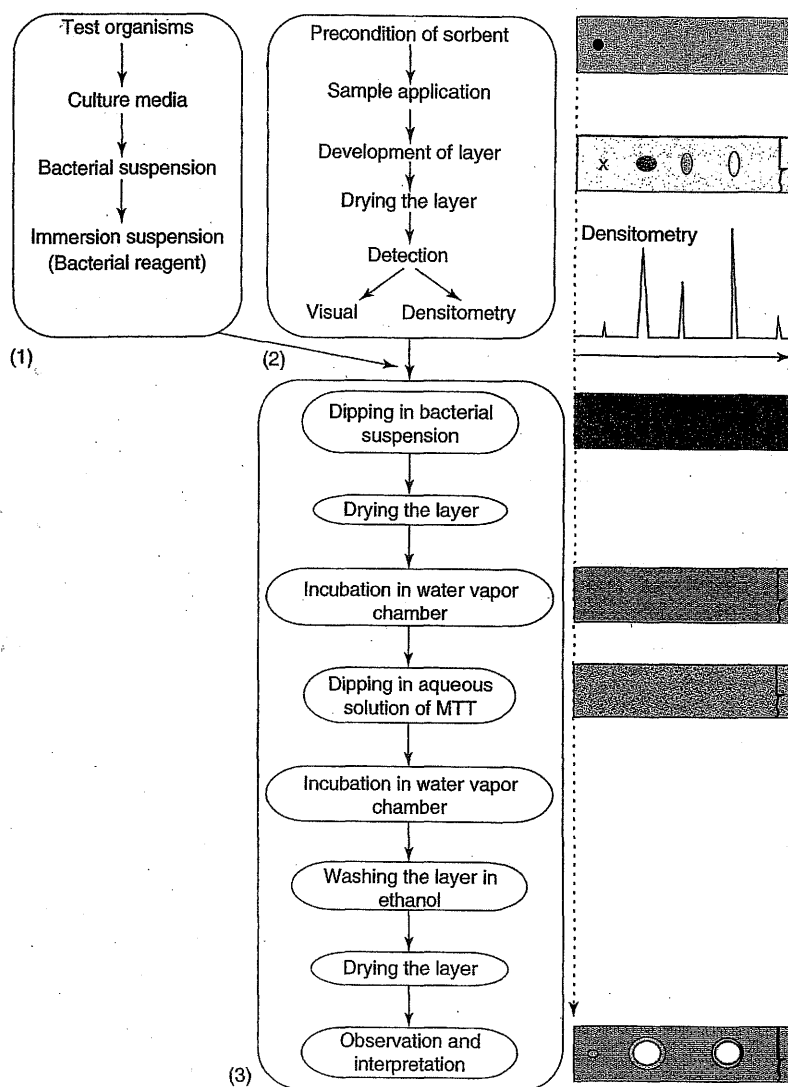


Figure 3 Implementation of the direct bioautography assay.

material per unit area, are required for the greatest sensitivity after visual detection. In the case of natural substances the sensitivity of direct bioautographic assay was most successful on silica gel layers. The most efficient detection system uses high-performance TLC layers with *Bacillus subtilis*. The detection limit can be determined by measuring of the diameter of the clear zone (inhibition ring). The values of the minimum detectable dose can be determined similarly to conventional TLC.

Optimization of Direct Bioautography

The key factors in the optimization of the assay are the quality of the bacterial suspension and the conditions of the TLC incubation.

Frequent practice is the use of the overnight cultures, like in the case of *B. subtilis*, or 6-h cultures, like in the case of *E. coli*. The optical density (OD) (absorbance) of the bacteria suspension is varied. It is recommended to be between 0.40 and 0.60, which represents $\sim 4 \times 10^7$ cells ml^{-1} .

It is important to ensure the maximum metabolic activity of the microbe suspension. The ATP (adenosine triphosphate) content reflects the metabolic activity of cells. Thus, the measurement of ATP content is a good indicator of the viability of bacteria. The measured ATP content must be expressed on the basis of one of the cellular attributes (protein content or cell number). The bacterial suspensions are the most suitable for coating the TLC plates when their growth is in the exponential log phase, and their OD

is between 0.2 and 0.5. When the OD is higher than this, the cell's activity, which is mirrored by the ATP content, is already in decline.

The surface of the sorbent material does not provide good living conditions for microbes. The growth medium adhered to the silica particles in TLC acts a source of nutrients for the test bacteria.

The relationship between the ATP and the protein contents is crucial. An optimum ratio between these two parameters is required for the successful microbial test of the plate. The best stage of growth shows high ATP content, without protein degradation. Only the metabolically active bacteria can convert the tetrazolium salt.

As a rule, higher sensitivity of the assay may be obtained by shorter incubation times for chromatoplates. The optimum incubation time (when the culture is in the exponential log phase) for Gram-positive sporeforming test bacteria is between 8 and 12 h while for Gram-negative enterobacterial bacteria is between 3 and 6 h.

In summary, the principles of optimization are the following:

1. The plate must be coated with a bacterial culture at its maximum ATP activity.
2. The immersion suspension must contain a large number of vigorous microbes.
3. The higher OD value does not necessarily guarantee better detection.
4. By mixing bacterial cultures in different stages of growth in order to achieve the optimum OD value for the suspension is not acceptable.

See also: **Bioassays:** Microbial Tests. **Food and Nutritional Analysis:** Overview; Contaminants. **Pharmaceutical Analysis:** Plant Extracts. **Thin-Layer**

Chromatography: Principles; Plate Technology; Method Development. **Water Analysis:** Microbiological.

Further Reading

- Botz L, Nagy S, and Kocsis B (2001) Detection of micro-biologically active compounds. In: Nyiredy Sz (ed.) *Planar Chromatography. A Retrospective View for the Third Millennium*, pp. 489–516. Budapest: Springer Scientific Publisher.
- Colf MD (1994) Key antifungal antibacterial and anti-insect assays – a critical review. *Biochemical Systematics and Ecology* 22: 837–856.
- Hostettmann K, Terreaux C, Marston A, and Potterat O (1997) The role of planar chromatography in the rapid screening and isolation of bioactive compounds from medicinal plants. *Journal of Planar Chromatography* 10: 251–257.
- MacDonald A, Chen G, Duke P, et al. (1979) Bioautography. In: Touchstone JC and Sherma J (eds.) *Densitometry in Thin Layer Chromatography*, pp. 201–221. New York: Wiley.
- Mortelmans K and Zeiger E (2000) The Ames *Salmonella* microsoma mutagenicity assay. *Mutation Research* 455: 29–60.
- Paxton JD (1991) Assays for antifungal activity. In: Dey PM and Harborne JB (series eds.) *Methods in Plant Biochemistry*. Hostettmann K (ed.) *Assays for Bioactivity*, vol. 6, pp. 33–46. London: Academic Press.
- Rios JL, Recio MC, and Villar A (1988) Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* 23: 127–149.
- Vanden Berghe DA and Vlietinck AJ (1991) Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Dey PM Harborne JB (series eds.), *Methods in Plant Biochemistry*. Hostettmann K (ed.) *Assays for Bioactivity*, vol. 6, pp. 47–66. London: Academic Press.

BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND

See WATER ANALYSIS: Biochemical Oxygen Demand

BIOLUMINESCENCE

L J Kricka, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA
© 2005, Elsevier Ltd. All Rights Reserved.

Introduction

Bioluminescence ('living light') is the name given to the visible light emission from living organisms. It is

widely distributed in nature (~666 genera from 13 phyla) and some representative examples of bioluminescent organisms are shown in Table 1. In the marine environment, it has been estimated that in the dimly lit mid-ocean between 200 and 1200 m ~95% of fish and 86% of shrimps and squid are bioluminescent. In surface water <10%, and in the abyssal

The Combination of the Overpressured Layer Chromatography and Bioautography and Its Applications to the Analysis of Molecules Influencing Cell Proliferation[⊗]

by E. Tyihák^{1,7*}, L. Botz², P. Ott¹, S. Nagy³, B. Kocsis⁴,
Zs. Király-Véghely⁵ and E. Mincsovcics^{6,7}

¹ Plant Protection Institute, Hungarian Academy of Sciences,
P.O. Box 102, H-1525 Budapest, Hungary,

² Department of Pharmacy, University of Pécs,
Honvéd u. 3, H-7624 Pécs, Hungary

³ Department of Internal Medicine, University of Pécs,
Honvéd u. 3, H-7624 Pécs, Hungary

⁴ Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Pécs,
Honvéd u. 3, H-7624 Pécs, Hungary

⁵ Research Institute for Viticulture and Enology of Agricultural Ministry, Experimental Wine Cellar,
H-1015 Budapest, Malátai u. 4, Hungary

⁶ OPLC-NIT Co., Ltd.,
Andor u. 60, H-1119 Budapest, Hungary

⁷ BIONISIS-OPLC, S.A.,
Le Plessis Robinson, France

Key-words: bioautography, BioArena, cell proliferation, resveratrol, OPLC, TLC

BioArena is a complex separation and detection system, which integrates the advantages of the overpressured layer chromatography (OPLC) and bioautography. It exploits the interaction possibilities between the microbes and the dye substance as well as other small and big co-factors molecules in the sorbent bed after separation. OPLC separation resulted in the increase of the sensitivity and the compactness of the spots in comparison to the conventional TLC-HPTLC separations. OPLC and bioautography as a detection system facilitate studying different biological interactions in the field of antibiosis, especially model reactions of endogenous formaldehyde (HCHO) and other small endogenous molecules (e.g. H₂O₂), as well as *trans*-resveratrol.

⊗ Dedicated to the memory of Professor M.S. Tsvett on the occasion of the 100th anniversary of his discovery of chromatography

* Corresponding author. E-mail: etyih@nki.hu, fax: (36-1) 48 77 555

BioArena jest złożonym układem, który łączy w sobie korzyści nadciśnieniowej chromatografii warstwowej (OPLC) i bioautografii. Wykorzystuje ona możliwości oddziaływania drobnoustrojów z substancją barwiącą, jak również z innymi małymi i dużymi cząsteczkami jako czynnikami dopełniającymi, w złożu sorbentu po rozdzieleniu. Zastosowanie OPLC zaowocowało wzrostem czułości oraz polepszeniem zwartości plamek w porównaniu do konwencjonalnych rozdzielań za pomocą TLC–HPTLC. OPLC i bioautografia jako układ detekcyjny stwarzają korzystne możliwości badania różnych oddziaływań biologicznych w zakresie antybiozy ze zwróceniem szczególnej uwagi na modelowanie reakcji endogennego formaldehydu (HCHO) i innych małych endogennych cząsteczek (np. H_2O_2) jak również *trans-resveratrolu*.

In biological systems the molecules which enhance or retard cell proliferation play a decisive role [1]. There is a dynamic balance between the cell proliferation promoting and retarding processes. Among the retarding factors antibiotics originating from the antibiosis processes are the most important [2]. The resistance of microbial strains, especially common pathogens [3] to antibiotics is an increasing problem in the field of anti-microbial animal and human therapy [3,4]. Bacteria have developed mechanisms of resistance to all classes of antibiotics used by human [4]. Therefore, the study of these resistance mechanisms, their causal relationships, as well as the research for new antibiotics or antibiotic-like substances originating from microbial and plant sources are of outstanding importance to the pharmaceutical science [5–7].

Paper chromatography (PC) [8], thin-layer chromatography (TLC) [9], gas chromatography (GC) [10], high-performance liquid chromatography (HPLC) [11] and capillary zone electrophoresis [12] procedures have been already employed to the separation and quantitative analysis of antibiotics. Chromatographic approach has been successfully used for antibiotics' analysis in fermentation media and plant tissues, purity assessment of raw materials, assay of pharmaceutical dosage forms and to the determination of antibiotics in biological samples such as blood, plasma, serum, urine and tissues. Chromatographic analysis of antibiotics was coupled with various detection modes, such as bioautography [13], UV spectrophotometry [14], fluorimetry [15], electrochemistry [16], chemiluminescence [17] and mass spectrometry [18]. Since classical microbiological methods for the determination of anti-microbial compounds, e.g. in fermentation media, plant tissues are non-specific bioautography has been successfully applied to the estimation their biological activity [19–21]. Among the numerous *in vitro* biological methods for studying the anti-microbial activity of biological samples (plant extracts *etc.*), bioautography has found wide applications, especially to the detection of new compounds in complex biological matrices.

The combination of the planar chromatography with bioautography is very promising, since the sorbent bed arranged in the form of the flat layer facilitated bioautographic detection of biological compounds after their separation is completed. Therefore column techniques rather not favour bioautographic investigations. PC was the first

planar layer liquid chromatographic system to be used for the detection of antibiotics [22,23]. However, the rapid development of the planar liquid systems resulted at first time in the development of TLC-HPTLC mode involving bioautography detection as well [24-26].

The further development of the separation techniques including planar liquid chromatography has been observed and the intensive progress in HPLC technique occurred to require a fundamental renewal of the conventional TLC-HPTLC. The further improvement has been initialised with the development of the overpressured layer chromatography (optimum performance laminar chromatography, OPLC) [27-29] integrating the advantages of the conventional TLC-HPTLC and HPLC [30,31], which extends the separation efficiency in comparison to conventional TLC-HPTLC. The advantages of OPLC are still maintained even if coupled with bioautography detection in BioArena complex system [32], which integrates the up-to-date methodological and biological capabilities of the conventional bioautography with OPLC.

The evaluation of biological activity of various substances with an effective laboratory technique after their prior chromatographic separation is crucial due to the infectious origin of many human and animal diseases [33,34]. The infectious agents can be the cause of the precipitate or risk factors for various diseases that previously were not considered to be caused by transmissible agents [33,35]. Therefore, the study on the substances retarding or promoting cell proliferation performed on the sorbent bed under the same conditions allows one to widely investigate host-pathogen interactions, as well as opens new possibilities to the prevention of diseases using new antibiotics or aspecific immunisation. A sub-therapeutic concentration of antibacterial agents may intensify cell proliferation process [36]. For the investigation of new biologically active compounds present in microbes and plants, suitable biological and chemical methods are necessary [37].

The aim of this paper is to demonstrate the advantages of BioArena as a sophisticated bioautographic system for studying complex interactions between microorganisms and trans-resveratrol, the common, natural antibiotic-like substance.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Test substance. Trans-resveratrol of the analytical grade (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Hungary) was used as the test substance for the bioautographic detection and determination of the optimum incubation time.

Dye reagent. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Hungary) was used to visualise the antimicrobial activity. MTT was dissolved in distilled water and the solution was used immediately after preparation.

Other chemicals. All solvents and other chemicals were of analytical grade and were purchased from MERCK Co., Ltd. (Darmstadt, Germany) and REANAL Co., Ltd. (Budapest, Hungary).

Microorganisms and culture media

Bacillus subtilis. The strain of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 was obtained from American Type Culture Collections. Mueller-Hinton broth (DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA) was used for cultivation.

Pseudomonas syringae. The phytopathogen *Pseudomonas savastanoi* *pv. phaseolicola* race 6, causing halo blight on bean (purchased from Department of Biological Sciences, Imperial College, Wye, London University, England) was used. Bacterial cells were grown on a rich medium (King's B broth), at 28°C, 200 rpm on the centrifugal shaker, until they reached late exponential phase ($OD_{560\text{ nm}} = 0.7$), corresponding to 1.5×10^9 cells mL^{-1} . Just before use, 50% vol. of fresh medium was added to the culture.

Bioautography

Detection with *Bacillus subtilis* for the evaluation of biological activity of the test substance was performed according to the already reported method [21].

Having completed the development, dried chromatoplates were immersed into the bacterial suspension of *Pseudomonas savastanoi* for 25 s. Visualisation of the chromatograms with MTT was performed either after a short draining period or after an overnight incubation.

Separation methods

TLC. TLC plates covered with silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany) were used.

The test substance was spotted onto the sorbent layer with the micrometer syringe and automatic sample applicator (CAMAG Co., Muttenz, Switzerland). The chromatograms were developed in TLC chamber using different eluent systems, next the plates were dried and after that ready for bioautographic detection.

OPLC. The sample was applied off-line onto the dry sorbent layer [e.g. HPTLC silica gel, 60 layers of 20×20 cm; Merck, Darmstadt, Germany using micrometer syringe or NANOMAT sample applicator (CAMAG Co., Muttenz, Switzerland). The OPLC equipment comprised the separation chamber (BIONISIS-OPLC, S.A., Le Plessis Robinson, France) and liquid delivery system (OPLC-NIT Co., Ltd., Budapest, Hungary) with liquid and eluent delivery pumps. The cassette containing the sorbent layer with the applied samples was inserted into the chamber and chromatograms were developed using the linear (horizontal and perpendicular) and two-dimensional mode and under isocratic and gradient (two and three step) conditions. After the separation process the cassette was pulled out, the chromatoplate was dried and next subjected to the bioautographic detection.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 exemplifies consecutive steps of the OPLC separation preceding the to bioautographic detection (BioArena system). The sorbent layer had to be very stable and resistive to aqueous solutions used at different stages of the analysis [13,22–26].

Therefore its preconditioning was a crucial step of the whole process. Having performed the OPLC separation (but before the biological detection) there is a possibility to quantitatively (densitometrically) evaluate the spots and to apply different detection modes, as shown in Figure 1.

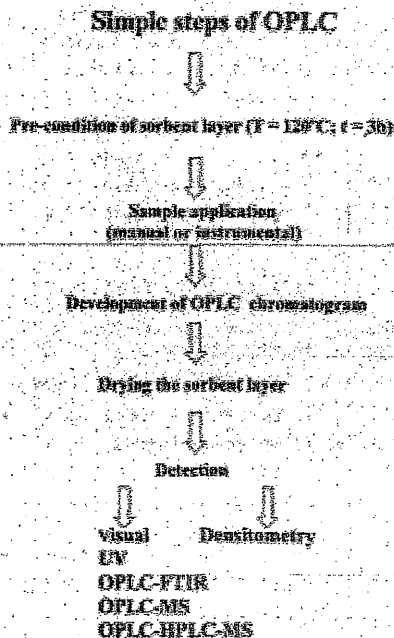


Figure 1. Consecutive stages of the OPLC BioArena separation

Figure 2 demonstrates the possibilities of the system combining conventional bioautography with different liquid chromatographic techniques, as TLC-HPTLC and OPLC. It should be mentioned that much interest is focused now on PC TLC-HPTLC OPLC, a new field in planar liquid chromatography. It is not surprising that OPLC separation results in the increase of the sensitivity and the compactness of the spots in comparison to the conventional TLC-HPTLC separations.

The conventional bioautography detection performed with BioArena system employs necrotrophic and/or biotrophic inoculum suspensions. BioArena enables one to appropriately modify the incubation time. Shorter incubation time (1–2 h) allows more sensitive biotrophic fungi spores in the special culture medium to be used for the biological detection.

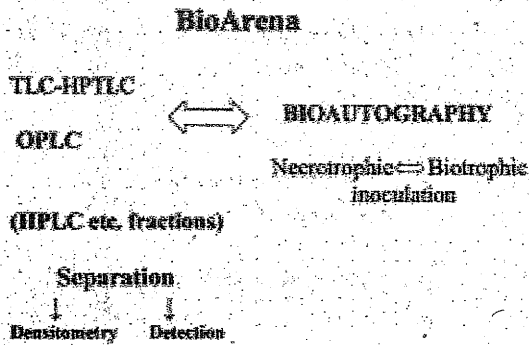


Figure 2. The scheme of BioArena system with chemical separation and detection modes

The scheme of various OPLC off-line operating modes involving one-dimensional linear separation and multi-layer OPLC arrangement is given in Figure 3. At the sorbent bed of BioArena system a wide variety of interactions between microbes and antibiotics as well as different co-factors occur. In practice, the number of possible interactions is unlimited and therefore in our paper only some preliminary results are discussed.

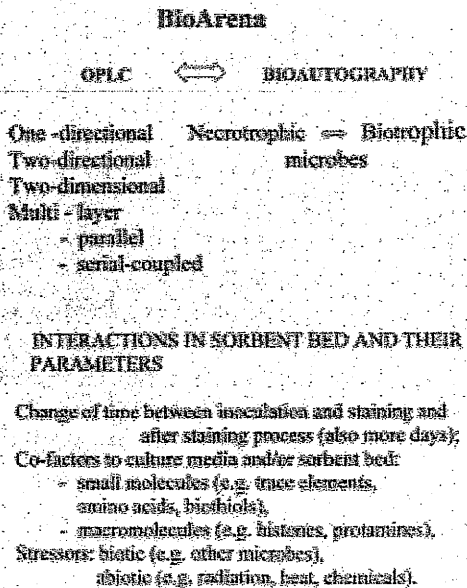


Figure 3. Combination of the off-line OPLC operating modes with bioautography and interactions in sorbent bed and their parameters

Schematic drawings in Figures 4 and 5 show the influence of trace elements and time-dependent inoculation on the interactions between chemicals and microbes. According to these schemes the parallel occurrence of cell proliferation promoting and inhibiting components is obvious.

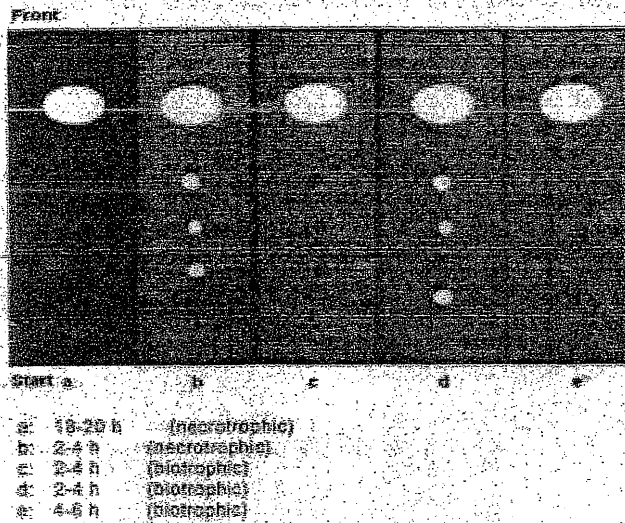


Figure 4. The results of the time-dependent inoculation with necrotrophic and biotrophic microbes

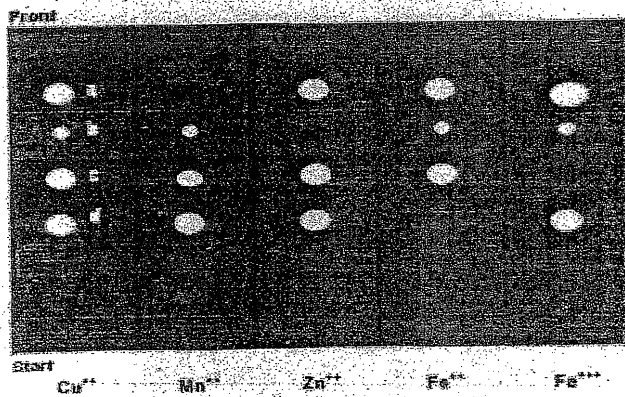


Figure 5. The effect of the trace elements on the interactions between chemicals and retroscopic microbes

Short incubation time or diluted inoculum favours the cell proliferation (black spot) – the more living cells give more intensive reaction with MTT and inhibiting molecules. The inhibitory effect is reflected in the form of a white spot or band, while the promoting effect occurs in the more intense colour spot or band than the control sorbent surface colour. Some transitional stages (colours) can be also distinguished. The spot colour depends on the concentration, incubation time, temperature and quality (purity) of the active substance.

The role of the incubation time in the bioautographic detection of *trans*-resveratrol after inoculation process performed with *Bacillus subtilis*, is demonstrated in Fig. 6. It is apparent that short incubation time (6 h) resulted in the best sensitivity. Yet, in the recent literature [22,38] relatively long incubation time is reported to be used (e.g. 12–19 h). Short incubation time is advantageous for the studies on cell proliferation promoting and retarding factors. The optimum incubation time depends on the chemical structure of the molecules and the microbe species. However, full optimisation requires more detailed investigations.

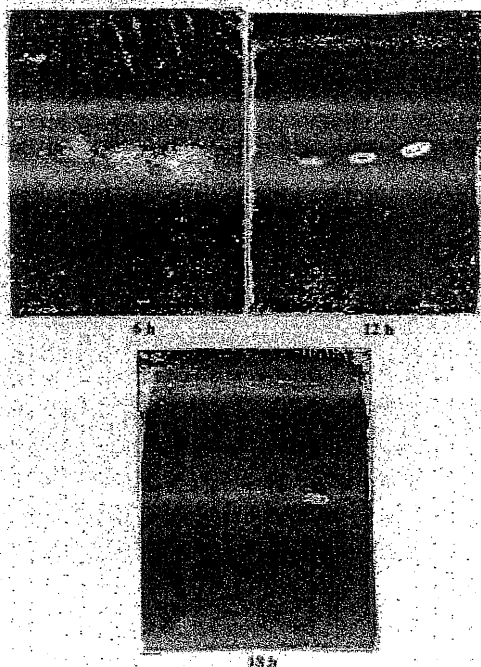


Figure 6. The bioautographic detection of *trans*-resveratrol at different incubation times. TLC system: silica gel 60 F₂₅₄; eluent, chloroform–methanol–hexane (100:25:10, v/v); inoculation, *Bacillus subtilis*, MTT reagent, incubation temperature, 37°C; *trans*-resveratrol, 2, 4, 8 µg (from left to right)

The comparison of the results of the bioautographic detection of *trans*-resveratrol after TLC and OPLC separation using *Bacillus subtilis* is illustrated in Figure 7. The spots of *trans*-resveratrol on OPLC chromatogram are more compact than in TLC system. Similarly, OPLC analysis of the complex sample (e.g. an extract sample from blue grapes) provided higher resolution of stilbene derivatives than TLC [39].

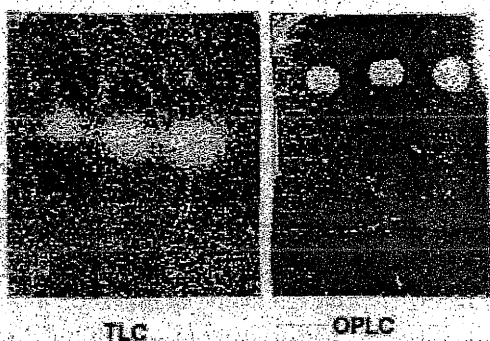


Figure 7. The comparison of bioautographic detection in TLC and OPLC system. TLC separation conditions as in Fig. 6; OPLC conditions: Pext.: 50 bar; eluent, chloroform-acetonitril (40:60, v/v); Rel.: 400 μ L; Vel.: 4100 μ L; .); inoculation: *Bacillus subtilis*; incubation temperature, 37°C; *trans*-resveratrol, 2, 4, 8 μ g (from left to right)

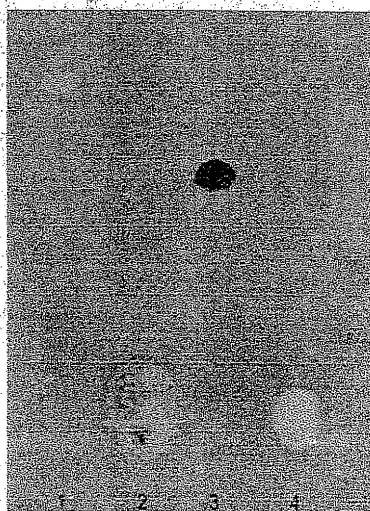


Figure 8. Separation of different derivatives (8 μ g each) in OPLC and biological detection with *Pseudomonas* sp., 1 – *trans*-stilbene, 2 – saturated *trans*-resveratrol, 3 – 3,5,4'-trimethoxystilbene, 4 – *trans*-resveratrol

Different derivatives of *trans*-resveratrol generate either promoting or retarding impact on cell proliferation of *Pseudomonas*., which depends on the chemical structure of the molecules. *Trans*-resveratrol exhibits an antibacterial activity, while its methylated derivative promotes cell proliferation under the same conditions, this is illustrated in Figure 8.

BioArena system should become an indispensable part of the OPLC separation mode. It integrates the unique advantages of OPLC with those of bioautography and it can be used for the detection of antibiotic activity of chemical substances originating from plants, microorganisms or theoretically predicted by combinatoric chemistry. This new technique also facilitates the investigations of antibiotics and other biologically active compounds in waste water, drinking water or during the quality control of antibiotic pharmaceuticals. This new idea and system give us good possibilities for studying different interactions in the sorbent bed and for a combination and comparison of bioautographic detection and OPLC analysis.

The potential applications of BioArena are as follows: 1) detection of cell proliferation agents in biological and environmental samples; 2) investigations of the biological activity of chemical compounds previously designed by combinatorial chemistry; 3) detection of exogenous cell proliferation influencing factors *e.g.* in commercial food products; 4) selective and specific post-chromatographic detection; 5) standardisation of some pharmaceuticals (*e.g.* plant products); 6) studies on the interactions between natural and synthetic cell proliferation influencing substances separated by OPLC; 7) demonstration of the cell proliferation promoting effect at various incubation time; 8) studies on the effect of additives (small- and macro-molecules) in the inoculation media on the activity of cell proliferation influencing agents separated on sorbent layer.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to Dr. I. Bélai for providing reduced *trans*-resveratrol and 3,5,4'-trimethoxy-stilbene. The technical help of E. Dobos-Harsányi is appreciated.

REFERENCES

1. Szende B., Tyihák E. and Trézl L., *Cancer Cell Int.*, 1, 3 (2001).
2. Dehority B.A. and Tirabasso P.A., *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2921 (2000).
3. Neu H.C., *Science*, 257, 1064 (1992).
4. Hellinger W.C., *South Med. J.*, 93, 842 (2000).
5. Keegan J.M.S.D., *J. Med.*, 54, 65 (2001).
6. Xu N.X. and Lu S.F., *Phytother. Res.*, 15, 39 (2001).
7. Navarro V., Rojas G., Delgado G. and Lozoya X., *Arch. Med. Res.*, 29, P191 (1998).

8. Schurmans D.M., Duncan D.T. and Olson B.H., *Cancer Res.*, **24**, 83 (1964).
9. Betina V., *J. Chromatogr.*, **78**, 41 (1973).
10. Shu P.Y. and Lin C.H., *Anal. Sci.*, **18**, 283 (2002).
11. Wolfender J.-L. and Hostettmann K., in: *Phytochemistry of Medicinal Plants*, [Arnason J.T., Mata R. and Romeo J., Eds.], Plenum Press, New York 1995, p. 189.
12. Gaspar A., Andrási M. and Kardos S., *J. Chromatogr. B.*, **775**, 239 (2002).
13. Botz L., Nagy S., Kocsis B. and Szabó Gy. L., *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **13**, Suppl. 1, 359 (1999).
14. Zargar S.J. and Rabbani A., *Int. J. Biol. Macromol.*, **30**, 113 (2002).
15. Schomaker S.J., Clemo F.A. and Amacher D.E., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **185**, 48 (2002).
16. Szunyog J., Adams E., Liekens K., Roets E. and Hoogmartens J., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **29**, 213 (2002).
17. Kruk I., Lichszteid K. and Aboul-Enen H. Y., *Biopolymers*, **67**, 421 (2002).
18. Luce R.A., Sigurdsson S.T. and Hopkins P.B., *Biochemistry*, **38**, 8682 (1999).
19. Nostro A., Germano M.P., Dangelo V., Marino A. and Cannatelli M.A., *Lett. Appl. Microbiol.*, **30**, 379 (2000).
20. Botz L., Nagy S., Kocsis B. and Horváth Gy., in: *Proc. Intern. Symp. on Planar Separations, Planar Chromatography 2000*, [Nyiredy, Sz. Ed.], Res. Inst. Med. Plants, Budakalasz 2000, p. 77.
21. Botz L., Nagy S. and Kocsis B., in: *Planar Chromatography A Retrospective View for the Third Millennium*, [Nyiredy Sz. Ed.], Springer, Budapest, 2001, p. 512.
22. Goodall R.R. and Levi A.A., *Nature*, **158**, 675 (1946).
22. Rosner A. and Aviv H., *J. Antibiotics*, **33**, 600 (1980).
24. Kanfer I., Skinner M.F. and Walker R. B., *J. Chromatogr. A.*, **812**, 255 (1998).
25. Navarro V. and Delgado G., *J. Ethnopharmacol.*, **66**, 223 (1999).
26. Wedge D.E. and Nagle D.G., *J. Nat. Prod.*, **63**, 1050 (2000).
27. Tyihák E., Mincsovcics, E. and Kalász H., *J. Chromatogr.*, **174**, 75 (1979).
28. Tyihák E. and Mincsovcics E., *J. Planar Chromatogr.*, **1**, 6 (1988).
29. Mincsovcics E. Ferenczi-Fodor K. and Tyihák E., in: *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, [Sherma J. and Fried B., Eds.], Marcel Dekker, New York, 1996, p. 171.
30. Mincsovcics E. and Tyihák E., *J. Planar Chromatogr.*, **1**, 309 (1988).
31. Tyihák E. and Mincsovcics, E., *J. Planar Chromatogr.*, **1**, 6 (1988).
32. Tyihák E., Botz L., Nagy S., Kocsis B. and Mincsovcics E. in: *Proc. Intern. Symp. on Planar Separations, Planar Chromatography 2001, New Milestones in TLC*, [Nyiredy Sz., Ed.], Res. Inst. Med. Plants, Budakalász, 2001, p. 3.
33. Lorber B., *Ann. Int. Med.*, **125**, 844 (1996).
34. Cochran G.M., Ewald P.W. and Cochran K.D., *Persp. Biol. Med.*, **43**, 406 (2000).
35. Graves P. and Gelband H., *Cochrane Database Syst. Rev.*, (1), CD 000129 (2003).
36. Visek W.J., *J. Animal Sci.*, **46**, 1447 (1978).
37. Hostettmann K., Wolfender J.-L. and Rodriguez S., *Planta Med.*, **63**, 2 (1997).
38. Bymann R. and Hauck H.E., in: *Proc. Intern. Symp. on Planar Separations, Planar Chromatography 2000*, [Nyiredy Sz., Ed.], Res. Inst. Med. Plants, Budakalász, 2000, p. 67.
39. Tyihák E., Kátay Gy., Király-Véghegy Zs., Németh Zs., Albert L. and Szende B., *Acta Hort.*, **597**, 159 (2003).

Fundamental & Clinical Pharmacology

INCLUDING THE FORMER ARCHIVES INTERNATIONALES DE PHARMACODYNAMIE ET DE THERAPIE

VOL. 13/Suppl. 1

1999

FCPHEZ (S) 1s-396s 1999
ISSN 0767-3981

THE INTERNATIONAL PUBLICATION OF THE FRENCH PHARMACOLOGICAL SOCIETY

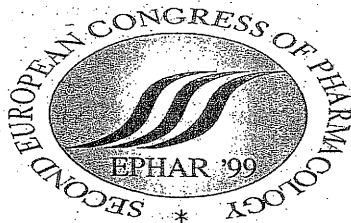
THE OFFICIAL JOURNAL OF EPHAR, THE FEDERATION OF THE EUROPEAN PHARMACOLOGICAL SOCIETIES

2nd EUROPEAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY

Drugs against disease to improve quality of life: gateway
to the 21st Century through EPHAR symposia

Budapest, Hungary, 3-7 July 1999

ABSTRACTS



Cited/abstracted in: *Biological Abstracts/Biosis, CABS, CNRS/Pascal, Current Contents/Life Sciences, Excerpta Medica/EMbase, Index Medicus/Medline, Science Citation Index.*



ELSEVIER

PW100

CHROMATOGRAPHIC ASPECTS OF DIRECT BIOAUTOGRAHY AND ITS USE FOR DETECTING ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COMPOUNDS FROM HIGHER PLANTS

Botz, L.¹, Nagy, S.², Kocsis, B.³, Szabó, L. Gy.⁴

¹ Medical University of Pécs, Department of Pharmacy, ² Department of Internal Medicine I, ³ Department of Microbiology, H-7624 Pécs, Hónvéd u. 3., ⁴ Janus Pannonius University, Department of Botany, Pécs, Ifjúság u. 6., H-7624, Hungary.

Despite the great many antibiotics and semisynthetic analogues, it is continuing search for new anti-infective agents still remains important. Thin-layer chromatography (TLC) is a powerful technique for separating certain dashes of compounds of biological interest. Biological effects (e.g. antibacterial) of some of these compounds can be investigated directly by examining the growth of a test organism on an accordingly treated TLC plate. The direct bioautography makes it possible to localize antimicrobial activity on a chromatogram because the inhibition zones are observed directly on the TLC plate. The main influences of the evaluation of direct bioautography will be focused in our presentation, as: (1) solvents for extraction, (2) sample application mode, (3) stationary phases, (4) solvent types, (5) development techniques, (6) resolution of separated compounds, (7) sensitivity of detection, (8) detection sensitivity of natural compounds. *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) were chosen as representatives for gram-positive and gram-negative bacteria. *Candida albicans* was used for detecting fungitoxic activity. For the qualification of our proposed separation and detection process some antimicrobial drugs were used, as references: It could be stated, that many compounds from different substance classes (thymol, quercetin, kaempferol, chelidonine, juglone, etc.) showed inhibitory effects against gram-positive bacteria and gram-negative bacteria as well. *Candida albicans* proved to be an excellent test organism for detection of fungitoxic compounds, e.g. (juglone, capsaicin, primulic acid, chelidonine, chlorogenic acid, etc.).

EFFECT OF BIMOCLOMOL ON STRESS SIGNALLING

A. Balla, I. Józsa, L. Vigh and P. Krajcsi

PW101

Biorex R. & D Co. 8201 Veszprém, Hungary and Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, 6701 Szeged, Hungary

Bimoclomol has been described as a cytoprotective drug with a marked potentiating effect on heat-shock protein-induction by various pathological stresses (L. Vigh et al. (1997) *Nat. Med.* 3, 1150). It has been hypothesized that Bimoclomol affects cellular stress sensing. However, the possible effect of Bimoclomol on various stress signalling pathways has not been studied.

The mammalian response to stress is complex and often involves multiple signalling pathways. The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway primarily transmits mitogenic and differentiation stimuli, whereas the c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 pathways primarily transduce stress stimuli to the nucleus. All three mitogen-activated protein kinase (MAPK) subfamilies have been reported to play important roles in many aspects of cell functions and can be activated by oxidative stress in some types of cells. To examine potential interactions between the stress signalling cascades and Bimoclomol we focused on oxidative stress induced signal transduction pathways. Oxidative stress leads to activation of p38 MAPK and ERK 1/2 MAPKs and the effect of Bimoclomol on these pathways has been studied in cultured cells.

We are presenting data showing that Bimoclomol increases the expression level of p38 MAPK in H9c2 and ECV cell lines and potentiated the H₂O₂-induced phosphorylation of p38 MAPK. Studies on the effect of Bimoclomol on activation of the JNK and ERK pathways are underway.

PW102

KETOCONAZOLE AND ITRACONAZOLE INCREASE PLASMA CONCENTRATIONS OF CIPROFLOXACIN IN MICE.

M.S. Al-Humayyd and A.A. Mustafa

Dept of Pharmacology, Coll. of Medicine, King Saud University, P.O.Box 2925, Riyadh 11461 Saudi Arabia.

This study was carried out to investigate the pharmacokinetic interaction between ketoconazole or itraconazole and ciprofloxacin in mice. In an acute experiment, two separate groups of animals (n=10) were given single doses of either ketoconazole (50 mg/kg; p.o.) or itraconazole (30 mg/kg, p.o.) and after 20 min. ciprofloxacin (20 mg/kg, i.p.) was administered to each group and its plasma level was determined by an HPLC method at 0.083, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 and 4 hr following ciprofloxacin administration. In another set of two experiments, the first group of animals (n=10) were injected daily for 7 days with a single daily dose of ketoconazole (50 mg/kg, p.o.) while the second group (n=10) was injected with a single daily dose of itraconazole (30 mg/kg, p.o.). On the 8th day ciprofloxacin (20 mg/kg, i.p.) was then administered to both groups and its plasma level was determined by an HPLC method at the same times stated above. Co-administration of ciprofloxacin together with ketoconazole or itraconazole in both acute or chronically-treated animals resulted in a significant increase (p < 0.05) in the mean maximum plasma concentration (C_{max}), mean area under the plasma-concentration-time curve (AUC) and the plasma half-life (t_{1/2}). These results show that these antifungal drugs increase the plasma levels of ciprofloxacin when any one of them is given concurrently with the latter.

**EUROPEAN JOURNAL OF
PHARMACEUTICAL
SCIENCES**

**Official Journal of the European Federation
for Pharmaceutical Sciences**

Volume 25/Suppl. 1 (2005)



ELSEVIER

Amsterdam – Boston – London – Jena – New York – Oxford – Paris – Philadelphia – San Diego – St. Louis

- [6] Antal, I., Zelkó, R., Róczy, N., Plachy, J., Rác, I., 1997. *Int. J. Pharm.* 155, 83–89.
- [7] Lodder, R.A., Hieftje, G.M., 1998. *Appl. Spectrosc.* 42, 556–558.
- [8] Molt, K., Zeyen, F., Podpetschnig-Fopp, E., 1996. *Pharm. Ind.* 58, 847–852.
- [9] Merckle, P., Kovar, K.A., 1998. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17, 365–374.
- [10] Lukša, J., Marušič, A., 1995. *J. Chromatog. B.* 667, 277–281.

P-26

New method for microbiological detection of delivery process from dosage forms containing antibiotics

A. Dévay^a, B. Kocsis^b, Sz. Pál^a, A. Bodor^a, K. Mayer^a, S. Nagy^{a,b} *Institute of Pharmaceutical Technology, University of Pécs, H-7624 Pécs, Rókus Str. 2., Hungary;* ^b*Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Pécs, H-7643 Pécs, Szigeti Str. 12., Hungary*

1. Introduction

Dissolution profile of a pharmacoon is an important aspect for qualification of a drug delivery system. Amount of dissolved antibiotic is determined generally by UV spectrophotometric or HPLC method. Analytical methods in the pharmaceutical practice are not suitable in all cases to follow biological activity.

The aim of this study is to present a new microbiological detection possibility to determine the quantity of the dissolved antibiotic during *in vitro* dissolution experiments.

The bioautographic TLC (Thin Layer Chromatography) method detects directly on chromatoplate the growth-inhibiting or growth-promoting biological effects of applied substances.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was from Sigma (St. Louis, Missouri, USA), Triton X-100, a nonionic detergent from Merck, (Darmstadt, Germany) and ethanol from Reanal (Budapest, Hungary). Oxytetracycline (1 g powder ampule), doxycycline, amoxicillin, ciprofloxacin, clarithromycin were Ph.Eur. quality.

2.2. Microorganism and medium

The bacterial strains were *Bacillus subtilis*, ATCC 6633, *Escherichia coli*, ATCC 25922 Mueller – Hinton broth, pH = 7.3 ± 0.2 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA).

2.3. Bioautographic TLC detection

TLC sorbents for our assays: TLC DC – Alufolien Silica gel 60 F254 (Art. 1.05554, Merck, Darmstadt, Germany).

2.4. Determination of bacterial growth in immersion suspension

Test bacterial strains were grown in Mueller-Hinton broth. The bacterial number was followed applying a spectrophotometer (Perkin Elmer C4B) by determining of the OD at 600 nm.

2.5. Tablets

Content of tablets: 30% active ingredient, microcrystalline cellulose (Avicel PH 101), potato starch and polyethyleneglycol (PEG 4000). Matrix tablets were made applying direct compression. Hardness of tablets was between interval 40–60N.

2.6. Dissolution test

Measuring of dissolved active agent was carried out in Erweka DT 700 apparatus. (Conditions: $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$, 100 min^{-1} , 900 cm^3 purified and degassed water and 0,1 M HCl applying the paddle method of Ph.Eur.)

3. Results and Discussion

Further presented results refer to the oxytetracycline-chloride. Effect of PEG matrices on dissolution of antibiotic determined by UV absorption method is shown on Fig. 1.

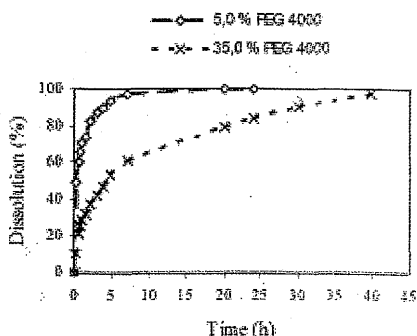


Fig. 1. Dissolution from PEG 4000 based matrix tablets

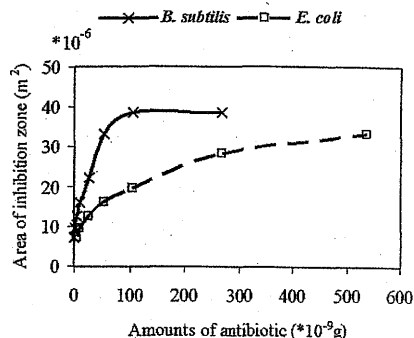


Fig. 2. Two strains with different sensitivity on antibiotic

Function graphs between inhibition area and amount of antibiotic are shown on Fig. 2. with two different bacterial strains. There was a suitable interval of curve fitted to the dissolution data of antibiotic for microbiological determination in case of very sensitive bacterial strains (about $<50 \text{ ng}$ for *B. subtilis*).

We have two possibilities in case of samples containing high concentration of antibiotic:

- work in this interval with the very sensitive strain samples must be diluted
- two different bacterial strains can be applied: one strain should be very sensitive, the other should be much less sensitive—in case of oxytetracycline-chloride these strains were *B. subtilis* and *E. coli* (or *Pseudomonas aureginosa*).

Function graphs shown on Fig. 1. are different for *B. subtilis* and *E. coli* strains. *E. coli* should be used for samples containing high concentration of antibiotic. For comparative evaluation functions presented on Fig. 2. can be linearized by logarithmic transformation (Fig. 3).

Close exponential correlation was observed between the spectrophotometrically measured concentration (%) of antibiotic which dissolved from the dosage form during the dissolution experiments and the area (m^2) of inhibition zone of antibiotic ($r^2 = 0,977$) on TLC plates.

Our method was tested with different antibiotics and different test microbes, too.

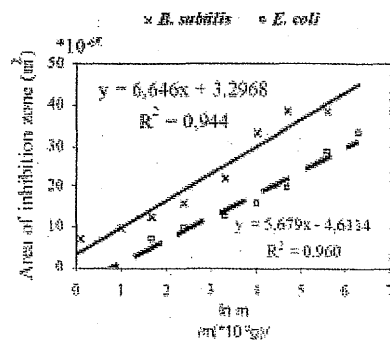


Fig. 3. Linearized for two strains with different sensitivity on antibiotic.

4. Conclusion

As we know this is the first study for detection of amount of dissolved antibiotic during in vitro dissolution that uses bioautographic TLC.

Optimized bioautographic TLC was able to follow dissolution process of antibiotics measured by UV spectrophotometric method.

Biological activity (both growth-inhibiting or growth-promoting effects on test microbe) can be directly observed.

Some complicated analytical chemistry detections can be substituted by this microbiological method. The biologically active derivatives of antibiotics could be determined by this method.

The stability of dissolved pharmaceutical can be followed by bioautographic TLC after separation of derivatives.

References

- [1] Antal, I.: *Acta Pharm. Hung.* 2001. 71, 280–287.
- [2] Dévay, A., Uderszky, J., Rácz, I., 1983. *Acta Pharm. Hung.* 53, 28–35.
- [3] Dévay, A., Fekete, P., Rácz, I., 1984. *J. Microencapsulation* 1, 299–305.
- [4] Erős, I.G., Youssef, A.E.E., Csóka, I., Sánta, Zs., Cserne, A., Kövér, T., 2003. *Drug Dev. Res.* 59, 316–325.
- [5] Erős, I.G., Csóka, I., Csány, E., Takács-Wormsdorff, T., 2003. *Polym. Adv. Technol.* 14, 847–853.
- [6] Nagy, S., Kocsis, B., Botz, L., 2002. *J. Planar. Chrom.* 15, 132–137.
- [7] Nagy, S., Kocsis, B., Botz, L., 2003. *J. Planar. Chrom.* 16, 121–126.
- [8] Botz, L., Nagy, S., Kocsis, B., 2001. Detection of microbiologically active compounds, In: *Planar Chromatography* (Ed.: Sz. Nyiredy), Springer, Budapest, Hungary, p. 489–516.
- [9] Botz, L., Kocsis, B., Nagy, S., 2005. Bioautography in Bioassays, In: *Encyclopedia of Analytical Science, Second Edition* (Paul J. Worsfold, Alan Townshend, Colin F. Poole, Eds.) Elsevier, Oxford, UK, Vol. 1, p. 271–277.
- [10] The United States Pharmacopeia, 1990. *USP XXII*. USP Conventions. Inc., Rockville, MD, USA., p. 998.

A témán kívül megjelent publikációk jegyzéke

Laky, R., Horváth, A., Bartalos, L., Nagy, S.

Az osteomyelitises csont vérellátásának vizsgálata

Kísérletes Orvostudomány 34 150, 1982

Véber, Gy., Nagy, S., Bartalos, L., Kiss, T.

Correlation between smoking and serum thyocyanate

Laboratóriumi Diagnosztika 11 (1) 9, 1984

Nagy, S., Ruzsa, Cs.

Minor modifications of the fluorimetric determination of glycosylated hemoglobin

Acta Medica Hungarica 43 (4) 423, 1986 (impakt faktor 0,033)

Jávor, T. Támok, F., Past, T., Nagy, S.

Cytoprotective effect of free radical scavengers against damage produced by different antirheumatic drugs

Int. J. Tissue React. 8 (1) 35, 1986 (impakt faktor 0,435)

Nemes J., Róth E., Kapronczay P., Nagy S., Mózsik Gy., Varga, G., Borsiczky, B.

A doxazosin (Cardura) hatásmechanizmusai esszenciális hypertóniás betegekben: összefüggések a renin - angiotensin - aldosteron - catecholamin - lipidperoxidáció és az endogén antioxidáns rendszerek között

Hypertonia és Nephrologia, 2 72 – 76, 1998

Cziráki, A., Rinfel, J., Hunyady, B., Nagy, S., Mezey, B., Jávor, T., Schmidt, E., Nemessányi, Z., Mózsik, Gy.

Az ACE-gátló captopril kedvező hatása normotenziós, inzulindependens cukorbetegben

Orvosi Hetilap 139 (39) 2307 – 2311, 1998

Nemes J., Róth E., Kapronczay P., Nagy S., Mózsik Gy., Varga, G., Borsiczky, B.

A renin - angiotensin - aldosteron - catecholamin - lipidperoxidáció és az endogén antioxidáns rendszerek kapcsolata esszenciális hypertóniás betegekben egyhetes moxonidin (Cynt) kezelés hatására

Magyar Belorvosi Archivum 52 87 – 92, 1999

Témán kívüli könyvfejezet, egyetemi doktori

Cytochrome P-450, biochemistry, biophysics and induction
Proceedings of the 5th International Conference on Cytochrome P-450
held in Budapest, Hungary, 1985 Editors: Vereczkey L., Magyar K.,
Budapest, 1985. Akadémiai Kiadó. 570 p.

The free radical evoking capacity of hepatotoxic agents (ethanol and
carbon tetrachloride) oxidized by microsomal cytochrome system and the
protective effect on these damages by scavengers 67 - 70 p.

Jávor, T., Horváth T., Wittmann I., Nagy, S., Deli, J., Balogh E.⁺, Kádas, I.⁺
First Dept. of Med. Univ., ⁺Baranya County Hospital, Pécs, Hungary

Nagy, S.

Univ.Doc. – Monoszacharidok kötődése hemoglobinhoz különböző kísérleti
feltételek között. 1986

Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm Dr. Kellermayer Miklós professzor úrnak, hogy elindított és segített az igaz tudomány útján.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Botz Lajos docens úrnak, hogy a direkt bioautográfia területén végzett iskolateremtő munkájával megismertetett.

Hálásan köszönöm Dr. Dévay Attila docens úrnak, hogy lehetővé tette és támogatta munkám továbbfejlesztését a gyógyszertechnológiai alkalmazás területén.

Nagyon köszönöm Dr. Mózsik Gyula professzor úrnak a PhD dolgozat szorgalmazását a gyógyszerészképzés érdekében. Köszönöm a dolgozattal kapcsolatos fontos megjegyzéseit.

Nagyon köszönöm Dr. Kocsis Bélának a mikrobiológiában nyújtott alapos elméleti és gyakorlati segítségét.

Hálás vagyok Dr. Kőszegi Tamásnak kutatásaim során adott értékes útmutatásaiért.

Hálásan köszönöm Dr. Miseta Attila professzor úrnak tudományos kutatásaimban adott alapvető tanácsait.

Köszönöm Dolgos Bélának, Dr. Seress László professzor úrnak és a Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium (PTE ÁOK, Pécs) dolgozóinak a szkennung elektronmikroszkópos képek elkészítését.

Köszönöm Martos Veronikának, hogy a könyvtárközi kölcsönzés révén mindig gyorsan, pontosan megkaptam a további kísérletekhez szükséges irodalmi információkat.

Köszönöm a Központi Klinikai Kémiai Intézet munkatársainak (különösen Dr. Ludány Andreának, Györgyi Zsókának és Orosz Ibolyának) és a

Gyógyszertechnológiai Intézet munkatársainak (Dr. Mayer Klára, Haskó Diana, Bodor Attila, Pál Szilárd, Rattig László és Varga Tamás) értékes segítségét.