

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Látky rostlinného původu zesilující účinky
konvenčních přípravků proti bakteriálním biofilmům**

Bakalářská práce

Autor práce: Ondřej Bičíš

Obor studia: Kvalita produkce

Vedoucí práce: Ing. Pavel Nový, Ph. D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Látky rostlinného původu zesilující účinky konvenčních přípravků proti bakteriálním biofilmům" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20.04.2017

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Pavlu Novému Ph.D. za odborné vedení, zaučení v laboratoři a poskytování různých rad a informací. Dále bych chtěl poděkovat také Ing. Matěji Božíkovi za výpomoc a rady v nepřítomnosti vedoucího práce a také za trpělivost při odstraňování krystalové violeti. Poděkovat bych chtěl také Ing. Adéle Fraňkové Ph.D. za opatření a analýzu konopné silice, která byla použita v praktické části bakalářské práce. Chtěl bych také poděkovat všem svým blízkým, kteří mě během psaní i práce v laboratoři podporovali.

Látky rostlinného původu zesilující účinky konvenčních přípravků proti bakteriálním biofilmům

Souhrn:

Tato práce se zabývá problematikou bakterií a bakteriálních biofilmů a jejich zneškodňování pomocí různých látek a přípravků. Cílem práce je analyzovat bakteriální buňku, bakteriální biofilmy a jejich vliv v potravinářském průmyslu a posoudit možnosti využití synergie antimikrobiálních přípravků s látkami rostlinného původu. Práce se skládá z literární rešerše a vlastního experimentu. Literární rešerše je zaměřená na popis bakterií, biofilmů a metod, kterými se zneškodňují. Praktická část zahrnuje vlastní experiment, ve kterém je stanovena antimikrobiální aktivita silice *Cannabis sativa*, antibiotika penicilinu a desinfekčního prostředku Meridasan Profi a jejich kombinací. Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace byla použita mikrodiluční metoda za použití 96-jamkových mikrotitračních destiček. U kombinace *Cannabis sativa* a Meridasan Profi byl zjištěn synergický inhibiční účinek proti *S. aureus*.

Klíčová slova: bakterie, biofilm, rostlinné látky, synergie

Botanicals enhancing the effect of conventional products against bacterial biofilms

Summary:

This thesis is focused on problematics of bacteria and bacterial biofilms and their elimination by variety of chemicals and preparations. The aim of this thesis is to analyse bacterial cell, bacterial biofilms and their influence in the food industry and assess options of using synergy between antimicrobial agents and plant extracts. The thesis is composed of the literature review and the personal experiment. The literature review describes bacteria, biofilm and methods using for eliminating them. The practical part covers the personal experiment, where the determination of the antimicrobial activity of essential oil from *Cannabis sativa*, antibiotic penicillin and disinfectant agent Meridasan Profi and their combinations has been achieved. The minimum inhibitory concentration was evaluated by the microdilution method using 96-well microtiter plates. The synergistic effect has been discovered observing the combination of *Cannabis sativa* and Meridasan Profi against *S. aureus*.

Keywords: bacteria, biofilm, plant compounds, synergy

Obsah

1	ÚVOD	11
2	CÍL PRÁCE	12
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE	13
3.1	Bakterie	13
3.1.1	Prokaryotická buňka	13
3.1.2	Struktura bakteriální buňky	14
3.1.3	Významné patogenní bakterie	18
3.2	Biofilm	21
3.2.1	Bakteriální biofilm	21
3.2.2	Rezistence biofilmu vůči antimikrobiálním látkám	25
3.2.3	Kultivace biofilmu <i>in vitro</i>	29
3.3	Desinfekce	33
3.3.1	Fyzikální desinfekce	33
3.3.2	Chemická desinfekce	35
3.4	Účinné rostlinné látky	39
3.4.1	Metody extrakce	39
3.4.2	Rostlinné sloučeniny <i>Cannabis sativa</i>	40
4	MATERIÁL A METODIKA	43
4.1	Příprava antimikrobiálních látek	43
4.1.1	Penicilin	43
4.1.2	Meridasan Profi	43
4.1.3	Silice <i>Cannabis sativa</i>	43
4.1.4	Chemická analýza složení silice	44
4.2	Mikrodiluční metoda	44
4.2.1	Ředící řada	44
4.2.2	Zaočkování	45
4.3	Vyhodnocení	45

4.3.1	MIC u planktonických buněk.....	46
4.3.2	BIC u biofilmových buněk	46
5	VÝSLEDKY	47
5.1	Chemické složení silice <i>Cannabis sativa</i>	47
5.2	Účinky při samostatném použití	47
5.2.1	Efekt na planktonické buňky.....	48
5.2.2	Efekt na buňky v biofilmu	48
5.3	Účinky v kombinaci.....	49
5.3.1	Efekt na planktonické buňky.....	49
5.3.2	Efekt na buňky v biofilmu	50
6	DISKUZE.....	52
7	ZÁVĚR.....	54
8	SEZNAM LITERATURY	55
9	PŘÍLOHY	62

Seznam tabulek

Tabulka 1:	Vliv FICI na vztahy antimikrobiálních látek v kombinaci	46
Tabulka 2:	Zastoupení jednotlivých látek v silici <i>Cannabis sativa</i> získáno pomocí plynové chromatografie.....	47
Tabulka 3:	MIC vybraných látek proti <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) v planktonické formě	48
Tabulka 4:	BIC vybraných látek proti <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) ve formě biofilmu.	48
Tabulka 5:	MIC a FICI vybraných látek v kombinaci proti <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) v planktonické formě a jejich vyhodnocení	49
Tabulka 6:	MIC a FICI vybraných látek v kombinaci proti <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) ve formě biofilmu a jejich vyhodnocení	51

Seznam grafů

Graf 1: Antimikrobiální aktivita vybraných látek proti <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) v planktonické formě samostatně a v kombinaci	50
Graf 2: Antimikrobiální aktivita vybraných látek proti nárůstu biofilmu <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) samostatně a v kombinaci	51

Seznam obrázků

Obrázek 1: Faktory ovlivňující formaci, strukturu a funkci biofilmu v daném průmyslovém prostředí. Zdroj: Whitehead a Verran (2015).....	21
Obrázek 2: Schematická představa biofilmu tvořeného shluky mikrokolonií houbovitého tvaru, spojenými navzájem kanálky a póry	22
Obrázek 3: Fáze vývoje biofilmu – zleva doprava a dolů	24
Obrázek 4: Mikrotitrační destička pro testování kombinace MER a EO - ředící řada pro MER je vedena vertikálně, pro EO horizontálně. Hodnoty stejných koncentrací MER i EO klesají po diagonále. K = kontrola nárůstu, S = kontrola sterility.....	45

Použité zkratky

AHL	acylhomoserinlakton
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenosintrifosfát
BHI	brain heart infusion broth
BIC	Biofilm inhibition concentration (minimální koncentrace inhibující nárůst biofilmu)
CBD	kanabidiol
CBG	kanabigerol
CBN	kanabinol
CC	cytosin, cytosin
CLSI	Clinical and laboratory standards institute
CLSM	Confocal laser scanning microscopy (konfokální laserová skenovací mikroskopie)
CT	cytosin, thymin
CTAB	cetrimid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EO	silice <i>Cannabis sativa</i> (essential oil)
EPS	extracelulární polymerové substance
ER	endoplasmatické retikulum
FIC	fractional inhibitory concentration (frakční inhibiční koncentrace)
FICI	fractional inhibitory concentration index (index frakční inhibiční koncentrace)
FID	flame ionization detector (plamenný ionizační detektor)
G+	grampozitivní
G-	gramnegativní

GC	gas chromatograph (plynový chromatograf)
HEPA	high-efficiency particulate air
HSL	homoserinlakton
HSL-like	homoserinlaktonu podobné
IJ	izoprenová jednotka
MDR	multidrug efflux pumps
MER	Meridasan Profi
MHB	Muller Hinton broth
MIC	minimální inhibiční koncentrace
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
PBS	phosphate-buffered saline
PEN	penicilin
PHMG	polyhexamethylenguanidin
QQ	quorum quenching
QS	quorum sensing
RDR	rotating disc reactor
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	rounds per minute
Spp.	specific physical preparedness (všechny druhy daného rodu)
THC	delta-9-tetrahydrokanabinol
TSB	Tryptic soy broth
TT	thymin, thymín
UV	ultraviolet; ultrafialové

1 Úvod

Bakterie se vyskytují ve dvou základních formách, planktonní forma a biofilm. Planktonní buňky jsou volné, běžně se vyskytující buňky bakterií. Biofilm je složitější struktura bakterií vytvářející slizovou vrstvu na povrchu, vzniká v hydratovaném prostředí a je odolnější vůči antibiotikům, desinfekčním prostředkům, či imunitní reakci hostitele. Tvoří se například na stěnách zemědělských budov, v trubkách, na zubech a dalších místech, kde může působit velké škody. Biofilm má svůj specifický vývoj a strukturu a jednotlivé buňky mezi sebou navzájem komunikují pomocí speciálního systému tzv. quorum sensing (QS). Pro eradikaci bakterií, či jejich biofilmu používáme různé desinfekční prostředky, mechanismy či antimikrobiální látky. Některé rostlinné látky mají silné inhibiční nebo stimulační účinky vůči jiným látkám či organismům nebo jsou schopny do jisté míry ovlivnit činnost jiných struktur. Kombinací vhodně vybraných rostlinných látek s jinými antimikrobiálními prostředky můžeme dosáhnout tzv. synergie. Synergie je jev, kdy efekt obou použitých antimikrobiálních látek v kombinaci je silnější, než je součet účinků při jejich samostatném použití. Tohoto jevu lze prakticky využívat ve farmaceutickém průmyslu pro zvýšení účinku antibiotik nebo pro zvýšení účinků jiných antimikrobiálních látek v různých odvětvích průmyslu.

2 Cíl práce

Cílem literární rešerše je uvést čtenáře do problematiky bakterií, jejich struktury a charakterizovat několik jejich rodů . Dále charakterizovat bakteriální biofilm, mechanismy jeho resistance k antimikrobiálním látkám a způsoby kultivace *in vitro*. Bude zde popsána také desinfekce pomocí různých prostředků a rostlinné silice jako antimikrobiální látky.

Hlavním cílem experimentální části práce je stanovit antibakteriální aktivitu silice *Cannabis sativa* (essential oil; EO) proti planktonickým a biofilmovým formám *Staphylococcus aureus*. Antimikrobiální aktivita bude stanovena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální koncentrace inhibující tvorbu biofilmu (BIC). Dílčím cílem je stanovení účinku silice *Cannabis sativa* v kombinaci s penicilinem (PEN) a desinfekčním prostředkem Meridasan Profi (MER) a posoudit, zda vykazují efekt synergický, aditivní, indiferentní nebo antagonistický.

Hypotéza: Jelikož u řady rostlinných látek byly synergické účinky prokázány, dá se předpokládat, že screeningem vhodně vybraných látek se podaří najít nové synergicky působící kombinace.

3 Literární rešerše

3.1 Bakterie

3.1.1 Prokaryotická buňka

Bakteriální buňky se označují jako buňky prokaryotické. Od buněk eukaryotických, ke kterým patří houby, prvoci a většina řas, se tyto buňky odlišují především tím, že jaderný aparát bakterií nemá zvláštní membránu, které by jádro oddělovala od ostatní cytoplazmy, případně obklopovala zvláštní buněčné organely (mitochondrie, chloroplasty), které umožňují respiraci a fyotosyntézu. Jaderný aparát bakterií, který je materiálním podkladem genetických determinantů, je vlastně jediným dlouhým chromozomem. V souvislosti s tím se dělení jádra bakterií děje amitotickým způsobem, příčným dělením, nikoli mitoticky. Dále se bakteriální buňky zřetelně odlišují od buněk eukaryotických tím, že mají pevnou buněčnou stěnu, která dodává bakteriím velkou osmotickou odolnost a pevnost, podmíněnou hlavně přítomností specifického mukopeptidu. Bakteriální buňky se odlišují od buněk eukaryotických též jednodušší strukturou bičíků, které ani nejsou obklopeny cytoplazmatickou membránou na svém povrchu (Leittgeb a Vošta, 1983).

Buňky prokaryot jsou přibližně tisíckrát menší než průměrná buňka eukaryotní. S tím souvisí skutečnost, že v prokaryotních buňkách není endomembránový systém. Jediným membránovým útvarem prokaryot bývá povrchová membrána, která může vytvářet různé vchlípeniny jako je např. mesozom, klubičkovitý útvar, podílející se na energetickém metabolismu a na replikaci DNA nebo různé vchlípeniny příp. váčky s fotosyntetickou funkcí. V prokaryotních buňkách nejsou ani mitochondrie a plastidy. DNA je soustředěna v nukleotidu, bakteriálním chromosomu. Prokaryotické buňky neobsahují nukleoproteidy typu chromatinu, jedná se zde o holou cirkulární dvojvláknovou DNA. Kromě nukleoidu existují v bakteriálních buňkách plasmidy, malé prstence cirkulární dvojvláknové DNA, které však mají oproti bakteriálnímu chromosomu jiné složení. Prokaryotní buňky dále obsahují kromě základní cytoplazmy „malé“ ribosomy (70S; S = Svedbergova jednotka, je mírou velikosti makromolekuly, určující sedimentaci v ultracentrifuze) nebo různé inkluze (Beneš, 1992).

3.1.2 Struktura bakteriální buňky

3.1.2.1 Jádro

Jádro prokaryotických buněk není od cytoplazmy odděleno membránou. Je uloženo přímo v cytoplazmě a skládá se jen z jedné velké molekuly DNA, která v prokaryotické buňce plní funkci chromozomu. To znamená, že obsahuje geny, které při dělení prokaryotické buňky přecházejí v nezměněné formě do dceřiných buněk, jejichž vlastnosti a znaky určují.

DNA v prokaryotické buňce představuje současně jádro i chromozom. Tento chromozom je zamotaný do klubka, které lze různými fyzikálními zásahy postupně rozmotávat. Jelikož nemá volné konce, lze ho rozmotat do tvaru podobajícímu se kružnici. Z toho důvodu se také tvrdí, že chromozom prokaryotické buňky je kružnicový. Prokaryota mají tedy chromozom kružnicový, který je tvořen DNA. Proto se chromosom (jádro) prokaryotické buňky schematicky znázorňuje jako kružnice. (Rosypal 1994)

3.1.2.2 Plasmidy

Bakterie mohou mít ještě další genetickou informaci, uloženou v plasmidech – cytoplasmatických organelách. Plasmidy obsahují malé kruhové molekuly DNA, které se replikují nezávisle na bakteriálním chromosomu. Plasmidy nesou variabilní genetické informace. Variabilní informace jsou například pro vznik rezistence k antibiotikům. Vznik rezistence nemusí být vyvolán mutací, může vzniknout i pozitivní selekcí predisponované resistantní varianty genetického materiálu plasmidu. A pak například u resistantních bakterií na penicilin se penicilin nemůže vázat k jejich buněčné stěně nebo streptomycin nemůže působit na resistantní bakterie, protože mají změněné ribosomy apod. Mezi bakteriemi existuje přenos rezistence plasmidy - bakterie mohou získat geny pro resistenci od jiných bakterií bakteriální konjugací nebo transformací. (Otová a Mihalová, 2012)

3.1.2.3 Buněčná stěna, gramovo barvení

Buněčná stěna dodává bakteriální buňce mechanickou a osmotickou pevnost a schopnost udržovat tvar. Podle chemického složení a anatomické stavby je nejsložitější strukturou buněk prokaryotů. Prokaryotické organismy mají pevnou stěnu, která obsahuje peptidoglykan. Složkami peptidoglykanu jsou N-acetylglukosamin a kyselina N-acetylmuramová, spojené vazbou beta-1-4 (Leittgeb a Vošta, 1983).

Další složky buněčné stěny jsou rozdílné u gramnegativních a grampozitivních bakterií. Jako grampozitivní se označují ty bakterie, jejichž usmrcené buňky po obarvení Gramovým

barvicím roztokem a moření jodovým roztokem neztrácejí toto barvivo působením rozpouštědel (tj. acetonu nebo ethanolu). U gramnegativních bakterií je toto barvivo z obarvených buněk uvedenými rozpouštědly vyplavováno, takže se buňky odbarví. Gramova barvení se používá při určování rodů bakterií, tj. při diagnostice bakterií. Grampozitivní bakterie mají řadu společných fyziologických vlastností, odlišujících je od gramnegativních bakterií (např. citlivost k některým antibiotikům, aniontovým povrchově aktivním látkám a jedovatým barvivům). Bylo zjištěno, že všechny tyto vlastnosti jsou odrazem rozdílů složení buněčných stěn grampozitivních a gramnegativních bakterií (Wassenaar, 2012).

Hlavní složkou buněčné stěny grampozitivních bakterií je silná peptidoglykanová vrstva vyplněna teichoovou kyselinou. Stěny gramnegativních bakterií teichoovou kyselinu neobsahují, což je příčinou vyplavování komplexu Gramova barviva z buňky působením acetonu nebo ethanolu. Na peptidoglykan jsou také vázány různé polysacharidy. Složení těchto polysacharidů je specifické pro jednotlivé skupiny bakterií a je zodpovědné za imunochemické reakce, tj. za specifické antigenní vlastnosti jednotlivých skupin bakterií. Stěna gramnegativních bakterií se skládá z tenké vrstvy peptidoglykanů bez teichoové kyseliny a z tzv. vnější membrány, která obsahuje fosfolipidy, strukturní i enzymové proteiny, lipoproteiny a lipopolysacharidy. Mezi vnější membránou a peptidoglykanovou vrstvou je tzv. periplazmatický prostor. Obsah lipidů ve stěně gramnegativních bakterií je příčinou jejich zvýšené odolnosti k aniontovým povrchově aktivním látkám, jako jsou mýdla nebo žlučové kyseliny apod. Tato odolnost ke žlučovým kyselinám umožňuje vysoký výskyt gramnegativních bakterií ve střevním traktu savců. V praxi se této odolnosti využívá při přípravě selektivních živných půd pro stanovení střevních bakterií v potravinách nebo ve vodě. Stěnové lipopolysacharidy patogenů (např. *Salmonella spp.*) fungují jako endotoxiny, neboť v těle živočichů vyvolávají charakteristické příznaky onemocnění (Šilhánková, 2002).

3.1.2.4 Cytoplasma

Cytoplasma vyplňuje celý vnitřní prostor bakteriální buňky. Je to vlastně značně koncentrovaný roztok nejrůznějších molekul. Charakteristickou vlastností cytoplasmy je schopnost přecházet ze solu v gel a obráceně. Jsou zde zastoupeny aminokyseliny, vitamíny, nukleové kyseliny, bílkoviny, meziproducty metabolismu buňky, soli organických i anorganických kyselin atd. Nacházejí se zde také enzymy nutné pro metabolické dráhy (s výjimkou těch, které jsou vázány na buněčné struktury) (Němec a Horáková, 1993).

3.1.2.5 Cytoplasmatická membrána

Základní funkcí cytoplasmatické membrány je transport. Každá buňka přijímá z prostředí potřebné rozpuštěné látky, vyskytující se obvykle v malých koncentracích. O to, aby se dostaly v potřebné míře do nitra buňky se starají enzymy vázané v membráně. Plazmatická membrána se také účastní syntézy bílkovin a má důležitou úlohu při dělení bakteriální buňky. Je nezbytná pro život bakterie, její porušení znamená odumření bakterie. Elektronmikroskopické snímky ultratenkých řezů bakterií vykazují trojvrstevnou strukturu silnou 8-10nm (Leittgeb a Vošta, 1988)

Deriváty cytoplasmatické membrány jsou mesozomy a chromatofory. Mesozomy vznikají vchlípením cytoplasmatické membrány. Obvyklým tvarem je měchýřek, který bývá rozdělen do řady trubičkovitých útvarů nebo váčků. Mesozom je v buňce většinou jeden nebo dva a nachází se nejčastěji u tvořící se příčné přepážky a je v kontaktu s nukleoidem. Chromatofory mají rovněž měchýřkovitý tvar a jsou rozděleny na segmenty. Jsou zde obsaženy pigmenty absorbující světelné záření – bakteriochlorofyl a karotenoidy. Mají tedy vztah k fotosyntéze a vyskytují se u některých fototrofních bakterií.

Na vnější straně cytoplasmatické membrány jsou periplasmatické bílkoviny. Jde o některé hydrolytické enzymy, proteázy a nukleázy. U grampozitivních bakterií jsou tyto bílkoviny hromaděny v periplasmatických váčcích, zatímco u gramnegativních jsou jednotlivé molekuly samostatně (Němec a Horáková, 1993)

3.1.2.6 Ribozomy

Ribozomy jsou buněčné organely, které vykonávají funkci továrny na proteiny. Pomocí translace jsou schopny přeložit genetickou informaci uloženou v RNA (mRNA). Pokud nejsou ribozomy zapojeny do proteosyntézy, v prokaryotické buňce jsou vždy volně v cytoplazmě, u eukaryot mohou být volně v cytosolu nebo napojené na ER (drsné ER). Například bakterie *Escherichia coli* má jeden ribozom (sedimentující při 70S) a skládá se ze dvou jednotek, menší podjednotka (30S) a větší podjednotka (50S). Asociace podjednotek do kompletního ribozomu je umožňována koncentrací Mg^{++} iontů. Při nízké koncentraci těchto iontů se podjednotky rozpojí, při dostatečně vysoké koncentraci mohou tvořit dimery. Pokud jsou ribozomy zapojeny do proteosyntézy, v buňce se vyskytují ve shlucích jako polyribozomy, držící pohromadě pomocí RNA. (Gupta, 2009)

3.1.2.7 Další struktury

Inkluze jsou v bakteriální buňce přítomny v cytoplazmě jako granula, obsahující obvykle rezervní materiál. Množství těchto zásobních látek je závislé především na metabolické aktivitě prostředí, ve kterém se buňka nachází. U bakteriálních buněk rozlišujeme inkluze obalené jednovrstevnou membránou (glykogenová granula, granula kyseliny poly- β -hydroxymáselné, granula síry, plynové vakuoly, karboxyzomy a chlorobiové váčky) a inkluze bez membrány (glykogenová granula, polyfosfátová granula, krystaly a parasporální inkluze). Na prokaryotní buňky se vztahuje obecné pravidlo, že rezervní materiál je hromaděn v případech, kdy je v prostředí nadbytek uhlíku nebo je nedostatek zdrojů dusíku či jiné živiny (Němec a Horáková, 1993).

Bakteriální pouzdro (kapsula) se nachází vně bakteriální stěny. Je to silně hydratovaná vrstva amorfního organického polymeru různé tloušťky a složení. Kapsula má antigenní vlastnosti a její význam spočívá především v ochraně buňky před účinky vnějšího prostředí. Podle tloušťky a konzistence hovoříme o mikrokapsule, makrokapsule a slizu. Mikrokapsula bývá někdy považována za součást buněčné stěny. Tloušťka nepřesahuje 0,2 nm a může se skládat např. z komplexu tvořeném bílkovinou, lipidem a polysacharidem (u enterobakterií) nebo naopak pouze proteinem (u streptokoků). Makrokapsula je vrstva o tloušťce větší než 0,2 nm. Má rozmanité chemické složení, např. polymer polysacharidového typu s cukry, glutamylpolypeptid nebo celulóza. Sliz představuje složky pouzdra, které byly vyloučeny do vnějšího prostředí (Němec a Horáková, 1993).

Fimbrie (pili) jsou krátká rovná vlákna, vyskytující se na povrchu některých grampozitivních, ale i gramnegativních bakterií. Na jedné buňce jich bývá mnoho, a při pozorování mikroskopem mohou vypadat jako „malý mop“. Slouží jednak k přisednutí (adhezi) bakterií na povrch, ale také k sekreci proteinů z buňky nebo k horizontálnímu genovému přenosu DNA (Wassenaar 2012).

Bičíky jsou zvláštní, proteinovou organelou, která umožňuje pohyb bakterií, pokud jsou pohyblivé. Buňka může mít jeden nebo jich může být i více. Pomocí bičíků jsou bakterie schopny se pohybovat určitým směrem, nejčastěji ke zdroji živin nebo od nežádoucích látek (antimikrobiálních látek), jedná se potom o pozitivní či negativní chemotaxi. Běžně se pohybují rychlostí 1 mm/min ale mohou dosáhnout i rychlosti mnohem vyšší, až 30 mm/min, což odpovídá rychlosti pohybu člověka 160 km/h vzhledem k porovnání jejich velikostí (Wassenaar 2012).

3.1.3 Významné patogenní bakterie

3.1.3.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je odolná patogenní bakterie, která je schopná se vyvíjet v chladných a vlhkých prostředích, které jsou vhodné pro tvorbu biofilmu. *L. monocytogenes* tvoří biofilmy čisté kultury i biofilmy složené z více druhů bakterií, které se mohou vyskytovat na nerezovém povrchu, plastech, polykarbonátovém povrchu a dalších materiálech přicházejících do kontaktu s potravinami (Chmielowski a Frank, 2003).

Výskyt těchto bakterií v potravinářských produktech je potenciálně nebezpečný kvůli nemoci zvané listerióza. Listeriíza je vážná infekce způsobená konzumací kontaminovaných potravin *L. monocytogenes*. Postihuje zejména těhotné ženy, novorozence a dospělé s oslabenou imunitou (Sandasi a Leonard, 2008). Vstupní bránou je sliznice spojivky a urogenitální trakt. *L. monocytogenes* proniká rychle do mozku a pohlavních orgánů. Významná je kongenitální forma infekce plodu a septická forma (Němec a Horáková, 1993).

3.1.3.2 *Pseudomonas spp.*

Pseudomonas spp. jsou všudypřítomné bakterie, způsobující kažení potravin. Najdeme je v prostředí potravinářského průmyslu, například odpadní cesty, podlahy, povrchy které přišly do kontaktu s ovocem, zeleninou, masem a v některých mléčných produktech. *Pseudomonas spp.* produkují velké množství EPS („extracellular polymeric substance“) a dokáží přilnout a tvořit biofilm na nerezovém povrchu. Často koexistují s *Listeria*, *Salmonella* nebo jinými patogeny (Chmielowsky a Frank, 2003). EPS jsou extracelulární polymerní látky, které jsou důležité pro strukturu a funkci biofilmu. EPS jsou zapojeny v buněčných koloniích, výživě bakterií a interakcích mezi bakteriemi a jejich bio-fyzikochemikálním prostředím. Mají také vliv na makroprostředí (Staudt *et al.* 2004).

Jedním z nejvýznamnějších druhů je *Pseudomonas aeruginosa*. Je to gramnegativní bakterie patřící do skupiny fluorescenčních pseudomonád. Jako potenciální patogen vyvolává řadu onemocnění a je nejčastěji izolovaným druhem z klinických materiálů. Většina kmenů vylučuje vysoce toxický toxin A, který může zamořovat například nemocniční prostředí. *Pseudomonas aeruginosa* je vysoce rezistentní k antibiotikům a je pečlivě sledována v lékařství, hygienické a potravinářské mikrobiologii (Sládková a Hlaváčová, 2011).

3.1.3.3 *Bacillus spp.*

Bacillus spp. je velmi rozšířený rod grampozitivních, tyčinkovitých, pohyblivých bakterií. Řada druhů se využívá díky bohatému enzymovému vybavení a produkci antibiotik ve farmaceutickém průmyslu, v potravinářském průmyslu, ale i v boji proti škodlivému hmyzu. Příslušníci tohoto rodu jsou považováni za méně patogenní. Díky svým sporám často *Bacillus* kontaminuje klinický materiál a je obtížné správně vyhodnotit klinický význam jejich přítomnosti (Sládková a Hlaváčová, 2011). *Bacillus spp.* se vyskytuje v mlékařských závodech. Přežívá i tepelné zpracování a akumuluje se v trubkách a ve spojích. Při průtoku teplé vody po povrchu déle jak 16h, může *Bacillus* i s dalšími termoresistentními bakteriemi vytvořit biofilm (Chmielowsky a Frank, 2003).

V posledních letech se jeden z druhů tohoto rodu - *Bacillus subtilis* stal modelovým organismem pro studium biofilmů. Bylo prokázáno, že divoké druhy *Bacillus subtilis* tvoří masivnější biofilmy než domestikované kultury izolované v laboratořích (Masaaki *et al.*, 2006).

3.1.3.4 *Salmonella spp.*

Rod *Salmonella* obsahuje podle nejnovějších taxonomických studií pouze 4 druhy, které jsou všechny patogenní. *S. typhi* způsobuje velmi vážné a často i smrtelné střevní onemocnění lidí – břišní tyfus, který se projevuje silnými bolestmi břicha, malátností a vysokými teplotami spojenými s blouzněním. Infekce se do zažívacího traktu dostává potravinami nebo pitnou vodou. *S. typhimurium*, v přírodě velmi hojná, je patogenní pro člověka a pro hlodavce. *S. enteritidis* se vyskytuje často v trusu ptáků (kachny, holubi), odkud se může dostat do potravin. Způsobuje onemocnění s krátkou inkubační dobou (6-20h), průjmy a zvracení. Tento typ onemocnění se označuje jako salmonelóza. Salmonelózu vyvolává také *S. choleraesuis*. (Šilhánková, 2008)

Salmonella spp. může být izolována v prostředí zpracování drůbeže, zejména v místech porážky a oddělování orgánů. Toto prostředí je velice vlhké, a tím pádem ideální pro tvorbu biofilmu. Bylo zaznamenáno, že se vyskytuje v potravinářských závodech na plastových, cementových i nerezových površích. (Chmielowsky a Frank, 2003).

3.1.3.5 *Escherichia coli*

E. coli je nejběžnější aerobní, gramnegativní bakterie v trávicím traktu člověka a teplokrevných zvířat, a vyskytuje se tedy i ve výkalech. Její přítomnost ve vodách nebo potravinách je proto ukazatelem, že zde došlo ke znečištění fekáliemi. Pravidelně se vyskytuje v potravinářských surovinách, které byly nutně v kontaktu s hnojenou půdou. Některé kmeny

způsobují průjmová střevní onemocnění a onemocnění močových cest. Přítomnost *E. coli* ve vodě nebo v potravině ukazuje, že stejným způsobem se do tohoto prostředí mohou dostat i patogenní střevní bakterie (tj. příslušníci rodu *Salmonella* nebo *Shigella*) (Šilhánková, 2008).

E. coli slouží jako důležitý modelový organismus. Byla na ní prokázána konjugace a replikace DNA. Produkuje koliciny, které jsou pro některé jiné bakterie toxické a přímo se podílí na tvorbě vitamínu K. Je to ovšem podmíněně patogenní mikrob, jenž může způsobovat i chorobné stavy (Sládková a Hlaváčová, 2011).

3.1.3.6 *Staphylococcus spp.*

Staphylococcus spp. je rod patogenních, grampozitivních bakterií člověka a dalších savců. Rozdělujeme je na koaguláza-pozitivní, které zahrnují nejvíce pathogenní zástupce *S. aureus* a koaguláza-negativní, kde je dalších 30 druhů (Rohilla, 2010). Bakterie *S. aureus* jsou fakultativně anaerobní, ale nejlépe rostou za aerobních podmínek při teplotách mezi 35-40°C. K inaktivaci buněk *S. aureus* dochází při teplotách 54-60°C, ale jejich enterotoxiny jsou inaktivovány při teplotách až 120°C za 26-30 min. Tyto toxiny jsou také rezistentní vůči proteolytickým enzymům jako jsou pepsin, trypsin, chemotrypsin atd. (Steinka a Kukulowicz, 2011).

S. aureus způsobuje infekce kůže, podkoží a přilehlých struktur, infekce kostí a kloubů, infekce dýchacích cest. U zvířat způsobuje závažný zánět mléčné žlázy (Němec a Horáková, 1993). Infekce těchto bakterií jsou komplikovanější vzhledem k jejich schopnosti vytvářet biofilm, což způsobuje sníženou permeabilitu antimikrobiálních látek (Hendry *et al.* 2009). Kultury *S. aureus*, vyskytující se v nemocničním prostředí, jsou většinou rezistentní na mnoho antibiotik. Termín MRSA odkazuje na resistenci vůči methicilinu, přičemž většina MRSA je dokonce multiresistentní. *S. aureus* vytváří také resistenci vůči antiseptikům a desinfektantům, jako jsou například čtyřmocné amoniové sloučeniny. (Rohilla, 2010).

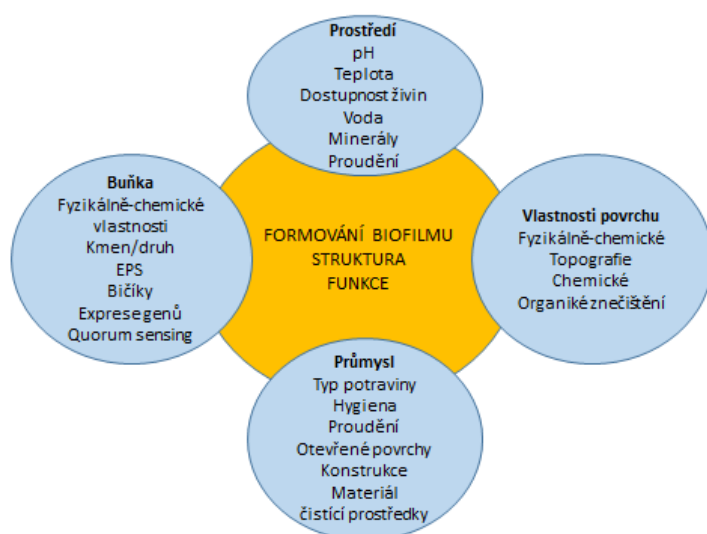
3.2 Biofilm

3.2.1 Bakteriální biofilm

Biofilm je uskupení bakterií vytvářejících přisedlé kolonie, které jsou primárně tvořeny bakteriemi a jejich polymerními produkty. Ty vytvářejí základní matici, do níž se postupně zachytávají různé látky nebo další mikroorganismy. Existence v biofilmu je pro bakterie z mnoha důvodů výhodnější a ve většině prostředí je také základním způsobem jejich přirozeného výskytu (Rulík *et al.*, 2011). Moderní studie říkají, že 95-99% mikroorganismů se vyskytuje ve formě biofilmu (Nikolaev a Plakunov, 2006). Kromě přírodního prostředí se biofilmy vyskytují ale i v mnoha humánních prostředích, kde způsobují četné problémy, neboť znečišťují povrchy, na nichž se tvoří, případně je poškozují korozi a rovněž mohou být zdrojem některých patogenních infekcí. Studium mikrobiálních biofilmů zaznamenalo v posledních 15-20 letech obrovský pokrok a tvorba biofilmů byla zaznamenána prakticky ve všech oblastech lidské činnosti (Rulík *et al.*, 2011).

Biofilmy v potravinářském průmyslu zvyšují riziko mikrobiální kontaminace produktů, což je dáno tím, že obsahují různé patogenní bakterie. Bakterie v biofilmu jsou ochráněny před sanitacními prostředky, což jim umožňuje snadnější přežití, a tím pádem snadnější kontaminaci potravin (Chmielewski a Frank, 2003).

Biofilmové formace, struktura a funkce jsou ovlivněny mnoha faktory, které znázorňuje Obrázek 1. Jsou to parametry povrchu, mikrobiologické faktory a faktory prostředí spojené s konkrétním místem výskytu v různých odvětvích průmyslu (Whitehead a Verran, 2015).



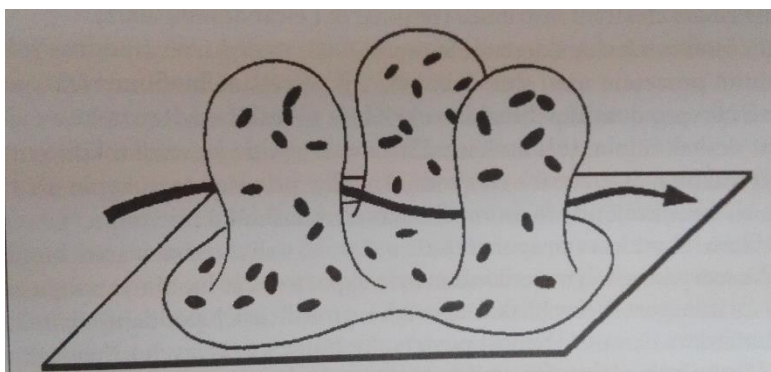
Obrázek 1: Faktory ovlivňující formaci, strukturu a funkci biofilmu v daném průmyslovém prostředí. Zdroj: Whitehead a Verran (2015)

3.2.1.1 Struktura biofilmu

Bakteriální biofilm je tvořen z cca 15% živých buněk a z cca 85% biofilmovým matrix. Přisedlé buňky biofilmů tvoří mikrokolonie, které jsou protkány vodními kanálky, jenž umožňují efektivní cirkulaci živin, metabolitů a mezibuněčnou metabolickou spolupráci (Donlan a Costerton, 2002). Matrix je extracelulární hmota produkovaná bakteriemi v biofilmu, které jsou v něm zanořeny. Skládá se ze shluků různých biopolymerů, které jsou známy jako extracelulární polymerní substance (EPS). EPS tvoří základ pro trojrozměrnou strukturu biofilmu a jsou zodpovědné za přilnutí k povrchu a soudržnost biofilmu. Biofilm imobilizovaný EPS drží buňky blízko u sebe, což umožňuje silné interakce, jako je mezibuněčná komunikace v biofilmu nebo synergické, symbiotické vztahy mezi mikrokoloniemi. Matrix ochraňuje organismy před vysycháním, oxidováním, biocidy, některými antibiotiky a kovovými ionty, UV zářením, prvky a hostitelským imunitním systémem (Flemming a Wingender, 2010).

Mikrokolonie tvořící biofilm mohou být složeny z jednoho nebo více druhů bakterií, což závisí na podmínkách prostředí, ve kterém žijí. Strukturu biofilmu může ovlivnit typ povrchu, rozhraní, dostupnost živin, složení mikrobiální komunity a hydrodynamika (Davey a O'toole, 2000).

Z různých pozorování a měření, především za použití konfokálního mikroskopu, byl vytvořen trojrozměrný model architektury biofilmu (Obrázek 2). Bakterie jsou v něm rozloženy nerovnoměrně, rostou v tzv. mikrokoloniích, shlucích kuželovitého nebo houbovitého tvaru (Rulík *et al.*, 2011).



Obrázek 2: Schematická představa biofilmu tvořeného shluky mikrokolonií houbovitého tvaru, spojenými navzájem kanálky a póry

Zdroj: Rulík *et al.*, 2011

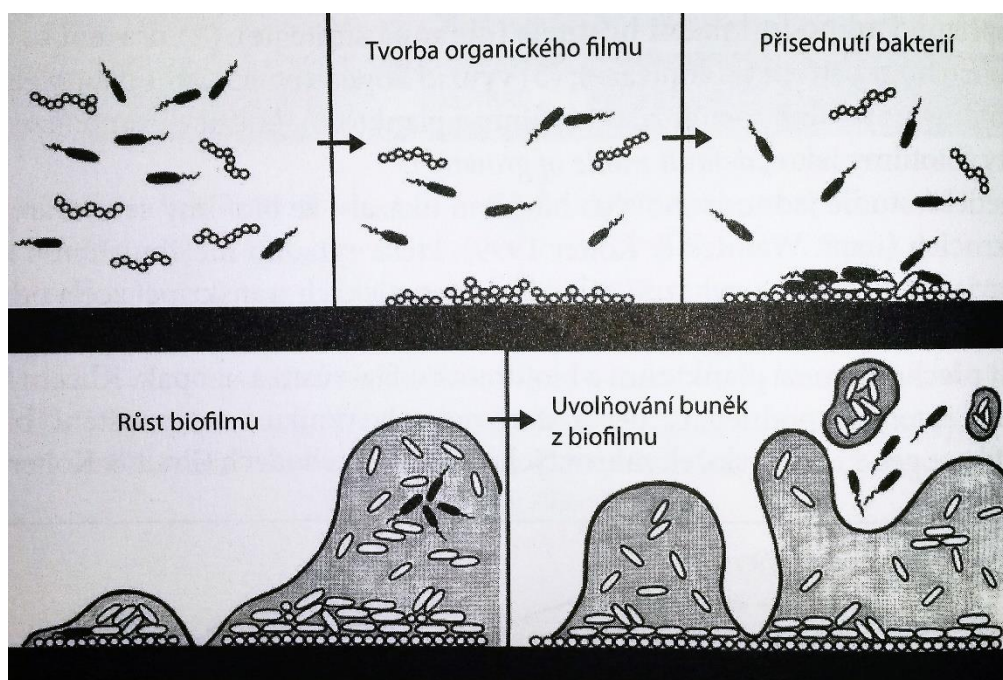
3.2.1.2 Vznik a vývoj biofilmu

Počátek tvorby biofilmu nastává přisednutím bakterií (adhezí) na povrch, poté následuje tvorba mikrokolonií a EPS a nakonec dozrávání (maturace) biofilmu. Přejít planktonní bakterie na biofilm je spuštěný signály z prostředí (Chmielewski a Frank, 2003). Adhezi buněk předchází tzv. *conditioning*, což je transport organických molekul media na povrch nosiče. Vlastní adheze je poměrně složitý proces, který je však z hlediska vzniku biofilmu klíčovým krokem a probíhá ve dvou fázích, reverzibilní adsorpce a permanentní zachycení. Bakterie používají k adhezi specifické, povrchově aktivní molekuly, zvané adheziny, což mohou být bílkoviny, glykopeptidy nebo polysacharidy (Rulík *et al.*, 2011). Proces tvorby biofilmu závisí na mnoha faktorech. Ideálním prostředím pro vznik a vývoj biofilmu je rozhraní mezi pevným povrchem a kapalinou. Pokud je povrch drsnější a hydrofobní, popř. obsahuje póry, bakterie na něj snadněji adherují než na povrch hladký a hydrofilní, bez pórů. Dalším faktorem je živné medium obklopující daný povrch, jeho hydrodynamické vlastnosti, teplota, pH a dostupnost živin. Také povrch buňky, přítomnost fimbrií a bičíků, produkce EPS, proteinů a polysacharidů ovlivňují schopnost buněk přisednout k povrchu (Donlan, 2002).

Po adhezi na vhodný substrát se buňky začnou dělit a akumulovat a produkují „primární biofilm“, na který se mohou přichycovat další buňky, „sekundární biofilm“. Kolonizační chování bakterií má různé strategie. Strategie „matka-dcera“ se vyznačuje adhezí mateřských buněk na povrch a produkcí dceřiných buněk. Strategie „mikrokolonií“ funguje na principu dělení a přisedání buněk jedna k druhé, čímž se vytváří jednovrstevné mikrokolonie. Další strategie jsou založeny na migraci buněk, vývoji vláknitého biofilmu nebo neúplném přichycení buněk k povrchu (Rulík *et al.*, 2011).

Následující fází je maturace (zrání) biofilmu. Hromadění, růst bakterií a vytváření mikrokolonií vede k produkci EPS a vytvoření rezistence k antibiotikům, biofilm si tak vytváří odolnější prostředí, a působí tak velké problémy. Bakteriální biofilm může vyvinout také resistenci k UV záření, schopnost biodegradace a produkci sekundárních metabolitů (Rulík *et al.*, 2011). Zralý biofilm se může skládat z jedné vrstvy buněk, nebo je vícevrstevný, složený z mikrokolonií, které drží v EPS a jsou protkané vodními kanálky (Chmielewski a Frank, 2003).

Fáze vývoje biofilmu jsou zobrazeny na obrázku 3.



Obrázek 3: Fáze vývoje biofilmu zleva doprava a dolů

Zdroj: Rulík *et al.*, 2011

3.2.1.3 Quorum sensing (QS)

QS je proces mezibuněčné komunikace bakterií, který zahrnuje syntézu, uvolnění a detekci signálních molekul (tzv. „autoinducers“) dalšími buňkami (Weerasekara *et al.*, 2016). Produkce signálních látek stoupá se zvyšujícím se počtem mikroorganismů v biofilmu a tyto látky se dále hromadí v buňkách i jejich okolí. Signální látky řídí dělení buněk, a tím hustotu populace a tvorbu hlenové polysacharidové matrice. V první fázi bakterie produkují zmíněné signální molekuly, které vznikají uvnitř buněk a jsou transportovány do vnějšího prostředí, nebo jsou na povrchu buňky a aktivují se až působením příslušného enzymu. Ve druhé fázi se signální molekuly kumulují v zevním prostředí okolo bakteriálních buněk. Ke třetí fázi dochází až při překročení prahové koncentrace signální molekuly. Signální molekula se následně naváže na receptor buňky na povrchu a poté se aktivuje intracelulární regulátorový protein, který spustí fosforylační kaskádu vedoucí k expresi mnoha genů (Rulík *et al.*, 2011). Bakterie v biofilmu používají QS pro optimalizaci jejich virulence a schopnosti přežití (Whitehead a Verran, 2015). QS představuje významný mechanismus regulace genů spojených s virulencí. U mnoha G+ i G- bakterií může absence jedné či několika složek QS systému způsobit významnou redukci

virulence (Rulík *et al.*, 2011). U *P. aeruginosa* je gen algC transkribován až po adhezi na povrch a zastavuje syntézu bičíku, ale zároveň syntetizuje alginát, což je u *P. aeruginosa* hlavní složka EPS. Produkce acylhomoserin laktonů (AHL) a dalších QS molekul regulují typickou biofilmovou formaci a specifickou virulenci *P. aeruginosa* (Chmielewski a Frank, 2003).

3.2.1.4 Quorum quenching

Pro získání konkurenční výhody některé bakterie vyvinuly „zhašecí“ enzymy (quenching enzymes) a inhibitory QS vedoucí ke zneškodnění celého QS systému jiných bakterií (Rulík *et al.*, 2011). Tento proces, narušující QS signalizaci je známý jako quorum quenching (QQ) (Banerjee a Ray, 2016). Příkladem těchto enzymů jsou degradující AHL laktonázy a AHL acylázy, které od sebe separují laktonový kruh a postranní acylový řetězec (Rulík *et al.*, 2011). Inhibitory QS mohou být molekuly s podobnou strukturou jako signální molekuly QS. Bylo zjištěno, že několik typů QQ molekul je rostlinného původu, například 2(5H)-furanon, produkováný červenou řasou *Delisea Purchreta* může inhibovat proteiny u bakterie *Aeromonas hydrophila* nebo taxifolin, produkováný dřevinou *Combretum albiflorum*, inhibující syntézu pyocianinu a elastázy u *P. aeruginosa*. Z rostlinných látek inhibující QS jsou jako nejvíce efektivní považovány flavonoidy, například kaempferol, naringerin, quercetin a apigerin (Banerjee a Ray, 2016).

3.2.2 Rezistence biofilmu vůči antimikrobiálním látkám

Mikrobiální buňky žijící ve formě biofilmu jsou mnohonásobně rezistentnější k biocidům než planktonické formy stejného kmene. Mnohé studie *in vitro* dokázaly, že účinnost biocidů je u biofilmových buněk oproti planktonickým nižší o jeden až čtyři řády. Například u *E. coli* je potřeba více než pětsetinásobná dávka ampicilinu pro snížení množství buněk o 3 řády. U *S. aureus* je pro stejný efekt potřeba desetinásobek vankomycinu. Při léčbě infekce antimikrobiálními látkami se sice daří eliminovat většinu planktonických a část biofilmových buněk, menší část buněk však přetrvává i vysoké koncentrace antimikrobiálních látek a později se může začít opět množit. Vznik biofilmové rezistence není dosud zcela objasněn, v nedávných studiích však byla použita řada modelových systémů, aby se zjistilo, jak a proč jsou biofilmy tak rezistentní (Rulík *et al.*, 2011).

3.2.2.1 Průnik látek do biofilmové vrstvy

Jedním z mechanismů biofilmové rezistence je zpomalení, omezení nebo znemožnění průniku antimikrobiálních látek do biofilmové vrstvy. Biofilm vytváří penetrační bariéru, která funguje jako částečně nepropustné síto nebo jako donor volných vazebných míst. Zpomalení difuze snižuje koncentraci antimikrobiálních látek uvnitř vrstvy, což má za následek snažší neutralizaci nebo snížení jejich vlivu pomocí degradujících enzymů (Rulík *et al.*, 2011). Například penetrace ciprofloxacinu proti *P. aeruginosa* v planktonní formě trvá 40s a ve formě biofilmu 21min (Donlan a Costerton, 2002).

Značný vliv na průnik antimikrobiálních látek do biofilmu má EPS matrix, které funguje jako donor volných vazebných míst, čímž zabraňuje difuzi těchto látek z okolního prostředí. Tento jev závisí jak na povaze antimikrobiálních látek, tak na povaze EPS matrix. Nejsilnějšího efektu dosahují hydrofilní a pozitivně nabitá antibiotika jako jsou například aminoglykosidy (Davey a O'Toole, 2000). Jako výměníky iontů fungují relativně silně hydratované polyanionické gelové polysacharidy a glykoproteiny EPS matrix, které adsorbují kationty antimikrobiálních látek, dokud nejsou všechna jejich vazebná místa nasycena. Vazba na složky biofilmu se může projevovat buď reakcí látky s konkrétní složkou biofilmu (chemické interakce), nebo vazbou na konkrétní složku biofilmu (fyzikální interakce). Projevují se zde např. vazby vodíkovými můstky, Van der Waalsovy síly, vazby dipólové apod. (Rulík *et al.*, 2011).

3.2.2.2 Fenotypové změny

Od přisednutí na povrch až po vývoj trojrozměrné struktury biofilm podléhá fyziologickým změnám buněk, které vedou ke zvýšení rezistence k biocidům. Tyto fenotypové změny jsou důsledkem exprese specifických genů, které byly spuštěny jako odpověď na podmínky mikroprostředí, ve kterém se vyskytují (Bridier *et al.*, 2011).

Hladina zvýšení rezistence je zpozorovatelná okamžitě po přisednutí na povrch, ještě před počátkem tvorby biofilmu. Bylo prokázáno, že ihned po přisednutí se v některých případech rezistence zvýšila 3-5násobně. Se stářím biofilmu se rezistence dále zvyšuje, což může být zprostředkováno akumulací HSL-like signálních molekul (Rulík *et al.*, 2011).

Fenotyp rezistence může být spojen také s produkcí MDR pump (multidrug efflux pumps). Ty mohou vyloučit z buňky i chemicky nepříbuzné antimikrobiální látky (Nikolaev a Plakunov, 2006). Například u *P. aeruginosa* jsou dosud známé tři druhy MDR pump a u dalších několika systémů, kódovaných v genomu *P. aeruginosa* se funkce MDR pump předpokládá. U

jedné z těchto pump byly při nízkých koncentracích ofloxacinu biofilmy bez MDR pumpy citlivější k tomuto antibiotiku a naopak (Rulík *et al.*, 2011).

Dalším příkladem vytvoření rezistence je při použití podprahové koncentrace antimikrobiální látky. Při této koncentraci se bakterie dokáže adaptovat na danou látku, začne syntetizovat specifické proteiny a stává se odolnější vůči této látce. Také při adhezi buněk na povrch podprahová koncentrace antimikrobiální látky stimuluje tvorbu biofilmu. Například při adhezi *Bacillus subtilis* bylo zjištěno, že transkripce většiny genů zodpovědných za tvorbu biofilmu byla zesílena v přítomnosti chlordioxidu, který aktivoval membránové kinázy KinC (Bridier *et al.*, 2011).

3.2.2.3 Přenos genů

Horizontální genový přenos je důležitý pro vývoj a genetickou rozmanitost mikroorganismů. Přítomnost plazmidů u bakterií a přenos genů konjugací je jeden z nejvíce prostudovaných mechanismů šíření genetické informace. U biofilmů tento přenos nastává uvnitř populace nebo mezi různými populacemi (Davey a O'toole, 2000). Předáním specifické sekvence DNA si bakterie vyměňují specifické znaky jako jsou metabolická aktivita, virulence a rezistence k antimikrobiálním látkám. Biofilm vytváří optimální podmínky pro přenos genetické informace vzhledem k hustotě buněk, přítomnosti EPS a nutričním podmínkám uvnitř biofilmu. Podmínky v biofilmu také zvyšují pravděpodobnost genových mutací. V jedné kultuře biofilmu se může vyskytovat více genetických variant s charakteristickými znaky, což může vést k výskytu více rezistentních subpopulací, které podpoří vitalitu celého biofilmu (Bridier *et al.*, 2011).

3.2.2.4 Rychlost růstu biofilmu

Bylo prokázáno, že rychleji rostoucí buňky jsou citlivější k antimikrobiálním látkám, než buňky rostoucí pomalu. Jelikož buňky v biofilmu rostou značně pomaleji, než buňky v planktonní formě, považuje se pomalý růst jako jeden z faktorů zvyšující rezistenci biofilmu k antimikrobiálním látkám (Nikolaev a Plakunov, 2006). Například pomaleji rostoucí *Escherichia coli* (v biofilmu) vykazovala větší rezistenci k ceftrimidu. U *S. epidermidis* byla prokázána přímá úměrnost mezi rychlostí růstu a náchylností buněk k ciprofloxacinu (Donlan a Costerton, 2002).

3.2.2.5 Perzistence

Jednou ze specifických adaptací buněk, která také přispívá k rezistenci biofilmů a objevuje se u malé části populace je vytvoření vysoce odolného stavu, který vykazuje značnou rezistenci. Buňkám schopným vytvoření tohoto stavu říkáme perzistoři. Tyto buňky jsou fenotypickými variantami, nikoliv genetickými mutanti a vyskytují se jak v biofilmu, tak u planktonických bakteriálních buněk. Avšak v biofilmu se vzhledem ke specifickým podmínkám vyskytují perzistoři s větší frekvencí a více tím přispívají k rezistenci biofilmu (Bridier *et al.*, 2011). V perzistentních buňkách jsou exprimovány specifické geny (konkrétně *hipA*), které jsou schopny blokovat antibiotika. U těchto buněk je limitován jejich růst (jsou převedeny do klidového stádia) a namísto toho získají rezistenci na podané antibiotikum. Pokud na biofilm působí stresové podmínky, mohou si buňky vybrat ze dvou strategií. Pokračovat v růstu i s rizikem vyhynutí, nebo potlačit růst a přejít do klidového stavu. (Nikolaev a Plakunov, 2007).

Možnosti ovlivnění biofilmové rezistence vnějšími vlivy

Rezistence biofilmů způsobuje velké problémy ve zdravotnictví, ale i jiných odvětvích lidského prostředí. Koncentrace antibiotik, které jsou schopné eradikovat biofilm, jsou o několik řádů vyšší než minimální inhibiční koncentrace (MIC), proto jsou prakticky nevyužitelné. Pro snažší boj s biofilmy byly testovány různé strategie (Rulík *et al.*, 2011).

Jednou z nich je inhibice systému QS. Biofilmy vytvořené mutantem *P. aeruginosa*, který nemá schopnost produkovat signály QS, jsou slabší s blíže umístěnými buňkami, mají méně viditelné extracelulární matrice a jsou citlivější ke kanamycinu než biofilmy vytvořené původním kmenem. Mezi látky, inhibující QS patří např. furanony nebo RNAIII-inhibující peptid, který navíc působí synergicky s konvenčními antimikrobiálními látkami. Furanony jsou antagonisty HSL a HSL-like signálních molekul, které začínají bakterie produkovat téměř okamžitě po adhezi na pevný povrch. Pomocí furanonů bychom tedy mohli působit již v tomto raném stádiu vzniku biofilmu (Rulík *et al.*, 2011).

Dalšími strategiemi jsou využití bioakustického, bioelektrického a bioradiačního efektu. Aplikace ultrazvuku v hladinách bez inhibiční či baktericidní aktivity (67kHz) zvyšuje inhibiční a baktericidní účinky gentamicinu proti planktonickým kulturám *P. aeruginosa* a *E. coli*. Ultrazvuk zvyšuje rychlost růstu bakterií a tím také zvyšuje jejich náchylnost k antibiotikům. Šance na eradikaci biofilmopozitivních bakterií zvyšuje též, v porovnání s antibiotikem samotným, použití slabého elektrického proudu kombinovaného

s antimikrobiálními látkami. Bioelektrický efekt umožnil snížit vysoké koncentrace aminoglykosidů, tetracyklinů či chinolonů nezbytné k eradikaci biofilmu, až k hladinám, které odpovídají likvidaci planktonických buněk stejných druhů. Radioaktivní ozáření dokáže zničit biofilm v důsledku kontrolované radiační expozice. Bylo prokázáno, že α -žáříče se mohou navázat na monoklonální protilátky tak, aby došlo k vazbě na polysacharidy biofilmu, což způsobí až 50% redukcii metabolické aktivity biofilmu. Při použití β nebo γ zářičů tato aktivita nebyla prokázána (Rulík *et al.*, 2011).

Proces difuze a přímá reakce antibiotika jsou procesy na sobě závislé. Při optimalizaci průniku antibiotik přes EPS se může značně zvýšit efektivita desinfekčního procesu. Účinným způsobem je mechanické narušení EPS, nebo použití detergentů na bázi enzymů. Při použití enzymatických metod je důležité znát přesné složení EPS daného druhu bakterie. Například EPS *Salmonella* a *E. coli* obsahují celulózu jako hlavní komponent nebo EPS druhů *Staphylococcus* obsahuje poly-N-acetylglukosamin. Podle složení EPS je třeba použít různé enzymy – proteázy, celulózy, polysacharid-depolymerázy, alginázy, liázy atd. (Bridier *et al.*, 2011).

3.2.3 Kultivace biofilmu *in vitro*

3.2.3.1 Typ adhezního povrchu

Existuje mnoho různých metod kultivace biofilmů. Při volbě kultivačního povrchu i jeho formátu by měl být brán v úvahu cíl příslušného experimentu (Crusz *et al.*, 2012). Vzhledem k rozdílným povrchovým vlastnostem mikroorganismů je potřeba volit pro různé druhy mikrobů různé typy kultivačních povrchů. Sklo se jeví jako vhodnější pro mikroorganismy s hydrofilnějším povrchem, umělé hmoty, jako je polystyren, jsou vhodnější pro hydrofobní mikroorganismy (Rulík *et al.*, 2011).

Pro testování schopnosti tvořit biofilm u bakteriálních kmenů se nejčastěji používají 96 jamkové mikrotitrační destičky (Merrit *et al.*, 2005) nebo zkumavky (Christensen *et al.*, 1985), vyrobené z tvrzeného polystyrenu či ze skla. Výhodou těchto statických metod je jejich snadné provedení a komerční dostupnost materiálů, a je možné je provést i se základním laboratorním vybavením. Jednoduchá manipulace s destičkami či zkumavkami umožňuje provést mnoho vzorků najednou. Tyto metody mohou být použity také pro sledování primárního přisednutí bakterií k povrchu, identifikaci signálů zodpovědných za přechod planktonní formy do biofilmu. Na druhou stranu, při použití těchto statických metod může docházet k nedostatku živin,

protože bakterie nejsou promývány stále čerstvým médiem a nejsou provzdušňovány, jako tomu je u jiných, dynamických metod (Merrit *et al.*, 2005). Pokud chceme biofilm detailně vizualizovat pomocí mikroskopu, nelze použít mikrotitrační destičky. Do média s bakteriemi se vloží např. skleněné nebo ocelové plátky, které jsou vyjmutelné a umožňují tedy detailní mikroskopii (Crusz *et al.*, 2012).

Z dalších forem kultivačních povrchů to jsou např. plastové disky v RDR – „Rotating Disc Reactor“ (Mohle *et al.*, 2007), sterilní filtrační papír (Buckingham-Meyer *et al.*, 2007) nebo zařízení zvané *Calgary biofilm device*, kde je biofilm kultivován na hrotech proti kusu mikrotitrační destičky (Ceri *et al.*, 1999).

Vystavení kultivačních povrchů účinkům séra či slin nebo navázání molekul poly-L-lysinu, případně jiných proteinů, jako jsou fibrin, laminin, fibronektin, vitronektin, vytvoří na povrchu vrstvu, někdy též zvanou pelikula, která také může podpořit adhezi mikroorganismů (Rulík *et al.*, 2001).

3.2.3.2 Kultivační podmínky

Kompozice média je pravděpodobně nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím produkci biofilmu *in vitro*. Pro kultivaci bakteriálního biofilmu se nejčastěji používají media TSB (tryptic soy broth) nebo BHI (brain heart infusion broth). Všeobecně více používaným médiem je TSB, které běžně obsahuje 0,25% glukózy a bývá obohaceno o další 1% glukózy. Koncentrace glukózy zvýšená o 0,25-4% zvyšuje schopnost bakterií tvořit biofilm. Některé studie prokázaly, že TSB bez přidání glukózy není funkčním médiem pro růst biofilmu. Pro detekci *S. aureus* biofilmu je doporučeno smíchat TSB + 1% glukózy a BHI + 1% glukózy +2% sacharózy. Dalším faktorem stimulujícím produkci biofilmu je použití podprahové koncentrace antibiotik, etanolu nebo NaCl, které vyvolají stresovou reakci bakterií a zvýší produkci biofilmu (Stepanovic *et al.*, 2007).

Mikrotitrační destičky musí být sterilní, kryté víčkem a mají 3 různé tvary jamek, tvar U (U-shaped), tvar V (V-shaped), a ploché. Pro kultivaci biofilmu se nejčastěji používají destičky s plochým dnem (Stepanovic *et al.*, 2007).

Přestože metoda mikrotitračních destiček nebo jiné metody statické kultivace jsou v praxi nejběžnější, bylo prokázáno, že dynamická kultivace vede k tvorbě většího množství biofilmu i k větší produkci EPS (Rulík *et al.*, 2011). Dynamické metody umožňují lépe simulovat podmínky v přirozeném prostředí. Biofilm, vlivem proudění tekutiny (médium), vytváří charakteristické struktury v závislosti na rychlosti proudění. Při vysoké rychlosti

proudění, kdy působí na biofilm největší stres, se vytvářejí struktury silnější, stabilnější a silněji přisedlé než při slabém proudění (Buckingham-Meyer *et al.*, 2007). Nejjednodušším způsobem dynamické kultivace je použití rotační třepačky, která protřepává tekutinu v kultivační nádobě (Rulík *et al.*, 2011). Velice běžným a oblíbeným systémem je také metoda „flow cells“, která umožňuje růst biofilmu bez přítomnosti planktonických buněk, které jsou vymývány proudem (flow). Metoda je však použitelná pouze pro nízké rychlosti proudu, vzhledem k velké spotřebě média (Crusz *et al.*, 2012). Kapková metoda („Drip flow method“) využívá také pomalého proudění tekutiny, nejprve se 18-24h ponechá systém bez proudění, poté po kapkách proudí kultivační médium. Pro vysokou rychlost proudění se využívá CDC biofilm reactor, kde rychlost otáček reaktoru je např. 180 rpm pro *P. aeruginosa* nebo 125 rpm pro *S. aureus* (Buckingham-Meyer *et al.*, 2007). Podobnou metodou je také rotační diskový reaktor, který umožňuje proudění a zároveň konstantní podmínky kultivace (Mohle *et al.*, 2007). Poměrně jednoduchou, ale efektivní metodou je kultivace na hrotech proti kusu mikrotitrační destičky. Využívá klasické mikrotitrační destičky a víčka s hroty, které se zanoří do jamek a vlivem proudění média se na hrotech vytváří biofilm. Pro tuto metodu se využívá zařízení „Calgary biofilm device“ (Ceri *et al.*, 1999).

Kultivační teplota by se měla pohybovat kolem 35-37 °C. Platí ovšem, že teplotu je potřeba přizpůsobit typu kultivovaného mikroorganismu i účelu experimentu. Při kultivaci v mikrotitrační destičce je optimální doba pro nárůst biofilmu 24h +/- 30 min. Čím vyšší je doba inkubace, tím větší je densita biofilmu (Stepanovic *et al.*, 2007).

Důležitým krokem je také příprava inokula. Běžně se inoum připravuje přímo z kolonií narostlých na kultivačním agaru, které se přenesou do média a nechají se inkubovat přes noc (24h). Poté se inokulum naředí, nejčastěji 1:100 a může se použít pro zaočkování (Stephanovic *et al.*, 2007).

3.2.3.3 Hodnocení vytvořeného biofilmu

Biofilm pozitivní kmeny vytvářejí na stěně kultivační nádoby souvislou, pevně adhezující vrstvu. Prvním krokem vyhodnocení je odstranění planktonických buněk a promytí. Bohužel při tomto kroku se může snadno odloučit i slabě adherovaný biofilm a tím dojde ke zkreslení výsledků, případně ke vzniku falešně negativních výsledků (Rulík *et al.*, 2011). Obsah destiček se vyklepne a 3x propláchne nejčastěji PBS (phosphate-buffered saline, pH: 7,2). Po vyschnutí následuje fixace biofilmu, která může být provedena horkým vzduchem

60°C po dobu 1h, nebo fixačním činidlem. Tím může být Bouinovo fixační činidlo nebo metanol, který je téměř stejně efektivní. Po dvaceti minutách působení se obsah destiček vyklepne a nechá vyschnout, nejlépe přes noc při pokojové teplotě (Stephanovic *et al.*, 2007). Vytvořený biofilm se hodnotí obvykle po obarvení vhodným barvivem, kterým je nejčastěji krystalová violet' či safranin (Christensen *et al.*, 1985). Barvivo se následně vymyje opatrným osprchováním, dokud se nevyplavuje z destičky. Po vysušení se přidá 150 µl 95% etanolu, aby se uvolnilo barvivo absorbované biofilmovými buňkami a destička se přikryje víčkem, aby se minimalizovala evaporace (Stephanovic *et al.*, 2007). Vyhodnocení může probíhat okometricky, kdy sledujeme intenzitu barvy v jamkách, ale pro objektivní hodnocení se používá kvantifikační spektrofotometrická metoda (Christensen *et al.*, 1985). Vlnová délka pro měření optické density narostlého biofilmu spektrofotometrem se pohybuje mezi 500-600 nm (Merrit *et al.*, 2005).

Dobrou představu o množství vytvořeného biofilmu dává také přesné zvážení jeho sušiny. Velmi rozšířené je používání kolorimetrických médií, která kvantifikují biofilm na základě metabolické aktivity buněk v něm přítomných. Jiným způsobem detekce, případně i kvantifikace biofilmu je např. průkaz jeho biochemické aktivity pomocí ATP bioluminiscence (Rulík *et al.*, 2011).

Pro pozorování bakterií žijících v biofilmu je ideální metodou konfokální skenovací laserová mikroskopie (CLSM). Díky ní lze pozorovat morfologii buněk, architekturu biofilmu, metabolismus buněk a chemické látky, které jsou součástí matrix biofilmu. Výhodou této metody je, že lze preparáty sledovat v plně hydratovaném stavu a nedochází tak k dehydrataci, a tím poškození struktur, jako tomu je u jiných metod. CLSM se využívá zejména při kultivaci biofilmu metodou „flow cell“ (Davey a O'Toole, 2000).

3.3 Desinfekce

Pojem desinfekce zahrnuje zničení choroboplodných zárodků na abiotických površích, v prostředí i na lidském či zvířecím těle. Při desinfekci se snažíme usmrtit především patogenní mikroorganismy, na rozdíl od sterilace, kdy je žádoucí usmrcení veškerých, i neškodných, mikroorganismů. Někdy jsou používány pojmy jako sanitace, asanace nebo dekontaminace, které jsou téměř synonymem pro desinfekci (Raška *et al.*, 1956).

Podle epidemiologické situace rozlišujeme desinfekci ohniskovou a ochrannou, neboli profylaktickou. Ochranná desinfekce má za úkol předejít vznik a šíření nákaz běžnými hygienickými opatřeními ať už v nemocnici, na veřejných prostorech či v domácím prostředí. Ohnisková desinfekce působí přímo na konkrétní nákazu na přesném místě, např. u nemocného člověka. Probíhá intenzivně do doby, kdy jsou veškeré patogeny usmrceny a odvedeny z těla. Ohnisková desinfekce by měla dosáhnout úplného zničení choroboplodných zárodků, přetrvávajících na všech složkách prostředí kolem nemocného (Raška *et al.*, 1956).

Prostředky, které ničí mikroorganismy, nazýváme germicidní nebo biocidní (Raška *et al.*, 1956). Desinfekci můžeme provádět prostředky fyzikálními či chemickými (Borský a Pacovský, 1956).

3.3.1 Fyzikální desinfekce

3.3.1.1 Teplota

Základem letálního účinku tepla je irreverzibilní denaturace bílkovin, tedy inaktivace bílkovin s enzymatickou aktivitou. Inhibice prvotních životních funkcí buňky může být výsledkem inaktivace pouze jednoho, ale klíčového enzymu, což způsobí smrt buňky. Letální teplota pro vegetativní buňky většiny mezofilních mikroorganismů je 60-65°C po dobu 10-15min, avšak spóry jsou inaktivovány za stejnou dobu až při teplotách nad 120°C. V praxi se letálních účinků tepla využívá ke sterilaci různých nástrojů, živných půd a ke konzervaci potravin. (Němec a Horáková, 1993). Pro prodloužení údržnosti potravin a zachování části nutričních hodnot se používá pasterace, při které dojde k likvidaci vegetativních forem mikroorganismů, ne však k inaktivaci spor (McDonnell, 2007).

Nízké teploty mohou způsobit zpomalení nebo pozastavení růstu mikroorganismů, nebo dokonce jejich eradikaci. Výhodu proti nízkým teplotám mají psychrofilní bakterie, mezi které patří např. rod *Listeria*, které přežívají a jsou schopné se množit i při teplotách kolem 4°C. Ve většině případů dokáží mikroorganismy přečkat nízké teploty a začít se opět množit až při

optimálních podmínkách. Mražení, jako metoda konzervace musí probíhat při teplotách od -10°C do -80°C , obvykle s přítomností stabilizeru, jako je např. glycerol nebo dimetyl-sulfoxid. Může se využít také vysoušení mrazem pomocí sublimace, nebo konzervace tekutým dusíkem (-196°C) (McDonnell, 2007). Při ochlazení pod bod mrazu dochází k poškození buněčné struktury vytvořenými krystaly vody v buňce. Je-li však zmrazení dosti rychlé, vytvářejí se jen malé krystaly a buňky nejsou poškozeny (Leittgeb a Vošta, 1988).

3.3.1.2 Záření

Ultrafialové paprsky mají silné mikrobicidní a také mutagenní účinky na mikroorganismy. Nejúčinnější jsou v zóně od 260 do 270 nm, tj. v oblasti, v níž jsou absorbovány nukleovými kyselinami. Nukleoproteidy mají maximum adsorbce při 260 nm a jejich poškozením je možno nejlépe vysvětlit účinek tohoto záření (Leittgeb, Vošta, 1988). DNA je poškozována tím, že vznikají dimery sousedních pyrimidinových bází – TT, CT a CC. Účinnost UV světla se snižuje intenzivním osvětlením viditelným světlem o vlnové délce 360-500nm, neboť je umožněna tzv. fotoreaktivace, tj. enzymové rozštěpení pyrimidinových dimerů (Šilhánková, 2008). UV záření se používá pro desinfekci pitné vody, sterilaci vzduchu, povrchovou sterilaci předmětů a pracovních ploch. Může být použito také pro deodoraci, dechloraci nebo deozonaci (McDonnell, 2007).

Záření o vlnové délce kratší než 10 nm (Roentgenovo záření, γ -záření a kosmické záření) mají silné mutagenní i letální účinky (Šilhánková, 2008). Ve srovnání s UV zářením mají značnou penetrační schopnost. Mechanismus účinku tohoto ionizujícího záření spočívá v ionizaci molekul intracelulární vody za tvorby volných hydroxylových radikálů, ve vzniku oxiranů a v přímém účinku na molekuly DNA (indukce zlomů chromozomů). γ -paprsků se v omezené míře v praxi využívá ke „sterilaci za studena“ některých látek citlivých ke zvýšené teplotě (Němec a Horáková, 1993).

Antimikrobiální aktivitu mohou vykazovat také mikrovlny a infračervené záření. Jejich účinek spočívá v rychlém přenosu tepla, díky kterému dochází k inaktivaci mikroorganismů (McDonnell, 2007).

3.3.1.3 Filtrace

Filtrace je jednou z nejstarších metod dekontaminace kapalin a plynů, přičemž se nejedná o přímou inaktivaci mikroorganismů, ale o jejich mechanické odstranění pomocí speciálních filtrů (membrán), které jsou založeny na různé velikosti molekul. Příkladem filtrace

kapalin je sterilace vody (např. do laboratoří, nemocnic) a filtrace materiálů citlivých k vyšším teplotám (produkce antibiotik, farmaceutik a vakcín). Nejběžnějším přístrojem pro filtraci vzduchu je HEPA (high-efficiency particulate air), který dokáže filtrovat částice nad 0,3 μ m a také menší virové částice 0,1 μ m, které se do filtru adsorbují. Při filtraci vzduchu je důležité zajištění stálého proudění vzduchu stejným směrem, což je princip tzv. flowboxů (laminar-flow cabinet), které se používají zejména v laboratořích. (McDonnell, 2007).

3.3.1.4 Další faktory

Mikrobicidní efekt může mít také elektrický proud. Střídavý elektrický proud o vyšší intenzitě působí na bakterie nepříznivě svými tepelnými účinky, zatímco stejnosměrný proud svými elektrolytickými účinky. Při elektrolýze mohou vznikat v prostředí mikrobicidní sloučeniny, které na mikroorganismy působí letálně (Šilhánková, 2008).

Jelikož mikroorganismy vyžadují velké množství vody v okolním prostředí můžeme je zneškodnit také vysušením (Leittgeb a Vošta, 1998).

Zvukové vlny s frekvencí větší než 20 kHz (ultrazvuk) působí inhibičně na mikroorganismy. V tomto případě hovoříme o kavitačním ultrazvuku, protože jeho působením dochází k prudké pulzaci membrán a plasmy doprovázené rychlým střídáním tlaku. Vnikají drobné trhlinky, kam difundují plyny rozpuštěné ve vodním prostředí – kavitační bublinky. Jejich náhlým stlačením vzniká velký tlak, který má za následek mechanické poškození buňky (Němec a Horáková, 1993).

Mechanického poškození buněk lze docílit např. intenzivním mícháním nebo třepáním s tzv. abrazivním materiálem (jemný písek, drcené sklo, drobné skleněné kuličky), jehož částice nesmí přesahovat velikost buněk. Dalším příkladem je zmrazení husté suspenze buněk na -15 až -30°C a protlačení úzkou štěrbinou za pomoci vysokého tlaku. Tyto metody však nepoškozují všechny buňky, za dobrý výsledek se považuje rozdrcení 80-90% buněk (Šilhánková, 2008).

3.3.2 Chemická desinfekce

Látky s nepříznivými účinky na mikroorganismy nazýváme antimikrobiální látky. Pokud pouze zastavují růst mikroorganismů, jsou to látky mikrobistatické, pokud je usmrcují, tak je nazýváme mikrobicidní (proti bakteriím: bakteriostatické, baktericidní). Tyto látky buďto poškozují určité bakteriální struktury (membrány, ribozomy, atp.), působí na mikrobiální

enzymy, nebo mohou poškozovat DNA. Možné jsou i kombinace různých těchto účinků (Šilhánková, 2008).

3.3.2.1 Kyseliny a zásady

Jako desinfekční prostředky používáme kyseliny s krátkým či dlouhým řetězcem, deriváty fenolu a jejich estery. Silné kyseliny jako HCl nebo H₂SO₄ vykazují také antimikrobiální aktivitu, ale vzhledem k bezpečnosti se v praxi příliš nepoužívají. Mezi běžně používané kyseliny patří kyselina octová, propionová, citronová a sorbová. Nejčastěji se používají jako konzervanty do potravin a při výrobě farmaceutik či kosmetiky (McDonnell, 2007). Koncentrace vodíkových iontů snižuje pH prostředí, které vede ke změnám enzymových reakcí bakterií, zastavení jejich růstu a úhynu buňky. Při vyšší koncentraci těchto iontů dochází k denaturaci buněčných bílkovin a zničení bakteriální stěny. Účinek kyselin běžně stoupá s jejich silou (stupněm disociace). Výjimkou jsou však některé slabé kyseliny (např. kyselina benzoová), které mají vyšší účinek v nedisociované formě. (Leittgeb a Vošta, 1998).

Zásady vyvolávají u mikrobů bobtnání, osmózu, hydrolysují bílkoviny, štěpí jejich uhlovodíkové části a zmýdelňují tuky. Působí kromě vegetativních forem mikroorganismů také na jejich spóry. V praxi se používají silné zásady jako NaOH, KOH, Ca(OH)₂ a to zejména ve veterinární desinfekci, v koželužnách a při výrobě mýdel. Další využití je omezené, protože mají stejně jako kyseliny žíravé vlastnosti (Raška *et al.*, 1956).

3.3.2.2 Alkoholy a fenoly

Mezi nejčastěji používané alkoholy pro desinfekci patří etanol, ale také isopropanol, a propan-1-ol. Používají se pro běžnou desinfekci i jako čistící prostředky, a často se dají použít i v kombinaci s jinými desinfektanty (McDonnell, 2007). Etanol (líh) je nejúčinnější v koncentraci 70% (cca 4x více než při 80%). Vyšší koncentrace etanolu absorbuje vodu, sráží bílkoviny, a proto neproniká do stěn buněk mikroorganismů, na nichž se tvoří slupka. Pod 60% je etanol také neúčinný (Borský a Pacovský, 1956).

Mezi fenoly a fenolové sloučeniny používané k desinfekci patří fenol, kresoly a xylenol, ale existují i jejich modifikace např. chlorfenol, bifenoly (McDonnell, 2007). Fenol se dobře rozpouští v lipidech a bílkovinných látkách a proniká tedy dobře do bakteriální buňky, kde sráží bílkoviny protoplazmy, čímž zabíjí mikroorganismy. Fenol je velmi účinný na vegetativní formy mikroorganismů, avšak na spory nebo viry neúčinkuje. Hodí se např. pro omývání povrchů nebo tekutin, naopak není dobrým desinfektantem pro pevné materiály (Raška *et al.*,

1956). Homologem fenolu je kresol, který je dokonce 3x účinnější než fenol, ale je jedovatý, smrtelná dávka je 30g (Borský a Pacovský, 1956).

3.3.2.3 Halogeny a jejich sloučeniny

Z halogenů je pro desinfekci nejčastěji využíván chlór a jód. Chlór se používá zejména při desinfekci vody. Sloučeniny chloru, jako jsou chlornany a chloraminy, mají stejný mechanismus účinku jako chlór. Jedná se o tvorbu kyseliny chlorné za současného rozkladu na kyslík a HCl. Kyslík svými oxidačními účinky porušuje některé buněčné struktury, což má na buňky mikroorganismů letální následky (Němec a Horáková, 1993).

Jód vykazuje antimikrobiální účinky nejen na vegetativní formy, ale i na spory. Vazbou na bílkoviny a inhibicí enzymatické aktivity buněk dojde k přerušení důležitých pochodů a buňka zanikne. V praxi se používá roztok jódu v alkoholu, např. k desinfekci pokožky (Němec a Horáková, 1993).

3.3.2.4 Sloučeniny kovů

Některé kovy i metaloidní prvky jako Ag, Cu, Hg, Mn, I, již v nepatrném množství usmrcují mikroorganismy (Raška *et al.*, 1956).

Nejčastěji se používají sloučeniny mědi a stříbra, jejichž biocidní látkou jsou kationty Cu^{2+} , Ag^{2+} . Sloučeniny mědi jako např. CuSO_4 , CuCl_2 , CuO , sloučeniny stříbra, AgNO_3 , AgSD (sulfadiazin). Měď se může používat jako konzervační prostředek do barev, kde po nanesení poskytuje antimikrobiální bariéru na povrchu, nebo do cementu či dřeva. Stříbro se používá k desinfekci pitné vody, ale i vody např. v bazénech. Může se také používat jako konzervant do potravin. (McDonnell, 2007).

Z těžkých kovů se využívají také sloučeniny rtuť. Tyto sloučeniny působí spíše bakteriostaticky než bakteriocidně a jejich působení může být inaktivováno některými sloučeninami síry (Raška *et al.*, 1956).

3.3.2.5 Povrchově aktivní látky (tenzidy)

Tyto látky mají hydrofobní i hydrofilní část molekuly a reakcí s tekutinami (rozpouštědly) snižují jejich povrchové napětí. Hydrofilní část molekuly se rozpustí ve vodě (jiném rozpouštědle) a hydrofobní konce molekuly vyčnívají na povrch, čímž se snižuje povrchové napětí a umožní se větší rozptýlení vody po povrchu. Vzhledem ke struktuře a elektrochemické povaze rozlišujeme povrchově aktivní látky anionaktivní, kationaktivní,

amfoterní a neionogenní. Anionaktivní a neionogenní látky nemají významné antimikrobiální účinky, využívají se spíše pro čištění povrchů, nebo jako aditiva pro zlepšení účinku jiných biocidů. Amfoterní látky mají vyšší antimikrobiální aktivitu spolu s detergentními účinky. (McDonnell, 2007).

Nejpoužívanějšími jsou kationtové povrchově aktivní látky, konkrétně kvartérní amoniové sloučeniny. Jejich molekula obsahuje centrální atom dusíku se čtyřmi navázanými skupinami, které mohou být různé. Jejich názvy se vytváří podle struktury, např. hexadecyltrimethylammonium bromid (=CTAB=cetrimid). Používají se běžně jako velice účinné desinfekční prostředky v průmyslu, nemocnicích nebo v domácnostech. (McDonnell, 2007).

3.3.2.6 Peroxidy a další formy kyslíku

Látky, které způsobují oxidaci, tedy příjem elektronů od jiných látek, mají také antimikrobiální účinky. Nejčastěji se používají peroxidy, H_2O_2 , ClO_2 , ale také halogeny. Peroxid vodíku je jedním z nejvíce používaných desinfektantů vůbec (McDonnell, 2007).

3.3.2.7 Meridasan Profi

Meridasan Profi je širokospektrální, desinfekční prostředek, který je schválený pro použití v zemědělských a potravinářských provozech Ústavem pro státní kontrolu biopreparátů a léčiv v Brně. Účinnou látkou je PHMG (polyhexamethyleneguanidin), což je kationtový polymer, který ničí mikroorganismy (řasy, plísně, bakterie, vláknité houby) a viry jednoduchým principem – poruší mechanicky transportní proteiny v buněčné stěně mikroorganismů (u virů nukleové kyseliny). Tímto způsobem dochází k zastavení komunikace mezi buňkou a vnějším prostředím, přestává fungovat buněčné dýchání a buňka zaniká. PHMG je kladně nabitá molekula, buňka, která na základě svého složení, nese záporný náboj. Díky tomuto jevu se PHMG s buňkou „najdou“ a dochází k výše zmíněnému efektu. Další účinnou látkou je alkyl (C_{12} - C_{16}) benzyl (dimethyl)amonium chlorid. Na povrchu, který je ošetřen tímto desinfekčním prostředkem vznikne tenká polymerová vrstva, která po předepsané expoziční době eliminuje biologické znečištění a ochrání povrch po dobu několika týdnů. Používá se v potravinářských skladech, supermarketech, výrobnách a zpracovnách potravin, v domácnosti, veřejných budovách a dalších místech (Fajfrová, 2015).

3.4 Účinné rostlinné látky

Vzhledem k masivnímu používání antibiotik v dnešní době si bakterie vyvinuly mnoho mechanismů rezistence a vytvořily dokonce nové kmeny rezistentní k určitým druhům látek. Například u rodů *Staphylococcus*, *Enterococcus* nebo *Pseudomonas* se vytvořily silné rezistentní kmeny MDR (multidrug-resistant) a XDR (extremely drug-resistant), na které již běžně užívaná antibiotika neúčinkují. Vhodnou alternativou s antimikrobiálními i antibiofilmovými účinky jsou právě přírodní rostlinné látky (Slobodníková *et al.*, 2016). Moderní medicína se zabývá především kombinacemi těchto přírodních látek a nalezením synergií mezi nimi nebo jinými antimikrobiálními látkami (např. i antibiotiky). Názorným příkladem je synergie thymolu a karvakrolu, které zvyšují permeabilitu antibiotik u gramnegativních bakterií nebo flavonoid *Thymus vulgaris*, který v kombinaci s tetracyklinem a β -laktamem vykazuje synergii proti methicilin-resistentnímu *S. aureus* (MRSA) (Wagner a Ulrich-Merzenich, 2009). Velmi silné synergie byly také nalezeny mezi saponiny (aescin, digitonin) a různými terpeny (a-pinen, thymol, menthol) (Herrmann a Wink, 2011).

3.4.1 Metody extrakce

Extrakčních metod využíváme, abychom získali co nejvyšší koncentraci žádaných látek, a zároveň minimalizovali koncentraci látek nežádaných. Běžně se používaly pro extrakci čerstvé rostliny, ale v posledních letech se využívá rostlin sušených, neboť čerstvé rostliny podléhají rychlé degradaci. Metody pro extrahování rostlinných látek jsou různé. Rostlinný extrakt získáme při maceraci, infuzi či Soxletově extrakci, při destilaci vodní parou nebo při hydrodestilaci získáme rostlinnou silici (Tiwari, *et al.*, 2012).

3.4.1.1 Macerace

Macerace je smáčení rostlinného materiálu v organickém rozpouštědle při pokojové teplotě. Po ukončení extrakce se rostlinný materiál oddělí od rozpouštědla filtrací a následně se může znovu opakovat, dokud se nevyluhují všechny látky. Jedna extrakce trvá několik hodin až dní, při opakované extrakci může proces kompletní extrakce trvat i několik týdnů. Tato metoda je časově náročná, ale vzhledem k extrakci při pokojové teplotě se může využít u sloučenin citlivých k vysokým teplotám (Tiwari, *et al.*, 2012).

3.4.1.2 Infuze

Tato metoda je podobná maceraci, ale probíhá za stanovené teploty (do 100°C) a po určité době (minuty až hodiny). Jako rozpouštědlo se používá nejčastěji voda. Názorným příkladem je příprava čaje, kde se rostlinné látky extrahují do vařící vody (Tiwari, *et al.*, 2012).

3.4.1.3 Soxletova extrakce

K provedení extrakce tohoto typu se používá speciální aparatura složená z baňky, Soxletova přístroje a kondenzátoru. V baňce, která je ve spodní části aparatury, je rozpouštědlo, které je zahříváno. Výpary rozpouštědla kondenzují na vrcholu aparatury a padají do nádoby s materiálem, který extrahujeme. Po naplnění této nádoby vyteče rozpouštědlo zpět do baňky. Rozpuštěné látky se oddělí destilací od rozpouštědla, které se dále odpařuje a celý proces se opakuje, dokud nejsou všechny látky extrahovány (Tiwari, *et al.*, 2012).

3.4.1.4 Destilace vodní parou, hydrodestilace

Destilace vodní parou se používá k extrakci látek nerozpustných ve vodě, zejména tedy rostlinných silic. Vodní pára proudí skrz rostlinný materiál a uvolňuje silici. Podobnou variantou je též **hydrodestilace**, kde se rostlinný materiál ponoří do vody a poté přivede k varu. Podmínky pro extrakci mohou být upraveny v závislosti na druhu materiálu (např. kořeny, kůra) teplotou a dobou destilace, popř. přidáním glycerolu (Tiwari, *et al.*, 2012).

3.4.2 Rostlinné sloučeniny *Cannabis sativa*

Sekundárním metabolismem *Cannabis sativa* je produkována řada různých látek, jsou to především kanabinoidy, terpeny a fenolické sloučeniny. Kanabinoidy jsou velice účinné bioaktivní látky, které zahrnují mimo jiné také THC (delta-9-tetrahydrokanabinol). Kvůli svým psychoaktivním účinkům je však pěstování *Cannabis sativa* s obsahem THC nelegální. Nicméně ostatní sloučeniny této rostliny jsou také významné a mohou působit synergicky s dalšími farmaceutiky (Andre, 2016).

3.4.2.1 Kanabinoidy

Konopí obsahuje více než 483 chemických složek, z nichž 66 jsou právě kanabinoidy. Patří sem již zmíněné THC, ale také např. kanabidioly (CBD), kanabigeroly (CBG) nebo kanabinoly (CBN) a další. Psychoaktivní účinky má pouze THC a jeho deriváty nesoucí karboxylovou skupinu. Tyto deriváty se po zahřátí (kouření, vaření) přemění na aktivní formu

THC. Naopak při skladování konopné pryskyřice může docházet k oxidaci THC na neaktivní složky. Z klinického hlediska ale vykazují kanabinoidy také terapeutické účinky. Za prokázané lze považovat příznivé účinky kanabinoidů na nevolnost a zvracení (jako vedlejších účinků protinádorové terapie), anorexii a kachexii. Relativně dobře jsou také potvrzené účinky na neurogení bolest, poruchy pohybu (Parkinsonova choroba, Touretův syndrom) a astma. Méně potvrzené jsou účinky na alergie, záněty, infekce, epilepsii, závislost a abstinenční syndrom (Fišar, 2005).

3.4.2.2 Terpeny

Terpeny u *Cannabis sativa* jsou zodpovědné za její chuť a vůni. Podle počtu izoprenových jednotek (IJ) rozlišujeme monoterpeny (2IJ), seskviterpeny (3IJ), triterpeny (6IJ) a polyterpeny (více IJ). Mono a seskviterpeny byly detekovány v květech, listech a kořenech rostliny. Hlavními monoterpeny v *Cannabis sativa* jsou D-limonen, β -myrcen, α a β -pinen, terpinolen a linalool a seskviterpeny β -caryophylen a α -humulen. Triterpeny byly detekovány v kořenech *Cannabis sativa* – friedelin a epifriedelanol, ve vláknech – β -amyrin a v oleji ze semen rostliny – cycloartenol, β -amyrin a dammaradienol. Terpeny mají významné farmaceutické využití. Například β -myrcen a linalool se považují za silné protizánětlivé a analgetické sloučeniny. β -caryophylen, který se vyskytuje také např. v černém pepři, funguje protizánětlivě a také ochraňuje žaludeční sliznici. β -amyrin a cycloartenol vykazují antimikrobiální aktivitu proti bakteriím a plísním a mají také protirakovinné účinky (Andre, 2016).

3.4.2.3 Polyfenolické látky

Velkou skupinou rostlinných látek jsou také polyfenoly, mezi které řadíme flavonoidy, taniny, antocyaniny, fenolické kyseliny, kumariny, lignany a ligniny (Slobodníková *et al.*, 2016). U *Cannabis sativa* bylo nalezeno kolem 20 flavonoidů, mezi které patří např. apigenin, luteolin, kaempferol, quercetin nebo cannflavin A a B, které jsou typické pouze pro *Cannabis sativa* (Andre, 2016). Polyfenolické sloučeniny hrají v přírodě důležitou roli v rezistenci proti mikrobiálním patogenům a ochraně proti volným radikálům a toxinům a byly u nich zjištěny různé mechanismy antimikrobiální aktivity. Polyfenolické sloučeniny reagují s bakteriálními proteiny a strukturami buněčné stěny, mohou poškozovat cytoplazmatickou membránu, snížit její propustnost, inhibovat syntézu DNA, buněčné stěny nebo energetického metabolismu. Kromě účinků těchto látek proti bakteriím byla téměř u všech prokázána také jejich antibiofilmová aktivita, jejíž mechanismus spočívá zejména v ovlivnění systému QS, ale může

býz způsobena i jinými mechanismy. Například antibiofilmová aktivita u hamamelitaninu je způsobena inhibicí regulátoru QS u stafylokoků. Aktivita quercetinu je způsobena ovlivněním exprese genů, zodpovědných za tvorbu biofilmu, zejména geny *icaA* a *icaD*. Ellagová kyselina je schopná inhibovat tvorbu biofilmu poškozením buněčné membrány bakterií a gallotanin inhibuje syntézu polysacharidových sloučenin, které slouží k adhezi bakterií k povrchu, tudíž inhibuje i formování biofilmu (Slobodníková *et al.*, 2016).

3.4.2.4 Synergické účinky mezi fytochemikáliemi

Bylo prokázáno, že v některých případech má celá rostlina nebo její extrakt či silice mnohokrát vyšší účinky, než mají jejich samostatně izolované látky. Mechanismy těchto synergií mohou být různé (Russo, 2011). „Multi target effects“ je mechanismus, kdy jednotlivé látky účastníci se synergie působí na různých cílových místech a navzájem se doplňují (André, 2016). Rostlinné látky mohou také usnadnit rozpustnost jiných látek nebo přímo podpořit jejich výsledný účinek. Významným mechanismem je také ovlivnění bakteriální rezistence (např. inhibicí systému QS). Ilustrační synergie pro látky *Cannabis sativa* spočívá ve vytváření nepříznivých vlivů na ostatní organismy vlivem jejich specifických složek (Russo, 2011). Terapeutické účinky THC jsou již dlouho známé, včetně jeho pozitivních účinků na svalové křeče. Avšak poslední výzkumy dokázaly, že rostlinný extrakt *Cannabis sativa* s ekvivalentním obsahem THC byl mnohem účinnější, než samotné THC, ačkoliv samotný extrakt neměl na svalové křeče výrazné účinky (Wagner a Ulrich-Merzenich, 2009). Dalším příkladem je použití β -myrcenu pro zlepšení permeability krve do mozku, přičemž umožňuje sobě i dalším látkám (např. THC) snadnější průnik přes přirozené bariéry (Smith, 2015). Synergie mezi terpeny a fytokanabinoidy je významným objevem, který může usnadnit léčbu akné, depresí, insomnie, slabomyslnosti a dalších onemocnění zavedením kombinací extraktů *Cannabis sativa* s CBD nebo jinými kanabinoidy (Russo, 2011). Účinky kanabinoidů mohou stimulovat také některé flavonoidy, které jsou schopné inhibovat hepatické enzymy (André, 2016).

Tento typ synergie využívá rostlina také sama pro sebe. Specifické kombinace terpenů vytvářejí lepkavou vrstvu na povrchu rostliny, která je schopná zachytit škůdce a kyselina odvozená od kanabinoidů účinkuje jako desinsekční látka (André, 2016).

4 Materiál a metodika

Antibakteriální aktivita byla stanovena jako MIC/BIC daných látek. MIC je hodnota, která vyjadřuje nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která je schopná inhibovat růst dané bakterie, BIC vyjadřuje nejnižší koncentraci, která je schopna inhibovat tvorbu biofilmu. Pro stanovení MIC/BIC byla použita modifikovaná mikrodiluční metoda za použití 96-jamkových mikrotitračních destiček. Jako modelový organismus byl zvolen *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Pro testování planktonických buněk bylo použito médium Mueller Hinton Broth (MHB), pro biofilmové buňky Tryptic soy broth (TSB) s přidáním 1% glukózy. Vyhodnocení MIC proběhlo u planktonních forem okometricky sledováním absence viditelného zákalu v jamkách, který představoval nárůst bakterií. BIC u biofilmových buněk byla stanovena a kvantifikována objektivně spektrofotometrickou metodou. Celý experiment probíhal ve sterilních podmínkách (použití flowboxu, desinfekce povrchů, použití rukavic) a se sterilním materiálem (médium a špičky sterilizované v autoklávu - 121°C 20min, atd.).

4.1 Příprava antimikrobiálních látek

4.1.1 Penicilin

Na analytických vahách bylo naváženo 100x větší množství penicilinu, než je potřebné pro přípravu nejvyšší testované koncentrace (kvůli následnému zředění do média). Počáteční koncentrace penicilinu pro testování planktonických buněk byla 16µg/ml, pro testování biofilmu 64µg/ml. Penicilin byl rozpuštěn v destilované H₂O a zředěn s médiem 10:990, přičemž byla zpětně dosažena požadovaná koncentrace.

4.1.2 Meridasan Profi

Koncentrace účinné látky v tomto desinfekčním prostředku byla 0,025g/100ml (viz obal). Dvojitým zředěním s vodou byla dosažena koncentrace cca 64µg/ml. MHB/TSB o dvojnásobné koncentraci bylo použito pro následné zředění s prostředkem 1:1 a výsledná počáteční koncentrace tedy byla 32µg/ml. Stejná koncentrace byla použita pro planktonní i biofilmové formy *S. aureus*.

4.1.3 Silice *Cannabis sativa*

Destilační metodou bylo získáno 0,5 ml čisté silice *Cannabis sativa* (essential oil; EO) variety Nurse Jackie z květenství rostliny. Počáteční testovaná koncentrace byla 1024 µg/ml

pro planktonní i biofilmové formy, přičemž objemové jednotky EO byly přepočítány na hmotnostní. Odměřené množství EO (o 100x vyšší koncentraci) bylo rozpuštěno v DMSO (dimethylsulfoxid) a následně zředěno 10:990 s MHB/TSB.

4.1.4 Chemická analýza složení silice

Chemické složení silice bylo zanalyzováno pomocí plynového chromatografu (GC) Agilent 7890A propojený s Agilent MSD5975C detektorem (oba přístroje patří pod Agilent, Santa Clara, FL, USA). GC byl vybaven nepolární kolonou HP-5MS (30 m x 250 μ m x 0,25 μ m) firmy Agilent (Santa Clara, FL, USA). Rostlinná silice byla zředěna 5:1000 n-hexanem.

Do vstříkovací trysky rozpálené na 250°C byl napipetován 1 μ l vzorku v dělicím poměru 12:1. Jako plyn bylo použito helium s rychlostí proudění 1 ml/min. Teplotní program GC byl nastaven zpočátku na 60°C po dobu 3 min, poté se zvyšovala teplota 3°C/min až do teploty 231°C, která zůstala konstantní 10 min. Celkový čas analýzy byl tedy 70 min. Ionizační energie byla nastavena na 70 eV a data byla zapisována ve “full scan mode”. Identifikace byla založena na srovnání různých molekulových hmotností a retenčním čase podle National Institute of Standards and Technology Library (NIST, USA) a podle odborné literatury.

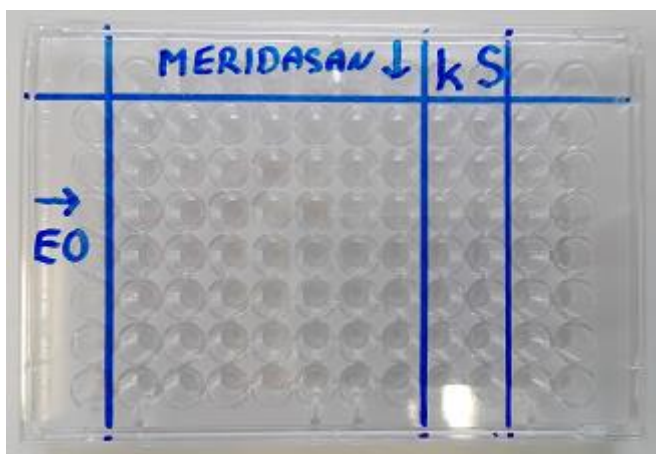
Obsah jednotlivých složek byl vyjádřen v relativních procentech vzhledem k naměřeným píkům na plynovém chromatografu Agilent 7890A s plamenným ionizačním detektorem (FID) vybaveným nepolární kolonou HP-5MS.

4.2 Mikrodiluční metoda

4.2.1 Ředící řada

Ve standardních 96-jamkových mikrotitračních destičkách byla připravena tzv. ředící řada. Do první jamky každého řádku se napipetovalo 200 μ l připravené antimikrobiální látky s médiem o počáteční testovací koncentraci a do ostatních jamek po 100 μ l média. 100 μ l z prvních jamek bylo přenášeno do druhých, třetích, atd. jamek, přičemž se vytvářela geometrická ředící řada (...; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 μ g/ml; ...). Poslední 2 jamky každé řady zůstaly nenaředěny, jedna jamka jako kontrola nárůstu bakterií, druhá jako kontrola sterility (nezaočkovaná).

Při testování kombinací 2 látek se vytvářela ředící řada oběma směry – vertikálně i horizontálně po mikrotitrační destičce viz obrázek 4.



Obrázek 4: Mikrotitrační destička pro testování kombinace MER a EO - ředící řada pro MER je vedena vertikálně, pro EO horizontálně. Hodnoty stejných koncentrací MER i EO klesají po diagonále. K = kontrola nárůstu, S = kontrola sterility.

4.2.2 Zaočkování

Inokulum bylo vytvořeno po 18-24 h inkubací při 37°C. Pro zaočkování mikrotitračních destiček bylo použito 10 ml MHB/TSB s přídatkem inokula +0,5 stupnice McFarlanda na přístroji McFarland Denzitometr DEN-1, který měří turbiditu (zákal) roztoků. Pro nárůst planktonních buněk byl použit jehlový inokulátor, pro nárůst biofilmu bylo do každé jamky (kromě poslední – sterilita) napipetováno 20 µl připraveného inokula. Po zaočkování se mikrotitrační destičky nechaly inkubovat 18-24 h při 37°C.

4.3 Vyhodnocení

Každý experiment byl proveden třikrát ve třech opakováních. Z trojice výsledků byla vždy započítána střední hodnota – medián, který určil výslednou MIC/BIC.

Pro stanovení vztahu mezi dvěma antimikrobiálními látkami při působení v kombinaci byl vypočítán FIC index (fractional inhibition concentration index; FICI), jehož hodnota vyjadřuje vliv jedné látky na druhou. FICI byl spočítán jako součet FIC pro jednotlivé látky (A,B). FIC pro A,B se spočítá jako podíl MIC při samostatném použití a MIC v kombinaci.

FICI je tedy dán vztahem:
$$FICI = \frac{MIC(A)_k}{MIC(A)_s} + \frac{MIC(B)_k}{MIC(B)_a}$$
, kde MIC(A,B)_k vyjadřuje MIC

vybraných látek v kombinaci a MIC(A,B)s MIC těchto látek při samostatném použití. Podle FICI můžeme určit vztah mezi použitými antimikrobiálními látkami podle tabulky 1.

Tabulka 1: Vliv FICI na vztahy antimikrobiálních látek v kombinaci

FICI:	<0,5	>0,5 - <1	>1 - <2	>4
Vyhodnocení:	synergie	aditivní efekt	indeferece	antagonismus

Tabulka 1: Hodnoty FICI přiřazené k příslušnému vztahu dvou antimikrobiálních látek při vzájemném působení. Zpracováno podle EUCAST (2000).

Synergie je jev, kdy kombinace dvou antimikrobiálních látek má vyšší účinky než součet účinků obou látek zvlášť. Aditivní efekt nastává, pokud v kombinaci jedna látka lehce zvyšuje účinky druhé látky, ale součet efektu při samostatném použití nepřevyšují. Pokud testované látky na sebe nemají žádný vliv a vzájemně se nepodporují ani neomezují, nastává indiference. Antagonismus je jev, kdy dvě antimikrobiální látky použité v kombinaci mají na sebe negativní vliv, popř. jedna látka silně potlačuje účinky druhé látky.

4.3.1 MIC u planktonických buněk

Vyhodnocení u planktonických buněk proběhlo okometricky sledováním zákalu v jamkách mikrotitrační destičky. MIC byla stanovena jako nejnižší koncentrace, při které nebyl spatřen viditelný zákal na dně mikrotitrační destičky.

4.3.2 BIC u biofilmových buněk

Nárůst biofilmu byl stanoven obarvením krystalovou violetí a následným změřením optické hustoty spektrofotometrem při 540 nm. Po inkubaci byl obsah destiček vyklepnut do klávacího pytle a destičky byly 3x propláchnuty fyziologickým roztokem (0,9% NaCl). Následovalo 5 min vyschnutí a poté bylo do jamek napipetováno po 100 µl metanolu, který se nechal působit 20 min. Opět proběhlo 5min vyschnutí a napipetovalo se po 100 µl krystalové violeti (0,5%) do každé jamky. Po 20 min se barvivo jemně vypláchno sprchou vody z destiček a do každé jamky se přidalo 100 µl etanolu. V jamkách, kde narostl biofilm se barvivo nevyplavilo sprchou a po přidání etanolu vyvstalo napovrch. Optická hustota byla změřena pomocí spektrofotometru Multiscan ascent (microplate reader), s programem Ascent software for Multiscan a vyhodnocena v programu Microsoft Excel.

5 Výsledky

Pomocí plynové chromatografie bylo zjištěno chemické složení silice *Cannabis sativa* a byl analyzován její antibakteriální účinek proti *S. aureus*. Výsledky ukázaly, že aktivita silice proti tvorbě biofilmu je mnohonásobně vyšší než její účinek proti planktonickým buňkám. Mimo to byl zjištěn silný synergický antistafylokokový efekt silice v kombinaci s desinfekčním prostředkem Meridasan Profi, a to jak proti planktonickým buňkám, tak proti tvorbě biofilmu.

5.1 Chemické složení silice *Cannabis sativa*

Pomocí plynové chromatografie bylo zjištěno konkrétní zastoupení chemických látek, které je uvedené v tabulce 2. Nejvyšší procentuální podíl představoval myrcen (19,28%), poté alfa pinen (15,62%) a třetí nejvýznamější složkou byl farnesen (8,75%). Kromě hodnot, uvedených v tabulce 2, obsahovala silice další složky v minoritním zastoupení.

Tabulka 2: Zastoupení jednotlivých látek v silici *Cannabis sativa* získáno pomocí plynové chromatografie.

látka	% zastoupení ve směsi	látka	% zastoupení ve směsi
alfa pinen	15,62	trans caryophyllen	6,62
camphene	0,34	alfa humulen	4,28
myrcen	19,28	guaiol	0,08
carene	0,51	eudesmol	0,09
limonen	0,19	farnesen	8,75
hexylhexanoate	0,03		

Tabulka 2: *Cannabis sativa* variety Nurse Jackie byla získána z květenství rostliny destilační metodou. Procentuální zastoupení bylo stanoveno jako relativní zastoupení v poměru k celkové ploše všech piků. Identifikace byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie.

5.2 Účinky při samostatném použití

EO měla silnější antimikrobiální aktivitu proti biofilmovým buňkám, než proti buňkám planktonickým. Opačný účinek vykazovaly MER a PEN, u kterých byla MIC proti nárůstu biofilmu vyšší než u planktonických buněk.

5.2.1 Efekt na planktonické buňky

Nejsilnější antibakteriální aktivitu proti *S. aureus* vykazoval desinfekční přípravek Meridasan Profi s MIC 1 µg/ml. MIC penicilinu byla 2 µg/ml. Rostlinná silice *Cannabis sativa* nevykazovala znatelnou antibakteriální aktivitu ani v nejvyšší testované koncentraci 1024 µg/ml. Antibakteriální aktivitu vybraných látek zobrazuje tabulka 3.

Tabulka 3: MIC vybraných látek proti *S. aureus* (ATCC 29213) v planktonické formě

měření	bakterie	MIC [µg/ml]		
		EO	PEN	MER
1.	<i>S. aureus</i>	>1024	2	1
2.	<i>S. aureus</i>	>1024	2	1
3.	<i>S. aureus</i>	>1024	2	1
medián		>1024	2	1

Tabulka 3: Mikrodiluční metodou byly stanoveny MIC vybraných látek: EO, PEN a MER proti standardnímu kmenu *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 v planktonické formě. Hodnoty jednotlivých měření vyjadřují mediány tří opakování v každém měření. Hodnota >1024 µg/ml vyjadřuje, že EO nebylo aktivní ani v nejvyšší testované koncentraci.

5.2.2 Efekt na buňky v biofilmu

Nejsilnější antimikrobiální aktivitu proti nárůstu biofilmu *S. aureus* vykazoval opět Meridasan Profi, BIC 2 µg/ml. Penicilin měl o jeden řád vyšší BIC oproti Meridasanu v hodnotě 4 µg/ml. Silice *Cannabis sativa* inhibovala nárůst biofilmových buněk při koncentraci 256 µg/ml, což je oproti planktonickým buňkám výrazné zlepšení. Antimikrobiální aktivitu testovaných látek proti nárůstu biofilmu znázorňuje tabulka 4.

Tabulka 4: BIC vybraných látek proti *S. aureus* (ATCC 29213) ve formě biofilmu.

měření	bakterie	BIC [µg/ml]		
		EO	PEN	MER
1.	<i>S. aureus</i>	256	4	2
2.	<i>S. aureus</i>	512	4	4
3.	<i>S. aureus</i>	128	8	2
medián		256	4	2

Tabulka 4: Mikrodiluční metodou byly stanoveny BIC vybraných látek: EO, PEN a MER proti standardnímu kmenu *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve formě biofilmu. Hodnoty jednotlivých měření vyjadřují mediány tří opakování v každém měření.

5.3 Účinky v kombinaci

Synergický účinek byl zpozorován u kombinace EO a MER jak u planktonických forem *S. aureus*, tak proti biofilmu. Kombinace EO a PEN byla u planktonických forem indiferentní a proti tvorbě biofilmu vykazovala aditivní efekt.

5.3.1 Efekt na planktonické buňky

Kombinace silice *Cannabis sativa* a Meridasan Profi vykazovala synergickou interakci proti planktonickým formám bakterií s FICI <0,258. Indiferentní interakci vykazovala kombinace EO s penicilinem, FICI <1,125. Znaménko „menší“ poukazuje na EO při samostatném použití (viz kapitola 5.2.1), kdy jeho MIC byla nad hranicí nejvyšší testované koncentrace (>1024 µg/ml), tudíž hodnoty FICI mohou být nižší, než hodnoty uvedené v tabulce níže. Antibakteriální aktivitu vybraných látek v kombinaci znázorňuje tabulka 5.

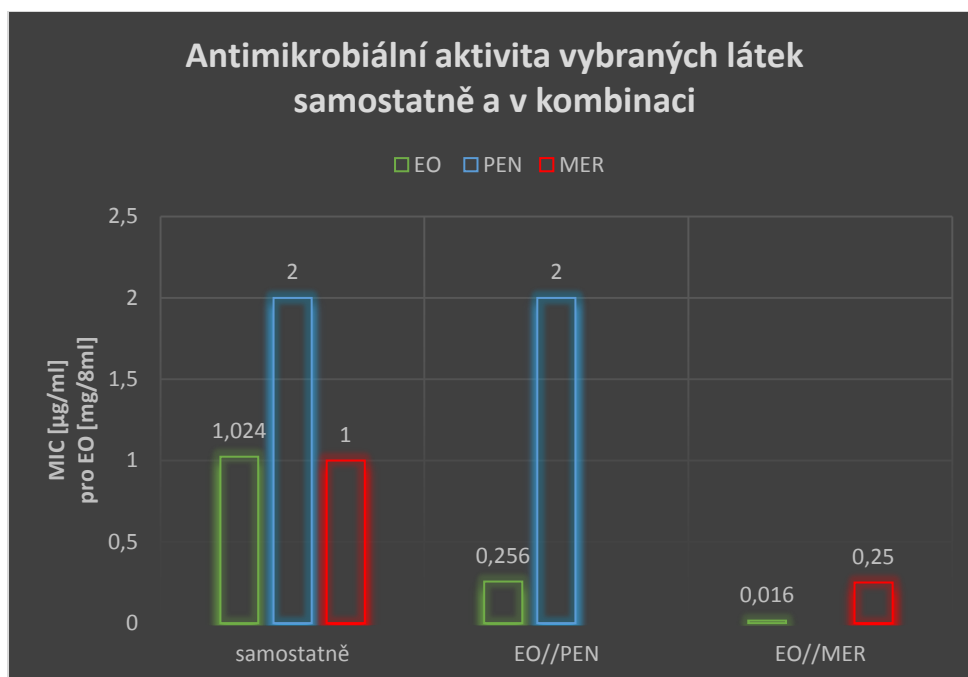
Tabulka 5: MIC a FICI vybraných látek v kombinaci proti *S. aureus* (ATCC 29213) v planktonické formě a jejich vyhodnocení

měření	Bakterie	MIC [µg/ml]		FICI	
		EO//MER	EO//PEN	EO//MER	EO//PEN
1.	<i>S. aureus</i>	16//0,25	256//2	<0,258	<1,125
2.	<i>S. aureus</i>	16//0,25	256//2	<0,258	<1,125
3.	<i>S. aureus</i>	16//0,25	256//2	<0,258	<1,125
medián		16//0,25	256//2	<0,258	<1,125
vyhodnocení				SYNERGIE	INDIFERENCE

Tabulka 5: Mikrodiluční metodou byly stanoveny MIC kombinací vybraných látek: PEN // EO, MER // EO proti standardnímu kmenu *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 v planktonické formě. Hodnoty jednotlivých měření vyjadřují mediány tří opakování v každém měření.

Vliv vybraných antimikrobiálních látek na planktonické buňky *S. aureus* a jejich kombinace znázorňuje graf 1.

Graf 1: Antimikrobiální aktivita vybraných látek proti *S. aureus* (ATCC 29213) v planktonické formě samostatně a v kombinaci



Graf 1: Mikrodiluční metodou byly stanoveny MIC vybraných látek: PEN, MER a EO proti standardnímu kmenu *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 v planktonické formě. Vybrané látky byly otestovány nejprve samostatně a poté v kombinacích: EO//PEN a EO//MER. Pro EO byly použity jednotky [mg/ml], pro MER a PEN [µg/ml].

5.3.2 Efekt na buňky v biofilmu

Meridasan Profí v kombinaci s rostlinnou silicí vykazoval synergický efekt. Hodnota FICI pro tuto kombinaci byla 0,25. Aditivní efekt byl zaznamenán u kombinace EO s penicilinem, FICI 0,5156.

Antimikrobiální aktivitu testovaných látek v kombinaci proti nárůstu biofilmu znázorňuje tabulka 6.

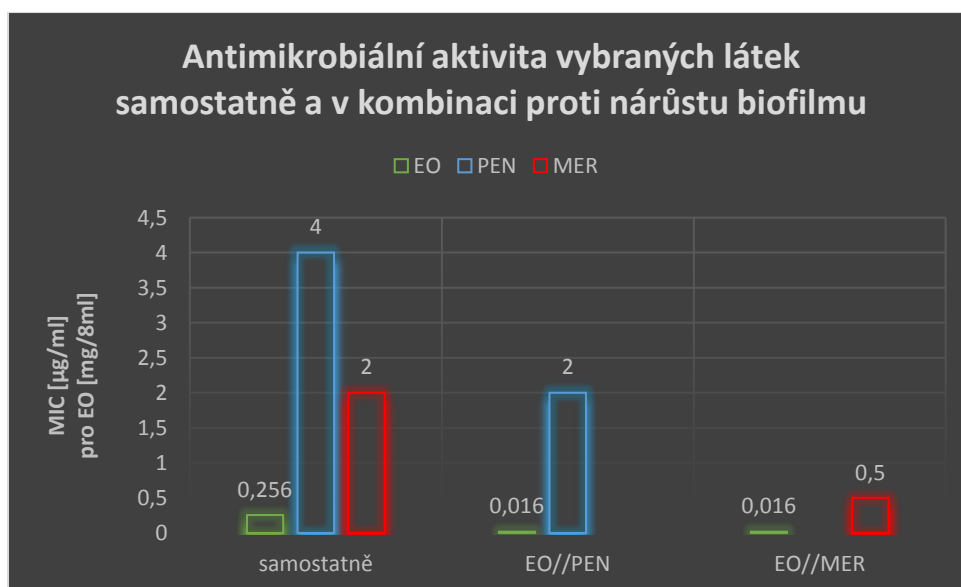
Tabulka 6: MIC a FICI vybraných látek v kombinaci proti *S. aureus* (ATCC 29213) ve formě biofilmu a jejich vyhodnocení

měření	bakterie	BIC [$\mu\text{g/ml}$]		FICI	
		EO//MER	EO//PEN	EO//MER	EO//PEN
1.	<i>S. aureus</i>	8//0,25	8//2	0,1563	0,531
2.	<i>S. aureus</i>	64//0,5	16//2	0,25	0,5156
3.	<i>S. aureus</i>	16//0,5	64//2	0,3125	0,5
medián		16//0,5	16//2	0,25	0,5156
vyhodnocení				SYNERGIE	ADITIVNÍ

Tabulka 6: Mikrodiluční metodou byly stanoveny BIC kombinací vybraných látek: PEN // EO, MER // EO proti standardnímu kmenu *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve formě biofilmu. Hodnoty jednotlivých měření vyjadují mediány tří opakování v každém měření.

Vliv vybraných antimikrobiálních látek na nárůst biofilmu *S. aureus* a jejich kombinace znázorňuje graf 2.

Graf 2: Antimikrobiální aktivita vybraných látek proti nárůstu biofilmu *S. aureus* (ATCC 29213) samostatně a v kombinaci



Graf 2: Mikrodiluční metodou byly stanoveny minimální koncentrace inhibující tvorbu biofilmu (BIC) vybraných látek: PEN, MER a EO proti standardnímu kmenu *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Vybrané látky byly otestovány nejprve samostatně a poté v kombinacích: EO//PEN a EO//MER. Pro EO byly použity jednotky [mg/ml] a pro PEN a MER [$\mu\text{g/ml}$].

6 Diskuze

Účelem této bakalářské práce bylo stanovení antimikrobiální aktivity tří antimikrobiálních látek, desinfekčního prostředku Meridasan Profi, antibiotika pnicilin a rostlinné silice *Cannabis sativa* a určení antimikrobiální aktivity jejich kombinací.

Zajímavým zjištěním bylo, že EO vykazovalo silnější antimikrobiální aktivitu proti tvorbě biofilmu, než proti planktonickým buňkám, ačkoliv MER i PEN měly silnější účinky právě na planktonické buňky. Může to být způsobeno chemickým složením EO nebo přímo jednou, či několika jeho konkrétními látkami. Některé rostlinné látky dokonce fungují jako inhibitory systému QS (viz kap. 3.2.1.3, 3.2.1.4), např. 2(5H)-furanon u řasy *Delisea Pulchreta* nebo taxifolin u *Combretum albiflorum* (Banerjee a Ray, 2016), ale např i u extraktů z *Medigo sativa*, *Pisum sativum*, *Allium cepa*, *Allium sativum*, *Lycopersicum esculentu*, *Medicago truncatula* a dalších byl prokázán mechanismus inhibice QS (Lade *et al.*, 2014). Je tedy možné, že některá z látek, obsažená v silici *Cannabis sativa* funguje také jako inhibitor mezibuněčné komunikace v biofilmu. Například studie Ahmad *et. al.* (2014) zaznamenala anti-QS aktivitu u látek Camphene a (-)izomer limonenu, které se vyskytují také v námi testované silici, je tedy možné, že právě tyto látky jsou zodpovědné za inhibici tvorby QS a tedy i tvorby biofilmu. Oproti tomu ale také uvádějí, že alfa pinen a (+)izomer limonenu mají naopak stimulační efekt pro QS, takže výsledný účinek silice mohou naopak zhoršit. Silný antibiofilmový účinek flavonoidů, které se také v menší míře vyskytují v EO zaznamenali Slobodníková *et al.* (2016), a jejich mechanismus vysvětlují inhibicí QS, ale i jinými mechanismy (viz. kap. 3.3.3.2). Antimikrobiální aktivitu silice *Cannabis sativa* proti planktonickým buňkám *S. aureus* prokázali také Novák a kol. (2001) a antimikrobiální aktivitu rostlinného extraktu *Cannabis sativa* prokázali Kaur *et. al.* (2015) za použití agarové difuzní metody. Avšak vzhledem k použití jiné metody nelze výsledky přímo porovnávat s naší prací. Esra a kol., (2012) při testování konopných extraktů MIC stanovili (25-50 mmg/ml), zde je ovšem porovnání obtížné vzhledem k použití polárního rozpouštědla metanolu, z čehož lze předpokládat velmi rozdílné chemické složení.

Studie Zhou *et. al.*, (2011) udává antimikrobiální aktivitu jedné ze dvou účinných látek Meridasanu Profi – PHMG, MIC 1,8 µg/ml. Výsledky naší práce udávají hodnotu antimikrobiální aktivity pro Meridasan Profi 1µg/ml. Příčinou rozdílu je s největší pravděpodobností přidavek druhé účinné látky do přípravku – alkyl(C12-C16) benzyl(dimethyl)amonium chlorid. Na obalu přípravku Meridasan Profi (500ml) je uvedeno,

že se jedná o „Bezchlórový desinfekční prostředek“, což je značně zavádějící informace vzhledem k obsahu účinné látky na bázi chlóru.

MIC penicilinu proti planktonické formě *S. aureus* byla dle našich výsledků 2 µg/ml a ve srovnání s tabulkami CLSI (2012) tedy odpovídá standardnímu rozmezí 0,25 – 2 µg/ml. Pro kontrolu můžeme tedy říci, že metoda byla provedena správně.

Synergie mezi EO a MER jak proti planktonickým, tak biofilmovým formám *S. aureus* je zajímavým výsledkem této práce. Stejně jako některé složky EO mohou inhibovat QS, mohou také způsobovat synergii s jinými látkami. Hermann a Wink (2011) zaznamenali synergickou cytotoxickou aktivitu alfa pinenu s aescinem nebo glycyrrhizovou kyselinou, je tedy možné, že právě alfa pinen způsobuje synergii u EO. Russo (2011) uvádí, že synergie nastávají také mezi jednotlivými složkami silice *Cannabis sativa*. Jedná se zejména o synergie fytoKANABINOIDŮ s terpenoidy, například THC s látkami limonen, pinen, caryophyllen nebo kanabidiol s limonenem.

Silice *Cannabis sativa* se tímto výzkumem stává potenciálně využitelná pro zvýšení účinků desinfekčního prostředku Meridasan Profi. Pokud by se z ekonomického hlediska vyplatilo kombinovat tyto dvě látky v praxi, mohlo by to vést k zavedení nového desinfekčního prostředku Meridasan s přídatkem konopné silice. Pokud EO vykazuje synergický efekt s MER, je pravděpodobné, že bude vhodným prostředkem pro kombinaci také s jinými antimikrobiálními látkami. Například pokud by se synergie prokázaly u některých antibiotik, mohlo by to vést k zavedení jejich kombinací s EO (popř. jeho izolovaných složek) a tím i dalšímu pokroku ve farmaceutickém průmyslu. Vzhledem k narůstající resistenci bakterií k běžně používaným antimikrobiálními látkám je výhodné použití rostlinné silice v samostatném použití i v kombinaci s jinými látkami, protože resistenci k nim bakterie ještě nemají tolik vyvinutou.

Předmětem dalších výzkumů je také stanovení antimikrobiální aktivity EO samotné a v různých kombinacích s jinými látkami proti dalším bakteriím, zejména gram-negativním jako jsou *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas spp.* a další.

7 Závěr

K naplnění cílů této bakalářské práce byla nastíněna problematika bakterií, byla provedena podrobnější analýza bakteriálních biofilmů a jejich schopnost resistance k antimikrobiálním látkám a jako hlavním cílem byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace vybraných látek, penicilin, Meridasan Profi a silice *Cannabis sativa* a jejich kombinací. Silice *Cannabis sativa* má jako přírodní antimikrobiální látka velký potenciál v praktickém využití, zejména proti tvorbě bakteriálních biofilmů a v kombinaci s jinými antimikrobiálními látkami. Bakterie získávají postupem času resistenci na dnes již hojně užívaná antibiotika a musí se vynalézat další formy a kombinace antimikrobiálních látek, které budou stále účinné a jedním z těchto zdrojů jsou právě přírodní rostlinné silice. Synergický efekt, který byl spozorován při kombinaci silice *Cannabis sativa* s Meridasanem Profi je významným poznatkem nejen v podmínkách *in vitro*, ale také pro potenciální praktické využití ve výrobě desinfekčních prostředků.

8 Seznam literatury

Tištěné zdroje:

BORSKÝ, J., PACOVSKÝ, J. *Desinfekční technika v zemědělství, výkupu, lesnictví a potravinářském průmyslu*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1956. Mechanizace.

BENEŠ, K. *Úvod do biologie buňky*. Pedagogická fakulta JU Č. Budějovice, 1992. ISBN 80-7040-057-9.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute: 2012.

EUCAST, European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Terminology relating to methods for determination of susceptibility bacteria to antimicrobial agents*. Clin Microbiol Infect 2000; 6: 503–8.

LEITTGEB, S., VOŠTA, J. *Mikrobiologie*. Agronomická fakulta Vysoká škola zemědělská Praha, 1988.

NĚMEC, M., HORÁKOVÁ, D. *Základy mikrobiologie pro učitelské studium*. 2. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1993. ISBN 80-210-0817-2.

RAŠKA, K. *Desinfekce, desinsekce, deratisace*. 2. přeprac. vyd. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1956.

ROSYPAL, S. *Bakteriologie a virologie*. Praha: Scientia, 1994. Gymnázium. ISBN 80-85827-16-6.

RULÍK, M., HOLÁ, V., RŮŽIČKA, F., VOTAVA, M. *Mikrobiální biofilmy*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. ISBN 978-80-244-2747-8

SLÁDKOVÁ, P., HLAVÁČOVÁ, J. *Speciální mikrobiologie*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2011. ISBN 978-80-7375-558-4

ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008. ISBN 978-80-200-1703-1.

Internetové zdroje:

AHMAD, A., VILJOEN, A.M., CHENIA, H.Y. *The impact of plant volatiles on bacterial quorum sensing*. [online]. 2014 [cit. 2016-24-03]. ISSN 0266-8254 dostupné z: <https://eds-b-ebSCOhost-com.infozdroje.czu.cz/eds/pdfviewer/pdfviewer?sid=4adff9c2-ec79-4055-ab58-0e658d1a841f%40sessionmgr120&vid=1&hid=103>

ANDRE, CH.M., HAUSMAN, J.F., GUERRIERO, G. *Cannabis sativa: The Plant of Thousand and Ona Molekules*. [online]. 2016 [cit. 2016-26-03]. dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.00019/full>

BANERJEE, G., RAY, A.K. *The talking language in some major Gram-negative bacteria*. [online]. 2016 [cit. 2016-08-12]. dostupné z: <http://link.springer.com.infozdroje.czu.cz/article/10.1007%2Fs00203-016-1220-x>

BRIDIER, A., BRIANDET, R., THOMAS, V., DUBOIS-BRISSENET F. *Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review*. [online]. 2011 [cit. 2017-05-01]. dostupné z: <http://www-tandfonline-com.infozdroje.czu.cz/doi/full/10.1080/08927014.2011.626899?scroll=top&needAccess=true>

BUCKINGHAM-MAYER, K., GOERES, D.M., HAMILTON, M.A. *Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests*. [online]. 2007 [cit. 2017-10-02]. dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.infozdroje.czu.cz/science/article/pii/S0167701207001418?np=y>

CERI, H., OLSON, M.E., STREMIK, C., READ, R.R., MORCK, D., BURET, A. *The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic susceptibilities of Bacterial Biofilms*. [online]. 1999 [cit. 2017-10-02]. dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/37/6/1771.full>

CRUSZ, S.A., POPAT, R., RYBTKE, M.T., CÁMARA, M., GIVSKOV, M., NIELSEN, T.T. *Bursting the bubble on bacterial biofilms: a flow cell methodology*. [online]. 2012 [cit. 2017-10-02]. dostupné z: <http://www.tandfonline.com.infozdroje.czu.cz/doi/full/10.1080/08927014.2012.716044?scroll=top&needAccess=true>

DAVEY, M.E., O'TOOLE, G.A. *Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics*. [online]. 2000 [cit. 2016-1-12]. dostupné z: <http://mibr.asm.org/content/64/4/847.full>

DONLAN, R.M., COSTERTON, J.W. *Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms*. [online]. 2002 [cit. 2016-24-11]. dostupné z: <http://cmr.asm.org/content/15/2/167.full#ref-50>

ESRA M. M. A., ALMAGBOUL, A.Z., KHOGALIL, S.M.E., GERGEIR U.M.A. *Antimicrobial Activity of Cannabis sativa L*. [online]. 2012 [cit. 2017-16-03]. Dostupné z: http://file.scirp.org/pdf/CM20120100009_13575513.pdf

FAJFROVÁ, Z. *Desinfekce MERIDASAN Profi a její využití v zemědělství*. [online]. 2015 [cit. 2016-11-17]. dostupné z: <http://www.agrojournal.cz/clanky/dezinfekce-meridasan-profi-a-jeji-vyuziti-v-zemedelstvi-102>

FIŠAR, Z. *Fytokanabinoidy*. Chem. Listy 100, 233-242. [online]. 2005 [cit. 2017-26-03]. dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_04_233-242.pdf

FLEMMING, H.C., WINGENDER, J. *The biofilm matrix*. [online]. 2010 [cit. 2016-1-12]. dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com.infozdroje.czu.cz/eds/pdfviewer/pdfviewer?sid=c25bbad7-d497-4b85-ac5a-4e2e76993691%40sessionmgr101&vid=1&hid=121>

GUPTA, Prabhat K. *Cell and molecular biology*. [online]. 2009 [cit. 2016-11-02]. ISBN 81-7133-817-8. Dostupné z:

<https://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/reader.action?docID=588312>

HENDRY, E.R., WORTHINGTON, T., CONWAY, B.R., LAMBERT P.A. *Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineol alone and in combination with chlorhexidin digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures*. [online]. 2009 [cit. 2016-28-11]. dostupné z:

<http://jac.oxfordjournals.org/content/64/6/1219.full>

HERRMANN, F., WINK, M. *Synergistic interactions of saponins and monoterpenes in HeLa cells, Cos7 cells and in erythrocytes*. [online]. 2011 [cit. 2016-25-03]. dostupné z:

<http://www.sciencedirect.com.infozdroje.czu.cz/science/article/pii/S0944711311003564>

CHMIELEWSKI, R.A.N., FRANK J.F. *Biofilm formation and control in food processing facilities*. [online]. 2003 [cit. 2016-11-21]. dostupné z:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x/epdf>

CHRISTENSEN, G.D., SIMPSON, W.A., YOUNGER, J.J., BADDOUR, L.M., BARRETT, F.F., MELTON, D.M., BEACHEY, E.H. *Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices*. [online]. 1985 [cit. 2017-10-02]. dostupné z: [https://www-ncbi.nlm.nih.gov.infozdroje.czu.cz/pmc/articles/PMC271866/pdf/jcm00113-0126.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov.infozdroje.czu.cz/pmc/articles/PMC271866/pdf/jcm00113-0126.pdf)

KHAUR, S., SHARMA, CH., CHAUDHRY, S., AMAN, R. *Antimicrobial Potential of Three Common Weeds of Kurukshetra: An in vitro Study*. [online]. 2015 [cit. 2017-16-03]. Dostupné z: <http://www.scialert.net/qredirect.php?doi=jm.2015.280.287&linkid=pdf>

LADE, H., PAUL, D., KWEON, J.H. *Quorum Quenching Mediated Approaches for Control of Membrane Biofouling*. [online]. 2014 [cit. 2017-16-03]. Dostupné z: [https://www-ncbi.nlm.nih.gov.infozdroje.czu.cz/pmc/articles/PMC4046882/?report=classic](https://www.ncbi.nlm.nih.gov.infozdroje.czu.cz/pmc/articles/PMC4046882/?report=classic)

MASAAKI, M., SHINJI, K., MITSURU, H, KAZUFUMI, T., STEVE, B., ROBERTO, K., SHIGENORI, K. *Biofilm formation by a Bacillus subtilis strain that produces gamma-polyglutamate*. [online]. 2006 [cit. 2016-27-11]. dostupné z: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/152/9/2801.pdf?expires=1480280086&id=id&accname=guest&checksum=182714DFFEB1BB32D969ACEF3C029A26>

MCDONNELL, G. E. *Antiseptics, disinfection and sterilization; types, action and resistance*. [online]. 2007 [cit. 2017-19-02]. ISBN 978155813925 Dostupné z: <https://ebookcentral-proquest-com.infozdroje.czu.cz/lib/czup/detail.action?docID=605177#>

MERRITT, J.H., KADOURI, D.E., O'TOOLE, G.A. *Growing and analyzing Static biofilms*. [online]. 2005 [cit. 2017-10-02]. dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.infozdroje.czu.cz/doi/10.1002/9780471729259.mc01b01s22/full>

MOHLE R.B., LANGERMANN, T., HAESNER, M., AUGUSTIN, W., SCHOLL, S., NEU, T.R., HEMPEL, D.C., HORN, H. *Structure and Shear Strength of Microbial Biofilms as Determined With Confocal Laser Scanning Microscopy and Fluid Dynamic Gauging Using a Novel Rotating Disc Biofilm Reactor*. [online]. 2007 [cit. 2017-10-02]. dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.infozdroje.czu.cz/doi/10.1002/bit.21448/epdf>

NIKOLAEV, Y.A., PLAKUNOV, V.K. *Biofilm – „City of Microbes“ or an Analogue of Multicellular Organisms?* [online]. 2007 [cit. 2017-05-01]. dostupné z: <http://link.springer.com.infozdroje.czu.cz/article/10.1134%2FS0026261707020014>

NOVAK, J., ZITTERL-EGLESEER, K., DEANS, S.G., FRANZ, CH.M. *Essential oils of different cultivars of Cannabis sativa L. And their antimicrobial activity*. [online]. 2001 [cit. 2017-10-03]. dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.infozdroje.czu.cz/doi/10.1002/ffj.993/epdf>

OTOVÁ, B., MIHALOVÁ, R. *Základy biologie a genetiky člověka* [online]. 2012 [cit. 2016-11-02]. ISBN 978-80-246-2615-4 dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=JhYvBQAAQBAJ&pg=PA77&lpg=PA77&dq=%22bakterie+mohou+m%C3%ADt+je%C5%A1t%C4%9B%22&source=bl&ots=7nPpnwszQ4&sig=D8>

Vak0D06_cMiFVnQzmZoEEvzgs&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwi9y_yd0lrQAUhUH7BQKHZtvADAQ6AEIHTAA#v=onepage&q&f=false

PETERSON, N. D., ROGERS, M. C. *E coli infections: causes, treatment and prevention*. [online]. 2011 [cit. 2016-24-11]. dostupné z: <https://ebookcentral-proquest-com.infozdroje.czu.cz/lib/czup/reader.action?docID=3019568>

ROHILLA, A. *Handbook of bacteriology*. [online]. 2010 [cit. 2016-27-11]. ISBN 978-93-80179-47-6 dostupné z: <https://ebookcentral-proquest-com.infozdroje.czu.cz/lib/czup/reader.action?docID=583934>

RUSSO, E.B. *Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects*. [online]. 2011 [cit. 2017-25-03]. dostupné z: <https://eds-b-ebshost-com.infozdroje.czu.cz/eds/pdfviewer/pdfviewer?sid=d51dde7f-6b8b-4dfc-82a6-cbb700925c74%40sessionmgr103&vid=1&hid=111>

SANDASI, M., LEONARD, C.M. *The effect of five common essential oil components on Listeria monocytogenes biofilms*. [online]. 2008 [cit. 2016-21-11]. dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713507002551>

SLOBODNÍKOVÁ L., FIALOVÁ, S., RENDEKOVÁ, K., KOVÁČ, J., MUČAJI, P. *Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols*. [online]. 2016 [cit. 2017-26-03]. dostupné z: <https://eds-b-ebshost-com.infozdroje.czu.cz/eds/pdfviewer/pdfviewer?sid=f7ef7e2e-ab8c-473e-9114-8317cd385875%40sessionmgr120&vid=1&hid=111>

SMITH, N. *Transdermal cannabinoid patch*. [online]. 2015 [cit. 2017-29-03]. dostupné z: <https://www.google.com/patents/US20160022627>

STAUDT, C., HORN, H., HEMPEL, D.C., NEU, T.R. *Volumetric Measurements of Bacterial Cells and Extracellular Polymeric Substance Glycoconjugates in Biofilms*. [online]. 2004 [cit. 2016-23-11]. dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.infozdroje.czu.cz/doi/10.1002/bit.20241/epdf>

STEINKA, I., KUKULOWICZ, A. *Effect of selected plants on the survival of Staphylococcus aureus.* [online]. 2011 [cit. 2017-03-03]. Dostupné z: <http://www.formatex.info/microbiology3/book/1186-1194.pdf>

STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., HOLA, V., BONAVENTURA, G., DJUKIC, S., CIRKOVIC I., RUZICKA, F. *Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci.* [online]. 2007 [cit. 2017-11-02]. dostupné z: http://onlinelibrary.wiley.com/infodroje.czu.cz/doi/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x/epdf

TIWARI, B. K., BRUNTON, N., BRENNAN, S.CH. *Handbook of plant food phytochemicals: sources, stability and extraction.* [online]. 2012 [cit. 2017-08-03]. ISBN 9781118464687 Dostupné z: <https://ebookcentral-proquest-com.infozdroje.czu.cz/lib/czup/detail.action?docID=1120629>

WHITEHEAD, K.A, VERRAN, J. *Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry.* [online]. 2015 [cit. 2016-07-12]. dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/infodroje.czu.cz/science/article/pii/S2214799315000442>

WAGNER, H., ULRICH-MERZENICH, G. *Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals.* [online]. 2009 [cit. 2017-29-03]. dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/infodroje.czu.cz/science/article/pii/S0944711308002559>

WASSENAAR, T., M. *Bacteria The Begin, the Bad and the Beautiful.* [online]. 2012 [cit. 2017-03-04]. dostupné z: <https://ebookcentral-proquest-com.infozdroje.czu.cz/lib/czup/detail.action?docID=818466>

WEERASEKARA, N.A., CHOO, K.H., LEE, CH.H. *Biofouling control: Bacterial quorum quenching versus chlorination in membrane bioreactors.* [online]. 2016 [cit. 2017-29-03]. dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/infodroje.czu.cz/science/article/pii/S0043135416305632?np=y>

9 Přílohy

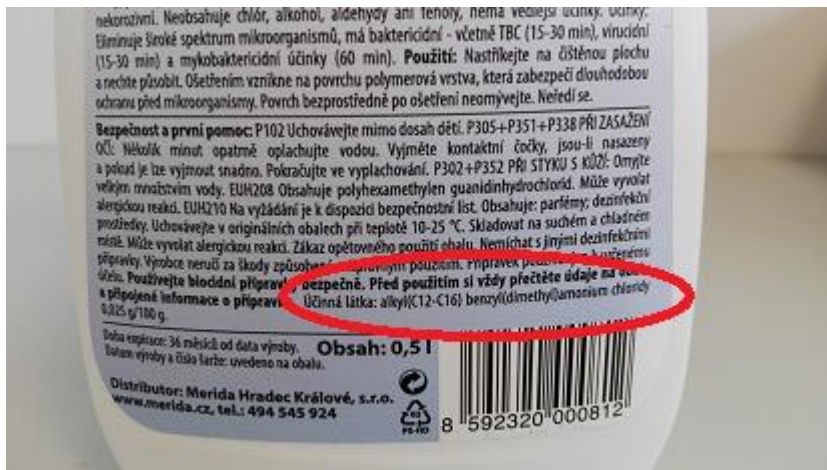
Seznam příloh

Příloha č. 1: fotodokumentace (20.3.2017): přípravek Meridasan Profi 500ml ...	63
Příloha č. 2: fotodokumentace (20.3.2017): Informace o přípravku Meridasan Profi 500ml.....	63
Příloha č. 3: fotodokumentace (20.3.2017): Zavádějící popisec „Bezchlórový desinfekční prostředek“ na obalu přípravku.....	64
Příloha č. 4: fotodokumentace (20.3.2017): Navažování antibiotik na analytických vahách.....	64
Příloha č. 5: fotodokumentace (20.3.2017): Média MHB a TSB připravená pro testování antimikrobiálních látek mikrodiluční metodou	65
Příloha č. 6: fotodokumentace (20.3.2017): pipetování do mikrotitrační destičky	65
Příloha č. 7: fotodokumentace (20.3.2017): Měření optické hustoty na densitometru, počáteční densita: 0,05 jednotek McFarlanda.	66
Příloha č. 8: fotodokumentace (20.3.2017): Měření optické hustoty na densitometru, densita po přidání inokula 0,55 jednotek McFarlanda	66
Příloha 9: fotodokumentace (20.3.2017): Zaočkování mikrotitrační destičky pomocí jehlového inokulátoru (pro testování planktonických forem bakterií).....	67
Příloha č. 10: fotodokumentace (20.3.2017): barvení narostlého biofilmu krystalovou violetí	67

Příloha č. 1: fotodokumentace (20.3.2017): přípravek Meridasan Profi 500ml



Příloha č. 2: fotodokumentace (20.3.2017): Informace o přípravku Meridasan Profi 500ml



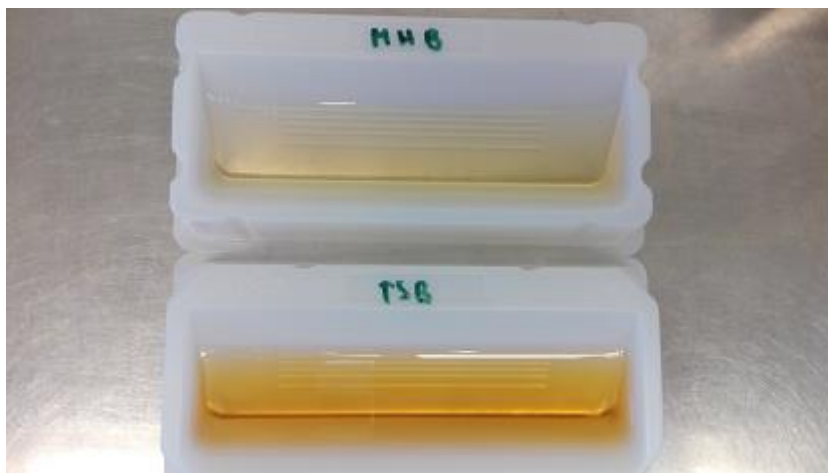
Příloha č. 3: fotodokumentace (20.3.2017): Zavádějící popisec „Bezchlórový dezinfekční prostředek“ na obalu přípravku



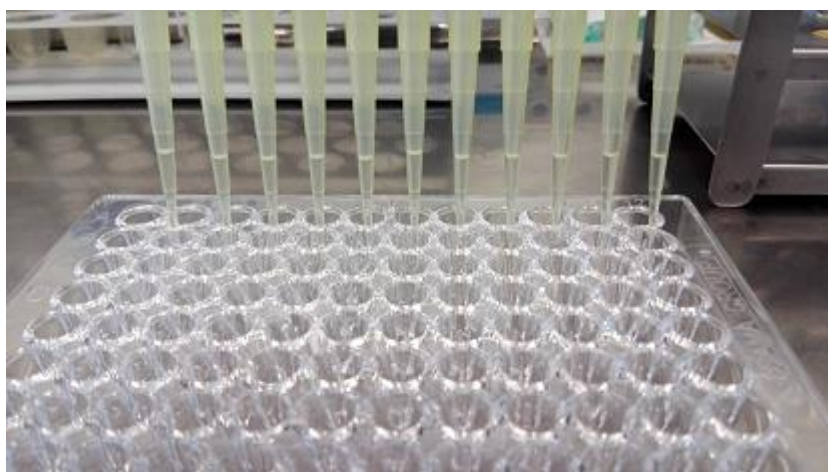
Příloha č. 4: fotodokumentace (20.3.2017): Navažování antibiotik na analytických vahách



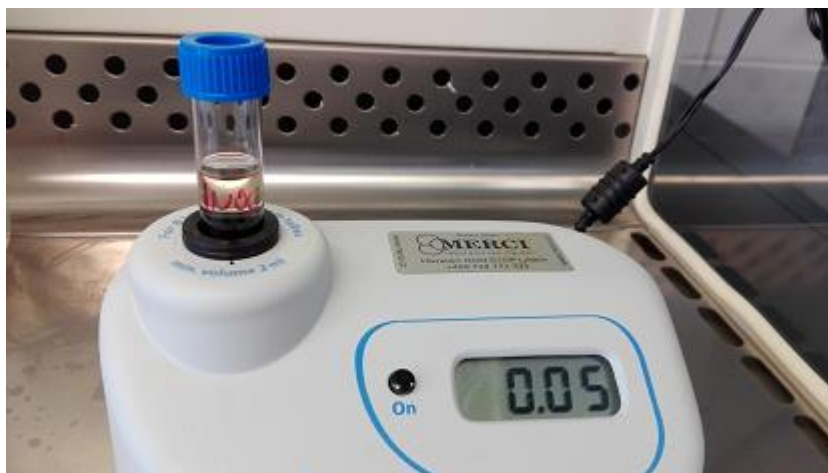
Příloha č. 5: fotodokumentace (20.3.2017): Média MHB a TSB připravená pro testování antimikrobiálních látek mikrodiluční metodou



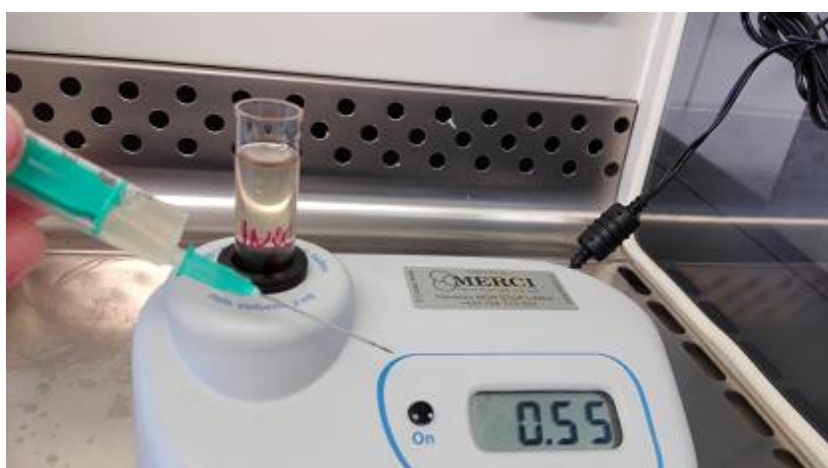
Příloha č. 6: fotodokumentace (20.3.2017): pipetování do mikrotitrační destičky



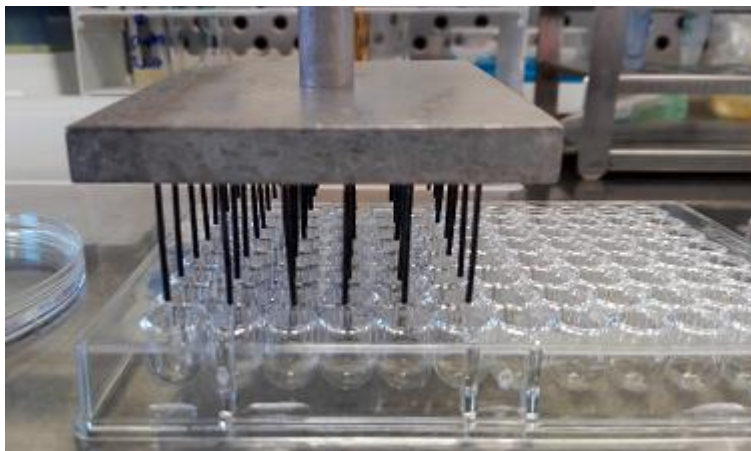
Příloha č. 7: fotodokumentace (20.3.2017): Měření optické hustoty na densitometru, počáteční densita: 0,05 jednotek McFarlanda.



Příloha č. 8: fotodokumentace (20.3.2017): Měření optické hustoty na densitometru, densita po přidání inokula 0,55 jednotek McFarlanda



Příloha 9: fotodokumentace (20.3.2017): Zaočkování mikrotitrační destičky pomocí jehlového inokulátoru (pro testování planktonických forem bakterií)



Příloha č. 10: fotodokumentace (20.3.2017): barvení narostlého biofilmu krystalovou violetí

