

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality zemědělských produktů**



**Aktivita rostlinných látek proti bakteriálním biofilmům**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Michal Švorc**

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

© 2016 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Aktivita rostlinných látek proti bakteriálním biofilmům" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 7. dubna 2016

---

### **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Pavlu Novému, Ph.D. za rady a pomoc při vypracování bakalářské práce.

# Aktivita rostlinných látek proti bakteriálním biofilmům

## Souhrn

Bakteriální biofilmy jsou přisedlé kolonie bakterií, lišící se od planktonicky žijících buněk zvýšenou rezistencí vůči vnějším faktorům. Biofilmy mohou být tvořeny patogenními bakteriemi, které bývají příčinou kontaminací v potravinářském průmyslu, medicíně a dalších oborech. Kromě ohrožení veřejného zdraví jsou biofilmy příčinou velkých ekonomických ztrát nejen v potravinářství, ale i v dalších odvětvích průmyslu, kde způsobují nejčastěji korozi a snižují tepelnou výměnu. Proto je studium vývoje nových metod eliminace biofilmu předmětem zájmu jak v medicíně, tak v potravinářství. Snížená citlivost bakterií vede vědce celého světa k pokusům využití antimikrobiálních látek rostlinného původu, které by v budoucnu mohly představovat alternativu pro aplikaci antibiotik.

Tato diplomová práce je zaměřena na patogenní bakterii *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), která se vyznačuje svou schopností tvořit biofilmy a která je původcem alimentárních onemocnění způsobených produkcí enterotoxinu.

V první, části této diplomové práce je charakterizován bakteriální druh *S. aureus*, popsána problematika bakteriálních biofilmů a možnosti jejich detekce a eliminace. Druhá část této práce je věnována laboratorním pokusům. Cílem této diplomové práce je vyhodnocení aktivity vybraných rostlinných látek (antrachinon-2-karboxylová kyselina, arbutin a hydrochinon) proti tvorbě biofilmu *S. aureus* za použití modifikované mikrodiluční metody *in vitro*. U všech třech testovaných látek byl zjištěn inhibiční účinek proti tvorbě biofilmu při koncentraci 64 µg/ml, což je stejná hodnota jako u použitého kontrolního antibiotika.

**Klíčová slova:** Biofilm, bakterie, *Staphylococcus aureus*, rostlinné látky, antimikrobiální.

# Activity of plant derived compounds against bacterial biofilms

## Summary

Bacterial biofilms are sessile colonies which are different from planktonic cells by increased resistance to external factors. Biofilms can be formed by pathogenic bacteria causing contamination particularly in food industry and in medicine. Beside the threat to public health, bacterial biofilms represent serious economic losses not only in the food industry but also in other sectors of industry where they cause corrosion and reduce the heat transfer. That's why the study of this topic represents the object of interest both in medicine and in food industry. Decrease of the bacterial sensibility to drugs leads the world's scientists to experiment with use of antimicrobial plant derived compounds. These compounds could represent an alternative of antibiotic therapy. This master thesis is focused on pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) which is known for its ability to form a biofilm and which is responsible for numerous food intoxications caused by production of staphylococcal enterotoxins.

In the first part of this thesis, the bacterial species *S. aureus* is characterized and the problematic of bacterial biofilms and the possibilities of their detection and elimination are described. The second part reports laboratory experiments. The aim of this thesis is to evaluate the activity of selected plant-derived compounds (anthraquinone-2-carboxylic acid, arbutin and hydroquinone) against biofilm formation of *S. aureus* using a modified microdilution method *in vitro*. The inhibitory effect of all three tested compounds against biofilm formation was observed at the concentration of 64 µg/ml, which is the same value as was detected in case of control antibiotic.

**Keywords:** Biofilm, bacteria, *Staphylococcus aureus*, plant derived compounds, antimicrobial.

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2 Hypotéza .....</b>	<b>10</b>
<b>3 Cíl práce .....</b>	<b>11</b>
<b>4 Literární rešerše .....</b>	<b>12</b>
<b>4.1 Staphylococcus aureus .....</b>	<b>12</b>
4.1.1 Historie.....	12
4.1.2 Morfologie .....	12
4.1.3 Fyziologie .....	12
4.1.4 Ekologie .....	13
4.1.5 Epidemiologie .....	14
4.1.5.1 Alimentární intoxikace .....	14
4.1.5.2 Infekce asociované se stafylokokovým biofilmem .....	15
4.1.6 Produkce toxinů .....	16
<b>4.2 Biofilm .....</b>	<b>17</b>
4.2.1 Historie.....	17
4.2.2 Složení .....	18
4.2.3 Vznik biofilmu .....	19
4.2.3.1 Adheze .....	20
4.2.3.2 Vznik mikrokolonií .....	21
4.2.3.3 Maturace .....	21
4.2.3.4 Disperze .....	22
4.2.4 Quorum-sensing regulace .....	23
4.2.5 Rezistence .....	23
4.2.6 Výskyt .....	25
4.2.6.1 Bakteriální biofilmy v potravinářském průmyslu.....	26
4.2.7 Metody detekce biofilmů .....	27
4.2.8 Možnosti regulace biofilmů .....	28
4.2.8.1 Prevence .....	29
4.2.8.2 Nové strategie .....	30
<b>4.3 Antibakteriální aktivita látek rostlinného původu.....</b>	<b>33</b>
4.3.1 Chinony.....	33
4.3.1.1 Antrachinon-2-karboxylová kyselina .....	34
4.3.1.2 Arbutin.....	35
4.3.1.3 Hydrochinon .....	35

<b>5</b>	<b>Materiál a metodika .....</b>	<b>37</b>
5.1	Pomůcky a přístroje .....	37
5.2	Chemikálie .....	37
5.3	Kultivační média .....	38
5.4	Použitý kmen <i>S. aureus</i> .....	38
5.5	Použité účinné látky .....	38
5.6	Stanovení antibakteriální aktivity vybraných rostlinných látek .....	38
5.6.1	Příprava inokula .....	38
5.6.2	Příprava základních koncentrací testovaných látek .....	39
5.6.3	Vytvoření koncentrační řady .....	39
5.6.4	Ověření kvality použitého kmene <i>S. aureus</i> .....	40
5.6.5	Stanovení minimální inhibiční koncentrace pro planktonické buňky .....	41
5.6.6	Stanovení minimální inhibiční koncentrace pro biofilm .....	42
5.6.7	Definice minimálních inhibičních koncentrací .....	42
<b>6</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>43</b>
6.1	Přímý Inhibiční efekt testovaných látek na růst planktonických buněk ..	44
6.2	Preventivní inhibiční efekt testovaných látek na růst biofilmu .....	45
<b>7</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>Literární zdroje .....</b>	<b>52</b>
<b>10</b>	<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>59</b>
<b>11</b>	<b>Seznam obrázků, tabulek a grafů .....</b>	<b>60</b>

# 1 Úvod

Biofilm je definován jako společenství mikroorganismů (bakterií, kvasinek a plísní) přisedle žijících a produkujících extracelulární materií polymerních sloučenin. Tento proces je zcela přirozený, dávající mikroorganismům zvýšenou odolnost proti vnějším podmínkám.

Tato společenství mikroorganismů jsou ubikvitární a nacházejí se jak na biotických tak abiotických površích. Biofilmy mohou obsahovat jeden nebo více druhů organismů. V případě druhové heterogenity tyto organismy vzájemně symbioticky koexistují. Extracelulární materie produkovaná buňkami v biofilmu je tvořena zejména polysacharidy, bílkovinami, lipidy a nukleovými kyselinami. Právě přítomnost této materie a látky v ní obsažené jsou zodpovědné za odlišné chování buněk v biofilmu. Tou hlavní změnou je až 1000 krát vyšší odolnost proti antimikrobiálním látkám oproti planktonickým buňkám, které žijí v tekutém médiu. Kromě snížení citlivosti vůči chemickým látkám jsou buňky v biofilmu mnohem odolnější proti mechanickému poškození či UV záření. Z toho důvodu je jejich eliminace velice složitá.

Přirozeným prostředím jsou pro bakteriální biofilmy vodstva, půda a žijící organismy. Biofilmy jsou však přítomné i v antropogenních prostředích. Zde má jejich přítomnost ve většině případů negativní dopad. Avšak bez schopnosti bakterií tvořit biofilmy by naše planeta nevypadala jako dnes. Mezi pozitivní příklady přítomnosti biofilmů patří hlízkaté bakterie fixující vzdušný dusík či střevní mikroflóra zvířat i lidí. V průmyslu se biofilmy využívají v oboru bioreaktorů pro získávání různých metabolitů či transformaci substrátu. Bohužel tvorba biofilmu v průmyslu způsobuje také obrovské finanční ztráty, jelikož dochází ke korozi a snížení přenosu tepla například při pasterizaci atp. Kromě ekonomických ztrát je tu ale i zdravotní dopad. Bakterie žijící ve formě biofilmu jsou potenciálním ložiskem kontaminace, což je problematické zejména v potravinářském průmyslu a zdravotnictví. Zvýšená odolnost buněk v biofilmu způsobující jejich složitou eliminaci představuje vysoké riziko v nemocničním prostředí. Odolnost biofilmů reflektující ve zvýšení rezistence k antibiotikům způsobuje, že tyto infekce se velice obtížně léčí. Proto je studium problematiky biofilmů v současnosti na vzestupu, jelikož je třeba nalézt nové metody, které by umožnily jejich snadnější regulaci. Jednou z možností se zdá být aplikace rostlinných látek, které by mohly být jedním z řešení pro eliminaci biofilmů z různých prostředí.



## **2 Hypotéza**

Na základě již ověřené antimikrobiální aktivity vybraných rostlinných látek je pravděpodobné, že některé tyto látky budou účinné i proti růstu bakteriálních biofilmů.

### **3 Cíl práce**

Cílem diplomové práce je vybrat vhodné antimikrobiální látky rostlinného původu a otestovat jejich schopnost inhibice tvorby bakteriálního biofilmu. Cílem literární rešerše je přiblížit problematiku biofilmů se zaměřením na bakterii *S. aureus*, jako častého původce bakteriálních biofilmů v potravinářském průmyslu a zdravotnictví.

## 4 Literární rešerše

### 4.1 Staphylococcus aureus

Název tohoto mikroorganismu (MO) je tvořen slovem řeckého původu „*Staphyle*“ (hrozen) a „*kokkos*“ (semeno, jádro), který byl již dříve použit pro pojmenování bakterií kulovitého tvaru. Slovo „*aureus*“ pochází z latiny a charakterizuje zlaté zbarvení kolonií způsobené endogenní produkcí karotenoidů (Marshall a Wilmoth, 1981).

#### 4.1.1 Historie

*S. aureus* byl poprvé popsán ve Skotsku roku 1880 A. Ogstonem, glasgowským chirurgem, a to ve spojitosti se záněty povrchových poranění. Svou teorii potvrdil pokusem, kdy injekčně aplikoval hnis ze zánětu do pokusného morčete a myši, čímž dokázal vztah mezi přítomností mikrokoka a vznikem zánětu v místě vpichu (Ogston a Witte, 1984).

#### 4.1.2 Morfologie

*S. aureus* je kulovitého tvaru, dosahuje rozměrů v průměru 1  $\mu\text{m}$  (Somerville a Proctor, 2009) a zpravidla se vyskytuje v párech nebo ve shlucích hroznovitého tvaru (Forsythe, 2010).

Stafylokokový buněčný povrch je komplexní struktura tvořená buněčnou membránou a buněčnou stěnou z peptidoglykanu, teichoové kyseliny a polysacharidů. Buněčná membrána, jako všechny jiné, představuje hranici oddělující vnější prostor a cytoplazmu. Membrána je tvořena dvojitou vrstvou fosfolipidů a velkým množstvím bílkovin zodpovědných za transport látek dovnitř a vně. Další majoritní složky membrány jsou karotenoidy a glukolipidy. Buněčná stěna *S. aureus* je tvořena peptidoglykanem, makromolekulou, která tvoří stavební jednotku trojdimensionální sítě zodpovědnou za pevnost buněčné stěny. Kyselina teichoová zasahuje i do autoregulačních mechanismů, hydrofobicity buněčného povrchu a mechanismu tvorby biofilmů (Somerville a Proctor, 2009).

#### 4.1.3 Fyziologie

*S. aureus* je gram-pozitivní, fakultativně anaerobní, nepohyblivý kok vyskytující se v mnoha biotypech (Smith a kol., 2009). Jeho organismus produkuje širokou škálu virulentních faktorů (stafylokinázy, hyaluronidázy, fosfatázy, koagulázy, hemolysiny), které jsou nezbytné k docílení kolonizace, vstupu do buňky, čerpání živin z hostitele atp. Součástí metabolismu je i produkce karotenoidů, jehož produktem je zlaté zbarvení kolonií (Ray a Bhunia, 2014).

*S. aureus* je fakultativní anaerob, ale jeho růst je rychlý i v aerobních podmínkách. *S. aureus* produkuje toxiny nazývané enterotoxiny, které jsou termostabilní, avšak vyšší teplotou je buňka rychle zabita ( $D_{65,5} = 0,2 - 2$  minuty) (Forsythe, 2010).

Růst *S. aureus* na (v) potravinách a s ním související produkce toxinu závisí na mnoha faktorech: pH, aktivita vody ( $a_w$ ), mikrobiální kompetice. Dále se růst *S. aureus* odvíjí od způsobu zpracování a skladování potravin: přidané konzervační látky, teplota a způsob skladování, mražení, způsob balení, vlhkost. Většina alimentárních patogenů, stejně tak jako *S. aureus* jsou mezofilní s optimálním růstem okolo 37 °C. Přesto si schopnost růstu zachovává při širším rozpětí teplot (7 – 48,5 °C). Proto by všeobecně používaná chladírenská teplota neměla překročit 7 °C, aby byla limitovaná možnost nežádoucí proliferace. Všeobecně jsou potraviny s pH pod 4,5 považovány za tolerantní vůči potravinovým patogenům. Avšak *S. aureus* roste při pH 4,2 – 9,3. Všechny mikroorganismy také potřebují volně vázanou vodu, jinak je jejich růst zpomalen anebo úplně zastaven. *S. aureus* je však jednou z nejvíce tolerantních bakterií k nedostatku vody, a udává se, že je schopen replikace i při  $a_w$  0,83. Další charakteristikou *S. aureus* je tolerance k vysoké koncentraci soli (až 15 %) (Gustafson a kol., 2014).

Tabulka 1. Vnější faktory ovlivňující růst *S. aureus*

	T (°C)	pH	$a_w$	Atmosféra
<b>Optimum pro růst</b>	37	6-7	0,98	Aerobní
<b>Rozpětí podmínek pro růst</b>	7-48	4-10	0,83-0,99 (aerobně) 0,90-0,99 (anaerobně)	Aerobní – anaerobní

(Pawsey, 2002)

#### 4.1.4 Ekologie

*S. aureus* se dobře daří v suchých podmínkách (Langsrud a kol., 2009). Vyskytuje se ve vzduchu, prachu, odpadních vodách, vodě, průmyslu, na lidech i zvířatech (Forsythe, 2010) *S. aureus* je bakterie nacházející se běžně na slizničních membránách, dýchacích cestách a kůži člověka a dalších teplokrevných živočichů. *S. aureus* je přítomen i v zánětech vzniklých poraněním kůže (Ray a Bhunia, 2014). Tato bakterie byla též izolována z četných prostředí (lidská obydlí, nemocniční zařízení či potravinářská provozy) a skupin potravin (čerstvé a zmrazené maso, ryby, syrové mléko či zpracované potraviny určené k přímé konzumaci) (Pawsey, 2002; Langsrud a kol., 2009).

### 4.1.5 Epidemiologie

Lidé a další savci jsou přírodním rezervoárem *S. aureus* s tím, že mohou být přenašeči, aniž by došlo k infekci přítomností bakterie v jejich organismu. Tito jedinci jsou nazýváni zdravými přenašeči (Silbergeld a kol, 2008). *S. aureus* se nachází na kůži a povrchu sliznic (Kooistra-Smid a kol, 2009). U člověka je nejčastějším místem výskytu tohoto koku prostor nosohltanu (zejména v jeho přední části) a hráze (oblast mezi konečníkem a genitáliemi). K bakteriální kolonizaci dochází zejména při narušení kožní bariéry vlivem poranění nebo například častého mytí. Člověk se může poprvé setkat se *S. aureus* již při porodu a následně může dojít k jeho rozšíření mezi další členy rodiny novorozence. Přenos probíhá přímým kontaktem s bacilonosičem. Kolonizace může být přechodná nebo trvalá (Chambers, 2001). Co se výskytu *S. aureus* v prostoru nosním týká, Kooistra-Smid a kol. (2009) uvádí, že 10 – 35 % populace jsou trvalými přenašeči, u 20 – 75 % populace se vyskytuje *S. aureus* a 5 až 50 % populace nikdy nebyli kolonizováni *S. aureus* v nosní dutině.

Odhaduje se, že 30 – 50 % lidské populace je kolonizováno *S. aureus*, aniž by u nich došlo k rozvoji infekce (Noble a kol, 1967; Chaibenjawong a Foster, 2011; Sleiniute a Siugzdaite, 2015; Forsythe, 2010). Incidence je ještě vyšší u jedinců přicházejících do kontaktu s infikovanými v nemocničním prostředí. *S. aureus* může způsobovat širokou škálu nemocí a potíží jako jsou kožní infekce, infekce vnitřních orgánů nebo potravinové otravy (Langsrud a kol., 2009).

#### 4.1.5.1 Alimentární intoxikace

Za tyto intoxikace je zodpovědný stafylokokový toxin zvaný enterotoxin. Symptomy intoxikace se objevují 1-8 hodin po požití kontaminované potravy a zahrnují slinění, žaludeční nevolnosti, zvracení, břišní křeče, průjem. V některých případech je otrava doprovázena bolestmi hlavy, svalovými křečemi nebo změnami krevního tlaku a teploty. Průběh může být velmi rychlý a akutní, ale je ovlivněn množstvím požití kontaminované potravy, množstvím toxinu v potravě a zdravotním stavem jedince (Forsythe, 2010). Postižený se však zotavuje relativně rychle (za 1-2 dny) a úmrtnost je nízká. *S. aureus* je považován za jednoho z nejfrekventovanějších se vyskytujících původců alimentárních onemocnění (Langsrud a kol., 2009). Gustafson a kol. (2014) uvádí, že stafylokokové otravy tvořily před několika desetiletími až 25 % všech potravinových otrav. Jako příklad lze jmenovat případ z Japonska z roku 2000, kde došlo k otravě 13 000 osob konzumací kontaminovaného mléka (Asao a kol., 2003).

K otravě dochází v případě požití okolo 400 ng enterotoxinu v kontaminovaném jídle zdravým dospělým jedincem (Forsythe, 2010).

Zdrojem kontaminace ve výrobním procesu může být surovina, prostředí nebo i člověk (Šťastková a kol., 2012). Přímý (přes ruce) a nepřímý (přes kuchyňské náčiní) přenos *S. aureus* na nekontaminované potraviny připravené ke konzumaci je klasickým a nejčastějším způsobem kontaminace. Většinou jsou otravy způsobeny nedostatečným tepelným zpracováním, kdy není potravina vystavena teplotě nad 60 °C po uspokojivou dobu, anebo není dostatečně rychle vychlazena pod 7,2 °C (Forsythe, 2010).

Skupiny potravin, které jsou zpravidla kontaminované, bývají: maso a masné výrobky, vejce, saláty (tuňákový, vaječný, kuřecí), pečivo a cukrářské výrobky, bagety, mléko a mléčné produkty (Forsythe, 2010). Čerstvé potraviny obsahují enterotoxin méně často, jelikož *S. aureus* nevykazuje vysokou kompetici vůči jiným MO, a proto bývá jeho růst ve společenství více druhů MO potlačen (Ray a Bhunia, 2014).

#### **4.1.5.2 Infekce asociované se stafylokokovým biofilmem**

Schopnost růstu ve formě biofilmu zvyšuje ochranu *S. aureus* proti imunitní odpovědi hostitele, antibiotikům a dalším antibakteriálním látkám (Arciola a kol., 2012). Biofilmy jsou spojovány s persistentními infekcemi (Barsoumian a kol., 2015). Vznik těchto infekcí je asociován zejména s umělými náhradami vpravovanými do lidského těla, jako jsou cévní a ortopedické protézy, kardiostimulátory, ale také různé katetry (cévní, močové). Četnost vzniku periprostetických infekcí se pohybuje mezi 1,5 až 2,5 % u kyčelních a kolenních náhrad (Huseby a kol., 2010). *S. aureus* bývá také častou příčinou infekcí plic u pacientů s cystickou fibrózou (Gupta a kol., 2016b).

Bakteriální infekce jsou hlavní příčinou úmrtí v nemocnicích a mnoho z těchto infekcí může být prisouzeno *S. aureu* (Kiedrowski a Horswill, 2011). Odhaduje se, že až v 80 % bakteriálních infekcí jsou zapleteny biofilmy (Huseby a kol., 2010). Dále vznik biofilmů způsobuje vážné problémy při hojení řezných ran, odřenin a popálenin (Barsoumian a kol., 2015). *S. aureus* a jeho biofilm je také původcem onemocnění jako je osteomyelitida, endokarditida či septická artritida (Boles a Horswill, 2011)

Existují dvě možnosti, jak může dojít ke vzniku biofilmu v lidském těle. První variantou je vpravení již kontaminovaného tělesa. Druhou možností je infekce vzniklá dočasnou bakteriemií a následná adheze a růst bakterií na tkáni hostitele (Huseby a kol., 2010).

Léčba infekcí způsobujících tvorbou biofilmu je velice obtížná a žádá si vysoké dávky nebo různé kombinace více druhů antibiotik, a v některých případech i vyjmutí implantátu z těla (Barsoumian a kol., 2015).

#### 4.1.6 Produkce toxinů

Stafylokokové enterotoxiny (SE) jsou skupinou rozpustných (Ray a Bhunia, 2014), termostabilních sloučenin s molekulovou hmotností mezi 26 000 a 30 000 Da. SE jsou odolné vůči gastrointestinálním proteázám (Gustafson a kol., 2014) a jsou rozděleny dle sérologie na několik typů: od SEA až SEE a od SEG až po SEQ, s tím, že existuje několik subtypů pro toxin SEC. Celkem existuje 21 různých SE (Ray a Bhunia, 2014). Schopnost produkovat SE lze prokázat asi u poloviny kmenů *S. aureus* izolovaných z potravin (Šťastková a kol., 2012).

Různé studie ukazují, že všechny SE vyvolávají u konzumentů intoxikaci z potravin (Šťastková a kol., 2012). SEA je nejběžnějším toxinem spojovaným s alimentárními otravami, u nichž tvoří až 77% podíl. Druhým nejčastějším je SED a SEB. SEB je stabilnější než SEA a byl dokonce považován za potenciální zbraň bioterorismu. Tyto toxiny jsou vysoce termostabilní ( $D_{98,2} = > 2$  hodiny), tudíž jsou velice rezistentní vůči kulinářskému zpracování a také vůči proteolytickým enzymům. ES jsou asociovány s TSS, otravami z jídla, ale také s alergickými a autoimunitními onemocněními (Forsythe, 2010). Nejčastěji dochází k produkci toxinů na substrátu s vysokým obsahem bílkovin, který byl ponechán delší dobu při pokojové teplotě (Ray a Bhunia, 2014).

Tabulka 2. Vnější faktory ovlivňující produkci enterotoxinů

	T (°C)	pH	$a_w$	atmosféra
<b>Optimum pro produkci toxinů</b>	40-45	7-8	0,98	Aerobní (5-20% O <sub>2</sub> )
<b>Rozpětí podmínek pro produkci toxinů</b>	10-48	4,5-9,6	0,87-0,99 (aerobně) 0,92-0,99 (anaerobně)	Aerobní - anaerobní

(Pawsey, 2002)

## 4.2 Biofilm

V přírodě i v potravinářství a dalších odvětvích se MO (bakterie, kvasinky, plísně) přichytávají k podkladům, rostou a tvoří kolonie (Forsythe, 2010). Biofilmy jsou rostoucí systémy mikroorganismů lišící se od planktonických buněk schopností zvýšené obrany proti vnějším činitelům (Shi a Zhu, 2009). Ve vhodných podmínkách, se skoro všechny mikrobiální buňky mohou zachytnout k pevnému podkladu a odolávat vnějším podmínkám, čehož dosahují díky přichytným ústrojím na povrchu svého těla a díky schopnosti produkovat extracelulární polysacharidy (Ray a Bhumia, 2014).

Jednodušeji si lze biofilm představit jako sliz, který vzniká důsledkem množení buněk a produkce polymerní lepidivé materie a který je zodpovědný za zvýšení odolnosti mikroorganismů, uzavřených v tomto přirozeně se tvořícím útvaru. Biofilm je tedy definován jako přisedlé společenství mikrobů charakteristické buňkami, které jsou spojeny s povrchem, zapouzdřené v matrix extracelulárních polymerických látek (EPS), a projevující se pozměněným fenotypem ve vztahu k expresi genů, syntéze metabolitů a růstu (Cloete a kol., 2009).

### 4.2.1 Historie

Přes poměrně dlouhou historii mikrobiologie nebylo studium biofilmů předmětem zájmu vědců, jelikož se většina tehdejších mikrobiologů zabývala studiem planktonických buněk (Hoiby, 2014). Až v roce 1923 se biofilmy opět dostaly do povědomí vědecké veřejnosti. V tomto roce E. C. Angst publikoval svá pozorování ponořených částí lodních trupů pokrytých slizem, který je tvořen bakteriálním biofilmem a který je zodpovědný za koroze těchto částí lodí (Shi a Zhu, 2009). Hoiby a Axelsen roku 1973 poprvé popsali biofilm v prostředí medicíny, a to mikroskopováním vzorků získaných z plic pacientů s cystickou fibrózou, kteří trpěli chronickou infekcí *Pseudomonas aeruginosa* (Hoiby, 2014). Hoiby (2014) dále tvrdí, že termín biofilm byl poprvé užít ve studii Macka a kol. (1975). Přesto byla teorie vzniku biofilmů poprvé popsána až roku 1978 J. W. Costertonem (Blaschek a kol., 2007). V 80. letech 20. století byly biofilmy pozorovány již v mnoha různých prostředích, jako jsou například zařízení na výrobu octu, průmyslová potrubí nebo také tělní implantáty (Shi a Zhu, 2009).



## 4.2.2 Složení

Biofilm se skládá z živých a odumřelých buněk, které jsou přichycené k povrchu pomocí polyaniontových extracelulárních polymerních sloučenin (EPS), které jsou primárně složené z polysacharidů, proteinů, lipidů, kyseliny teichoové a nukleových kyselin (Forsythe, 2010).

Až 97 % matrice biofilmu je složeno z vody. Ta se nachází v buňkách a extracelulárních prostorech. Množství buněčného materiálu uvnitř biofilmu je velice variabilní a pohybuje se od 2 do 15 %. Polysacharidy, proteiny, DNA a RNA jsou zastoupeny rovnoměrně, a to v průměru mezi 1 a 2 % (Sutherland, 2001). Flemming a Wingender (2010) tvrdí, že MO v biofilmu čítají méně jak 10 % sušiny.

„Cementem“, který je zodpovědný za pevnost biofilmu a který podmiňuje jeho trojrozměrnou strukturu, je právě EPS lišící se svým chemickým složením v závislosti na typu organismu, který ho vylučuje a na typu substrátu, který má k dispozici (Whitehead a Verran, 2015). EPS tedy zvyšuje mechanickou stabilitu, která umožňuje především odolávat silám stříhu a smyku. Další funkcí EPS je zadržování vody zprostředkované genezí vodíkových vazeb (Blaschek a kol., 2007).

Hlavní složkou EPS je voda, která představuje 80 – 90 % jejich celkové hmotnosti (Cloete a kol., 2009). Flemming a Wingender (2010) však tvrdí, že obsah vody v extracelulární materii převyšuje 90 %. Sušina EPS je tvořena 85 – 98 % organických látek (Cloete a kol., 2009).

Množství vylučované EPS závisí na množství přítomných živin. Syntéza EPS je podpořena nadbytkem zdroje uhlíku s nižším obsahem dusíku, draslíku a fosforu (Blaschek a kol., 2007).

Majoritní frakcí EPS jsou polysacharidy – lineární nebo rozvětvené sloučeniny o molekulové hmotnosti  $0,5 \times 10^6 - 2 \times 10^6$  Da (Flemming a Wingender, 2010).

Množství extracelulárních proteinů může převýšit obsah polysacharidů. Mezi tyto proteiny řadíme enzymy a strukturální proteiny. Enzymy přítomné v EPS souvisejí s degradací biologických sloučenin, jak rozpustných ve vodě, tak i nerozpustných (celulóza, chitin nebo lipidy). Přítomnost těchto enzymů dělá z EPS externí trávicí systém, který štěpí biopolymery na sloučeniny o nižší molekulové hmotnosti, které jsou následně použity bakteriemi jako zdroj živin. Některé enzymy se také podílejí na degradaci vlastní EPS, čímž je umožněno odloučení části biofilmu a kolonizace okolí. Strukturální proteiny se podílejí na stabilizaci struktury, kde například upevňují vazby mezi buňkami a EPS (Flemming a Wingender, 2010).

Nedílnou složkou je extracelulární DNA (eDNA), která je u *S. aureus*, oproti jiným druhům bakterií, velice důležitou složkou. Původně eDNA byla považována za reziduální materiál pocházející z lýze buněk, ale později byla alespoň částečně vysvětlena funkce její přítomnosti v EPS (Flemming a Wingender, 2010). Přesto se o eDNA stále mnoho neví, a proto je v současnosti její studium předmětem intenzivního výzkumu (Arciola a kol., 2012). eDNA je významná ve všech fázích tvorby biofilmu – adheze, maturace, disperze (Mann a kol., 2009). eDNA se také podílí na strukturální pevnosti biofilmu a antibiotické rezistenci indukované expresí genů zodpovědných za odolnost vůči ATB (Arciola a kol., 2012).

Extracelulární polysacharidy, proteiny a DNA jsou vysoce hydratované hydrofilní molekuly, ale EPS vykazuje i hydrofobní charakter, a to díky lipidům a surfaktantům (povrchově aktivní látky snižující povrchové napětí). Ty se podílejí na všech fázích tvorby biofilmu. Uvnitř biofilmu umožňují disperzi hydrofobních látek. Jsou často lokalizovány na povrchu biofilmu, kde udržují povrchové napětí a podílejí se na výměně plynů či absorpci hydrofobních látek (Flemming a Wingender, 2010).

Je podstatné uvést, že bakterie, jejichž metabolismus neumožňuje tvorbu EPS, nemohou tvořit biofilm (Blaschek a kol., 2007).

Tabulka 3. Zastoupení složek v materii biofilmu

Složka	% z materie
Voda	Až 97
Mikrobiální buňky	2 – 5
Polysacharidy	1-2
Proteiny	<1 – 2
DNA a RNA	<1 – 2

(Sutherland, 2001)

### 4.2.3 Vznik biofilmu

Existuje několik mechanismů, jak se mikroby dostávají do bezprostředního kontaktu s povrchem, pevně se k němu přichytí, vzájemně interagují a rostou v komplexní strukturu (Simoes a kol., 2010).

Bakterie mají schopnost „vycítit“ jisté environmentální signály (pH, teplota, koncentrace kyslíku, dostupnost železa), které jsou spouštěčem pro přechod z planktonické formy růstu do formy biofilmu. Tvorba biofilmu se skládá z řady fyzikálních, chemických a biologických

procesů (Guta a kol., 2016) a je podmíněna velkým množstvím proměnných, jako jsou mimo jiné: bakteriální druh, vnější faktory, genom bakterie nebo vlastnostem povrchu (Cloete, 2009).

Tabulka 4. Důležité faktory ovlivňující adhezi buněk k povrchu

<b>Podklad</b>	<b>Prostředí</b>	<b>Buňka</b>
Textura a hrubost	Rychlost proudění	Hydrofobnost
Hydrofobnost	pH	Extracelulární orgány
Chemické složení	Teplota	EPS
Náboj	Kationty	Signální molekuly
	Přítomnost antimikrobiálních látek	
	Dostupnost živin	

(Simoès a kol., 2010)

#### 4.2.3.1 Adheze

Adheze bakterií k povrchu je fyzikálně-chemický proces určený slabými vazbami jako jsou elektrostatické či van der Waalsovy síly (Van Houdt a Michiels, 2010). Vlastní přichycení bakterií k podkladu může být rozděleno do dvou fází: primární a sekundární.

##### PRIMÁRNÍ

Během procesu primárního přichycení musí být buňka dopravena do bezprostřední vzdálenosti od povrchu. Rozhraní pevného a kapalného skupenství podkladu a tekutiny (například voda nebo krev) je ideálním prostředím pro přichycení a růst MO (Donlan, 2002). Některé druhy mají schopnost pohybu a proto je jejich doprava na místo vzniku biofilmu usnadněna například chemotaxí (Cloete, 2009). V tomto případě se jedná o aktivní adhezi (Srey a kol, 2013). V první etapě adheze jsou podstatné zejména fyzikální síly (Gupta a kol., 2016b). Jakmile se buňka nachází v kritické vzdálenosti od povrchu, tak pokračování závisí na přitažlivých a odpuzivých silách vyvolaných mezi dvěma povrchy (podkladu a bakterie) mezi něž se řadí elektrostatické, hydrofobní a van der Waalsovy síly. Tyto interakce jsou však stále nestabilní a proto může dojít k oddělení buňky od povrchu. V této fázi přichycení, planktonické buňky mohou interagovat s jinými jedinci stejného či odlišného druhu, což dává vzniknout agregátům, které mají význam ve finálním druhovém složení biofilmu (Cloete, 2009).

## **SEKUNDÁRNÍ**

V tomto stádiu dochází k finálnímu zakotvení buněk k povrchu za vzniku molekulárně zprostředkovaných vazeb mezi specifickými adheziny (molekuly umožňující buněčné kontakty) a povrchem. Tyto adheziny jsou ve skutečnosti receptorové specifické ligandy umístěné na vnějších aparátech buněk (pili, fimbrie, fibrily), zprostředkovávající spojení (Cloete, 2009). Díky těmto ústrojím buňky překonávají odpudivé síly elektrické dvojvrstvy buňky a podkladu (Gupta a kol., 2016b). Toto spojení je ireverzibilní a nastává jen v příhodných podmínkách. Jakmile je bakterie takto ireverzibilně přichycena k podkladu prochází řadou genotypových a fenotypových změn, aby byl zajištěn rozvoj a dozrávání biofilmu. Během těchto změn dochází k produkci EPS, zvýšení rezistence vůči biocidům a UV záření, zvýšení frekvence exprese genů či produkce sekundárních metabolitů (Cloete, 2009).

### **4.2.3.2 Vznik mikrokolonií**

Jakmile dojde k tvorbě jednoduché vrstvy, buňky pokračují v reprodukci a vzájemně se shlukují v mikrokolonie. Intenzita této reprodukce se odvíjí od konkurenční mikroflóry, jejího růstu a množství produkovaného EPS (Srey a kol., 2013).

### **4.2.3.3 Maturace**

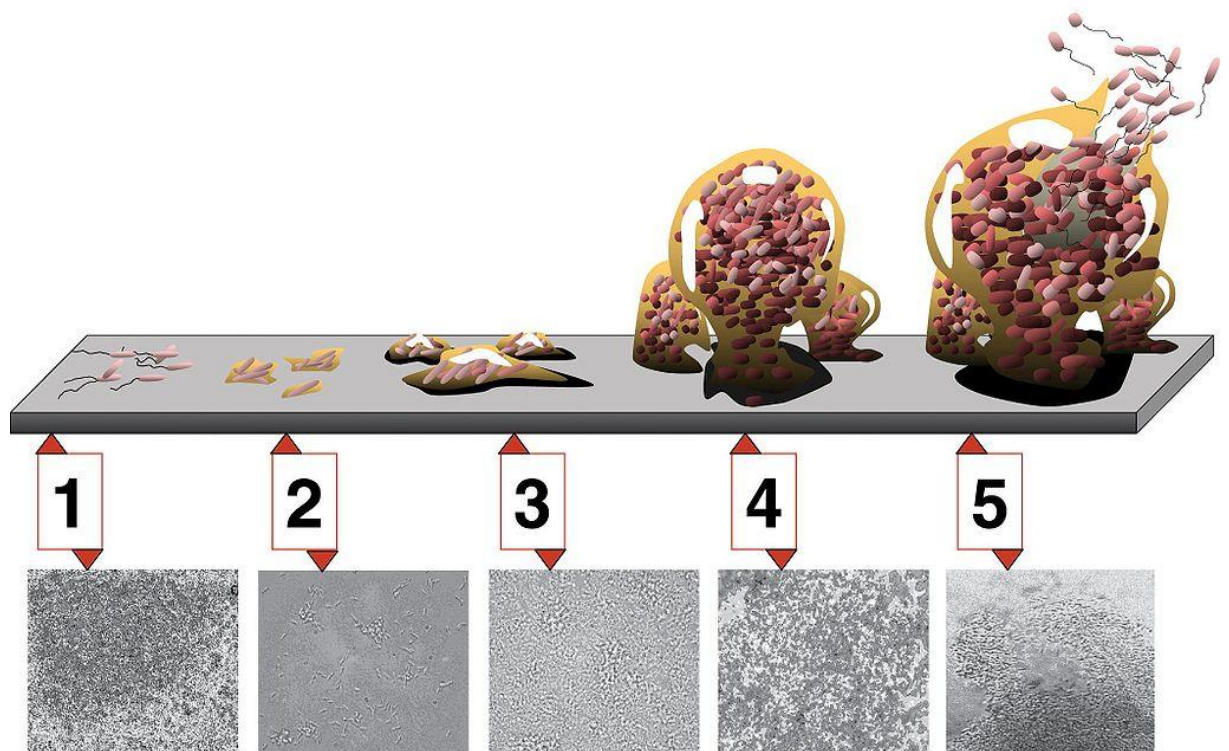
Maturace je fází dozrávání biofilmu. V této fázi je zahájena intercelulární komunikace zprostředkovaná expresí genů specifických pro biofilm. Dochází ke zvýšení sekrece EPS za účelem stabilizace struktury biofilmu (Gupta a kol., 2016b) a zvýšení odolnosti vůči environmentálním vlivům (Srey a kol., 2013). V EPS jsou buňky pevně zaryté a vznikají zde kanálky umožňující cirkulaci, která zajišťuje zásobování živinami a odvádění odpadních látek v celém objemu biofilmu (Cloete, 2009).

Během maturace dochází k vyšší organizaci struktury. Pro plné vytrání biofilmu je zapotřebí doby minimálně 10 dnů. Během této periody dochází ke zvýšení intenzity genetických změn, které jsou zodpovědné za modifikaci metabolismu, membránového transportu, sekreci a genové regulaci (Srey a kol., 2013).

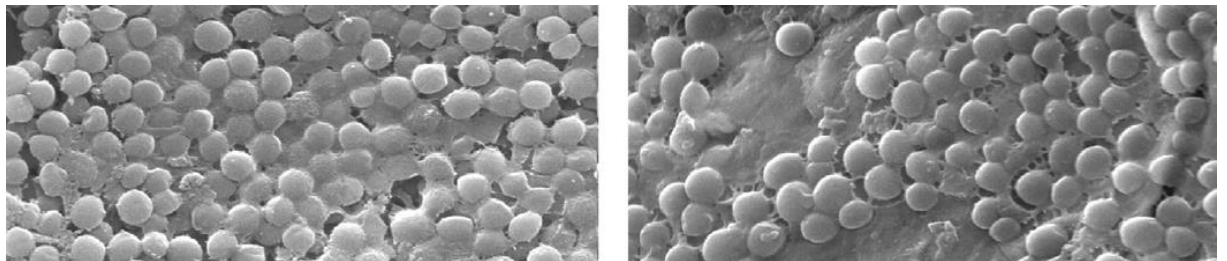
Vyzrálý biofilm se vyznačuje specifickou trojdimenzionální strukturou tvořenou výběžky houbovito-věžovitěho tvaru, mezi nimiž jsou kanálky vyplněné proudící tekutinou mající za úkol zásobování živinami a plyny hlubší vrstvy buněk biofilmu (Otto, 2008).

#### 4.2.3.4 Disperze

Disperze je poslední etapou cyklu tvorby biofilmů, která umožňuje návrat buněk do planktonické formy, čímž se MO rozšiřuje do okolí a kolonizuje nové prostory. K tomu dochází buď odloučením jedné jediné buňky, nebo shluku buněk (Otto, 2008). Toho může být docíleno buď exogenně (například zvýšení proudění) nebo endogenně (například enzymatickou degradací) (Srey a kol., 2013). V případě endogenně vyvolaného odloučení části biofilmu se jedná o aktivní, přirozeně probíhající efekt, kterým si biofilm udržuje jistou tloušťku optimální pro své zachování (Otto, 2008).



Obrázek 1. Fáze tvorby biofilmu (Monroe, 2007)



Obrázek 2. Biofilm *S. aureus* (Di Ciccio a kol., 2015)

#### 4.2.4 Quorum-sensing regulace

Bakterie nejsou solitérní MO. Jedná se o organismy přirozeně tvořící kolonie, využívající složitých systémů mezibuněčných interakcí, které jim usnadňují adaptaci na měnící se podmínky. Úspěšnost této adaptace závisí na schopnosti „vycítit“ a odpovědět na tyto měnící se podmínky změnou exprese genů (Simoes a kol., 2010). Takovýchto regulačních mechanismů je hned několik a quorum-sensing (QS) je právě jedním z nejvíce prostudovaných (Le a Otto, 2015). QS se podílí na regulaci velkého množství procesů. Asad a Opal (2008) uvádí, že QS reguluje například tvorbu biofilmu, sporulaci, rezistenci na antibiotika, autolýzu a metabolickou aktivitu. Bakterie komunikují jedna s druhou pomocí nízkomolekulárních chemických signálních sloučenin, nazývané aktivátory neboli autoinduktory. Bryers a Ratner (2004) označují tyto signální molekuly také jako feromony. K produkci aktivátorů dochází jen za předpokladu přítomnosti dostatečného počtu buněk, tedy quorum. V případě, že je dosaženo dostatečné koncentrace buněk, tak dojde přes produkci aktivátorů k zapnutí daných genů, které navodí změny (Bassler, 2002). Bakterie jsou tedy schopné vycítit velikost a hustotu populace a vzájemnou vzdálenost buněk (Bryers a Ratner, 2004).

QS je definován jako schopnost detegovat extracelulární molekulové signály a upravit expresi genů v reakci na hustotu bakteriální populace (Asad a Opal, 2008). Autoinduktory u gram-pozitivních bakterií jsou krátké peptidy (Smith a kol., 2009; Blaschek a kol., 2007). Signály jsou aktivně přenášeny ven z buňky, kde interagují s membránovými receptorovými proteiny (Bassler, 2002). Následně dochází k aktivaci histidin kinázy, která generuje tvorbu transkripčních faktorů (proteinů), které se podílejí na iniciaci transkripce (Asad a Opal, 2008).

#### 4.2.5 Rezistence

Biofilmy jsou mnohem více rezistentní vůči antimikrobiálním látkám, jako jsou antibiotika a dezinfekční přípravky, než planktonické buňky (2007; Meyer, 2003). Buňky v biofilmu mohou také vykazovat vyšší odolnost vůči UV záření (Blaschek a kol., 2007).

*S. aureus* má výbornou schopnost adaptace na měnící se prostředí a může se stát velice rychle rezistentní vůči všem antibiotikům (McCallum a kol., 2010). Již v roce 1944 Kirby publikoval studii o penicilinové rezistenci *S. aureus*.

Ve spojitosti s antibiotickou rezistencí se často mluví o methicilin-rezistentním *S. aureus* (MRSA), někdy též označován jako multirezistentním *S. aureus*. Kmeny MRSA jsou

rezistentní vůči mnoha různým třídám antimikrobiálních léků. Rozšíření klinických kmenů MRSA se v Evropě pohybuje od 1 % (severní Evropa) po 40 % (jižní a západní Evropa) (Tiemersma a kol., 2004).

ATB cílí na životně důležité struktury a dráhy jako jsou buněčná stěna, DNA, RNA či aparát syntézy proteinů. Buňky vyskytující se ve formě biofilmu mají však ještě mnohem vyšší schopnost rezistence vůči ATB, jelikož EPS chrání mikroorganismy uvnitř biofilmu a tím je limitována difúze antibiotika v biofilmu (Otto, 2008; Forsythe, 2010). Buňky v biofilmu rostou navíc mnohem pomaleji než v planktonické formě a z toho důvodu přijímají antimikrobiální látky také pomaleji. Je dokázáno, že pomaleji rostoucí buňky bývají těmi, které získávají vyšší odolnost (Blaschek a kol., 2007).

Hoiby a kol. (2010) tvrdí, že rezistence stafylokoků vůči exogenním molekulám je zapříčiněna zejména tvorbou biofilmu. Meyer (2003) upozorňuje, že pojem rezistence je u biofilmu zavádějící a že by tento jev měl být nahrazen termínem „fenotypová adaptace“. Stewart (2002) slovo rezistence u biofilmů nahrazuje „sníženou citlivostí“ na antimikrobiální látky. Odolnost je tedy vyjádřena jen fenotypově, nejde o rezistenci podmíněnou geneticky (Schindler, 2008). U buněk biofilmu totiž může dojít k rozvoji ochranného fenotypu jako důsledku přisedlého způsobu života. Tyto buňky nevykazují běžné mechanismy rezistence jako je modifikace enzymů, snížená permeabilita membrán nebo cílená mutace (Blaschek a kol., 2007). Dodnes nebyl mechanismus zvýšení odolnosti biofilmů vůči antimikrobiálním látkám plně pochopen a vysvětlen, ale zcela jistě se jedná o kombinaci faktorů jako je snížení penetrace (difúze) antimikrobiálních látek do (v) biofilmu, QS, přítomnost tzv. perzistorů (Stewart, 2002) a změna chemie prostředí (Augustin a kol., 2004). Naproti tomu Arciola a kol. (2012) tvrdí, že na rezistenci bakterií v biofilmu se silně podílí eDNA. Blaschek a kol. (2007) dále prohlásili, že v případě oddělení buňky z biofilmu a jejím přechodu do planktonické fáze dochází ke ztrátě nabitě rezistence (Blaschek a kol., 2007). Tato rozporuplná tvrzení dokazují nedostatečné pochopení procesů odehrávajících se v biofilmu a z toho plynoucí potřeby intenzivního pokračování výzkumů v tomto oboru.

Schindler (2008) uvádí, že antibiotika dokonce mohou indukovat tvorbu biofilmu u některých bakterií, jelikož tyto bakterie měly možnost se to naučit již během evoluce, což dokazuje například *Pseudomonas aeruginosa* vyskytující se přirozeně v půdě, která za působení tobramycinu a dalších tří úzce příbuzných ATB produkovaných *Streptomyces tenebrarius* (také žijící v půdě) vytváří biofilm. Tato hypotéza je založena na potřebě *Pseudomonas*

*aueruginosa* přizpůsobit se a nalézt mechanismus ochrany proti tobramycinu a právě biofilm jí dal tuto možnost.

V každém případě je použití ATB v potravinářství ve většině zemí zakázáno (Chemat a kol., 2011). Proto je jejich aplikace omezena čistě na medicínální a veterinární použití. Přesto v mnoha případech ATB již nejsou účinná proti bakteriálním infekcím. Z těchto důvodů se jeví možnost využití přírodních látek rostlinného původu jako alternativa v boji proti bakteriálním biofilmům.

#### **4.2.6 Výskyt**

Schopnost přichytit se k různorodým podkladům a zapojit se do několikafázového procesu vedoucího ke vzniku biofilmu mají téměř všechny rody bakterií (Van Houdt a Michiels, 2010).

V přírodních vodních systémech se společenství mikrobů přichycujících se k povrchům skládají z různých druhů organismů. Pro bakterie je výhodné tvořit biofilmy, protože v tomto prostředí jsou mnohem více chráněné proti působení vnějších faktorů. Bakterie, tvořící biofilm, jsou často závislé na ostatních mikroorganismech, s nimiž žijí ve společenství, jelikož to jsou právě tyto mikroorganismy, které zajišťují energii, přísun kyslíku, uhlíku a dalších živin. Proto většina bakterií žije v mikroekosystémech s mnoha dalšími druhy MO (Cloete a kol., 2009). Jakmile dojde ke vzniku této „formy“ života, tak se bakterie mohou stát až tisíckrát odolnější vůči vnějším podmínkám než v planktonickém prostředí (Schindler, 2008). Bakterie tvoří biofilmy v příznivém prostředí. V případě negativní změny tohoto prostředí se buňky oddělí a stěhují se do místa s lepšími životními podmínkami (Cloete a kol., 2009).

Biofilmy se nachází na širokém spektru povrchů. Přirozeným prostředím jsou pro bakteriální biofilmy vodstva, půda a žijící organismy. K tvorbě biofilmů však dochází i v antropogenním prostředí. Biofilmy se dále tvoří například na trupech lodí, což zvyšuje odpor při plavbě a poskytuje základ pro usazování řas a mušlí. Biofilmy v potrubích způsobují turbulenci protékající tekutiny a v průmyslových výměnících tepla biofilm představuje tepelnou izolační vrstvu a snižuje tepelnou výměnu. Vhodné podmínky pro tvorbu biofilmu nalézají bakterie také na sliznicích a výstelkách dutin a na cizích tělesech zavedených do těla, jako jsou kanyly, katétry, protetické implantáty atp. (Schindler, 2008).



V průmyslu je přítomnost biofilmů nežádoucí, i když v některých případech, může být vnímána i pozitivně. Průmysl těží z přítomnosti biofilmů například zužitkování jeho metabolické aktivity (Cloete a kol., 2009). Některé extracelulární enzymy tvořené buňkami v biofilmu jsou obchodně zajímavé a jsou průmyslově vyráběny. Jedná se například o enzymy používané při purifikaci půdy, vody nebo sedimentů (Flemming a Wingender, 2010). Biofilmy také napomáhají udržení homeostázy u vyšších živočichů díky obsazení povrchu střevní sliznice, čímž je do jisté míry chráněna před přilnutím mikrobů patogenních (Schindler, 2008). Přítomnost hlízkových bakterií na kořenech leguminóz je jednou ze zásadních skutečností zajišťujících podstatný zdroj dusíku nejen pro hospodářské plodiny. Tato symbióza však není nic jiného než biofilm bakterií na kořenech rostlin (Cloete a kol., 2009).

Ve většině případů však biofilmy způsobují v průmyslu četné škody, které ročně dosahují ztrát mnoha miliard dolarů. Tvorba biofilmů ovlivňuje nejen průmysl jako takový, ale též veřejné zdraví, protože dochází k přenosu pro biofilmy specifických vlastností jako je rezistence vůči ATB a dalším antimikrobiálním látkám (Cloete a kol., 2009).

#### **4.2.6.1 Bakteriální biofilmy v potravinářském průmyslu.**

Je obecně známo, že mnoho patogenních mikroorganismů vytváří biofilmy na potravinách a na nástrojích sloužící k úpravě surovin, a to za určitých podmínek. Prvním popsáním případem byla tvorba biofilmu bakterií rodu *Salmonella* na potravinářském náčiní. Od té doby byla zjištěna přítomnost bakteriálních biofilmů v potravinářství u mnoha dalších druhů patogenů, jako je například *Lysteria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* sp. (Shi a Zhu, 2009).

Ke kontaminaci (potravin) může dojít přenesením malé části biofilmu. Tudíž vznik biofilmů může vést k vážným hygienickým komplikacím a ekonomickým ztrátám kvůli následné sporulaci bakteriálních patogenů způsobujících alimentární onemocnění. Vedle ohrožení nezávadnosti potravin a vody, přítomnost biofilmů způsobuje také vysoké provozní ztráty (Forsythe, 2010).

Mléko je velice netrvanlivá surovina, a proto je velice náchylné ke kontaminaci a kažení. Hlavním zdrojem kontaminace bývá nedostatečné mytí a dezinfekce zpracovatelských nástrojů a zařízení. Nejčastějšími původci kontaminace v tomto odvětví jsou rody

*Enterobacter, Listeria, Lactobacillus, Micrococcus, Streptococcus, Pseudomonas a Bacilus.* Tvorba biofilmu zde, jako všude jinde záleží na mnoha faktorech. Přesto lze mlékárenství považovat za prostředí vysoce citlivé ke kontaminaci a tvorbě biofilmu (Srey a kol, 2013).

Obor zpracování ryb a mořských plodů patří také do citlivé skupiny, kde je navíc velice důležitá čistota vody. Nejčastějším původcem tvorby biofilmů zde bývá například *Vibrio cholerae*. (Srey a kol, 2013).

Do popředí zájmu vědecké veřejnosti se dostává i problematika tvorby biofilmů v rozvodných sítích pitné vody. Utváření biofilmů ve vodovodních potrubích snižuje kvalitu vody a zvyšuje zdravotní rizika způsobená její konzumací. Bakterie, vyskytující se ve vodovodních sítích, se od jiných kontaminantů pitné vody liší svou schopností využít dostupné zdroje živin, množit se a produkovat a uvolňovat své produkty metabolismy do vody (Cloete a kol., 2009). Kromě vodovodních potrubí se biofilmy tvoří také v zásobnících pitné vody. Biofilmy mohou způsobit velké škody v tomto průmyslovém odvětví, ale jen zřídka obsahují patogenní organismy. Ve skutečnosti biofilmy v tomto prostředí redukují rozšíření patogenních mikrobů a napomáhají čištění vody rozkladem organického materiálu (Flemming, 2002).

Problematika tvorby biofilmů ve vztahu k medicíně je popsána v kapitole 4.1.5.2 (Infekce asociované se stafylokokovým biofilmem).

#### **4.2.7 Metody detekce biofilmů**

Existuje hned několik metod pro detekci a studium biofilmů ve výzkumné laboratoři, například mikroskopické, spektroskopické či imunologické. Tyto metody jsou však dosti komplikované a žádají si sofistikované přístroje a vysokou profesní specializaci. Proto nejsou vhodné pro použití v průmyslu a někdy jen omezeně v laboratořích. V této kapitole proto budou zmíněny jen běžněji používané metody pro detekci biofilmů v in vitro a in vivo podmínkách.

První model pro kultivaci biofilmu v in vitro podmínkách byla šesti jamková mikrotitrační destička. Tato metoda byla aplikována pro studium schopnosti koaguláza-negativního stafylokoka přichytit se k podkladu. V současné době se v laboratořích používají dvě verze této metody, a to za použití klasické mikrotitrační destičky a mikrotitrační destičky s víčkem obsahujícím kuličky zapadající do jamek (Hassan a kol., 2011). V současnosti nejpoužívanější a zřejmě i nejméně nákladnou je metoda za použití mikrotitračních destiček s 96 jamkami

(Stepanović a kol., 2000). Při ní dochází k 24 hodinové kultivaci, po níž je obsah jamek odstraněn a následně bakteriální buňky v biofilmu zafixovány a obarveny krystalovou violetí (CV). Kvantifikace poté probíhá měřením optické denzity (OD) (Peeters a kol., 2008). Technika barvení biofilmu CV byla poprvé popsána Christensenem a jeho týmem (1985). Modifikovaná mikrotitrační metoda s víčkem s kolíčky je méně používaná z důvodu vyšších nákladů. V tomto případě je nárůst biofilmu vyhodnocován na kolíčcích a ne na dně jamek (Sternberg a kol., 2014). Peeters a kol. (2008) dále popisuje několik dalších možností detekce biofilmu. Vedle barvení CV to jsou: test Syto9, fluorescenční diacetátový test, resazurinový test, XTT test a barvení metylenovou modří. Z porovnání těchto metod barvení však CV vyšla jako ta nejúčinnější a nejlevnější. Obdobnou technikou detekce biofilmů je kultivace ve zkumavkách, kterou si také osvojila část vědců zabývajících se studiem tohoto oboru (Hassan a kol., 2011). Další technikou aplikovanou pro detekci biofilmu v laboratorních podmínkách je metoda s agarem s kongo červení (Rewatkar a Wadher, 2013; Hassan a kol., 2011,

Pro studium růstu biofilmu v reálném čase byla vyvinuta metoda, kdy kultivace bakterií probíhá v malém kanálku ze skla. Tento model umožňuje kontinuální neinvasivní pozorování chování biofilmu v různých podmínkách konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem (Sternberg a kol., 2014).

Klinické studie infekcí středního ucha způsobených biofilmem se provádí za použití nízkokoherenční interferometrie a optické koherenční tomografie (OCT). Princip fungování těchto neinvasivních metod je založen na porovnání rozdílů optického rozptylu. De facto se jedná o princip podobný ultrazvuku, s tím rozdílem, že OCT používá záření blízké infračervenému spektru. V případě modifikace existuje možnost aplikovat tento model i pro detekci biofilmů v potravinářském průmyslu (Tan a kol., 2014).

Další potenciálně použitelné techniky jsou například aplikace elektromechanických senzorů umožňujících detekci raných stádií tvorby biofilmu či ATP bioluminiscenční detekce, jejíž princip je založen na kvantifikaci ATP. Jedná se však spíše o nepřímou metodou umožňující kontrolu účinnosti čistícího procesu, tedy umožňující předcházet tvorbě biofilmu. (Tan a kol., 2014).

#### **4.2.8 Možnosti regulace biofilmů**

Prvním a nejúčinnějším regulačním opatřením je prevence (Otto, 2008). Způsoby odstranění biofilmu z prostředí se bude lišit v závislosti na odvětví. V potravinářství se aplikuje jiných

metod než v medicíně. Přesto v této kapitole strategie regulace nebudou zcela rozčleněny do těchto dvou skupin.

#### 4.2.8.1 Prevence

Preventivní opatření proti vzniku biofilmů jsou účinnější než přímá ošetření. Avšak dnes stále neexistuje žádná preventivní metoda, která by byla schopná stoprocentně potlačit vznik nechtěných biofilmů. Hlavní preventivní strategií je pravidelné čištění a dezinfekce před tím, než se bakterie pevně zakotví k podkladu (Simoes a kol., 2010; Van Houdt a Michiels, 2010; Srey a kol., 2013). Avšak je téměř nemožné úplně zabránit tvorbě biofilmu (Meyer, 2003). Racionální design vybavení potravinářského závodu a volba vhodného materiálu hraje velkou roli při minimalizaci tvorby biofilmů (Van Houdts a Michiels, 2010; Storgards, 2009). S tím také souvisí snaha o modifikaci povrchu materiálů za účelem snížení adheze MO k podkladu (Otto, 2008). Meyer (2003) uvádí, že existují 3 základní strategie pro zabránění tvorby biofilmů, a to:

- Včasná dezinfekce před rozvojem biofilmu.
- Dezinfekce biofilmů za použití silných dezinfekčních prostředků.
- Inhibice adheze mikroba vybranými materiály.

Meyer (2003) ale také dále tvrdí, že ne každá z těchto taktik je použitelná ve všech případech, kde biofilmy představují problém. Úspěšné řešení vidí v kombinaci různých metod.

Mnoho různých chemických produktů může být použito k čištění materiálů. Aplikace čistících látek by měla umožnit narušení EPS, aby dezinfekční přípravky následně získaly přístup přímo k bakteriálním buňkám, které budou zničeny (Srey a kol., 2013). Běžně aplikované chemické čistící produkty jsou tenzidy (povrchově aktivní látky) a různé kyselé a zásadité přípravky, rozpouštějící a emulgující organické zbytky. (Simoes a kol., 2010). Čištěním může být odstraněno až 90 % MO z povrchu. Tyto buňky však nejsou zabity a tudíž se mohou usadit na jiných místech. Proto je po čištění zařazena dezinfekce.

Bremer a kol. (2009) uvádějí, že typickým preventivním opatřením proti tvorbě biofilmů v mlékárenství je pětifázový čistící proces skládající se z (1) předvýplachu trubek, (2) mytí směsí horké vody a zásaditého čistícího prostředku, (3) výplachu vodou o pokojové teplotě, (4) mytí směsí horké vody a kyselého čistícího prostředku zakončené (5) pečlivým vypláchnutím zajišťující hygienickou nezávadnost potrubního systému.

Mezi další preventivní opatření patří důsledné dodržování chladírenské teploty, limitace působení vody v průběhu zpracování potravin (týká se zejména zpracování masa). Přítomnost aerosolu ve výrobních prostorách je také jedním z faktorů favorizujících tvorbu biofilmů (Carpentier, 2009).

Buňky ve formě biofilmu však, jak již bylo zmíněno, jsou mnohem variabilnější než buňky v tekutých médiích, což se odráží ve zvýšeném stupni rezistence. Tato odolnost způsobuje, že konvenční ošetření přestávají být účinná. Proto je velice důležité hledat nové strategie, které by zefektivnily boj proti tvorbě biofilmů (Simoes a kol., 2010).

#### **4.2.8.2 Nové strategie**

##### **FUNKČNÍ MATERIÁLY**

Mnoho vědců se dnes zabývá studiem modifikace povrchů, které snižují adhezi MO (Srey a kol., 2013). Arnold a kol. (2004) podal zprávu o signifikantním snížení množství bakteriálních buněk na povrchu elektricky leštěné oceli. Nerezová ocel je hojně užívaná v potravinářském průmyslu. Pravidelné mechanické a chemické čištění však poškozuje její povrch. Mikroorganismy společně s organickým materiálem z výroby se zde, na takto poškozených ocelových površích, mohou snadněji shromažďovat a být chráněny proti čistícím a dezinfekčním přípravkům (Blaschek a kol., 2007). Různě modifikované materiály se dnes označují pojmem „funkční materiály“. Arciola a kol. (2012) je nazývá jako materiály rezistentní k infekcím a uvádí celkem 3 různé způsoby jejich výroby: (1) modifikace povrchu anti-adhezivní látkou, (2) vybavení materiálu antimikrobiální látkou, (3) kombinace předchozích dvou.

Jako příklad funkčního materiálu lze uvést nerezovou ocel obohacenou o nízký přídavek stříbra (0,042 %), které je známo pro své antimikrobiální účinky. Dalším funkčním materiálem je nerezová ocel povrchově ošetřená oxidem titaničitým (Storgards, 2009).

V nemocničním prostředí se jako anti-adhezivum díky svým hydrofilním vlastnostem používá heparin. Další potenciálně použitelnou látkou by v tomto případě bylo možné užít chitosanu, přírodního polysacharidu, který vykázal anti-adhezivní efekt i přes doposud ne zcela pochopený mechanismus účinku. Přesto již byla publikována možná vysvětlení jeho působení. Jedním z nich je interakce mezi kladně nabitým chitosanem a negativně nabitou buňkou, která vede k úniku intracelulárních komponent (Arciola a kol., 2012)

## ENZYMATICKÉ PREPARÁTY

Vzhledem k nízké účinnosti detergentů a dezinfekčních preparátů se jeví přídavek enzymů do těchto přípravků jako účinná možnost eliminace biofilmů (pochopitelně za předpokladu, že nedojde k inaktivaci enzymů dalšími látkami ve směsi). Tyto produkty jsou také označovány jako bio-čističe nebo zelené chemikálie (Simoos a kol., 2010). Enzymy jsou bílkoviny vyznačující se katalytickou aktivitou vůči specifickým substrátům (Srey a kol., 2013). Vzhledem k heterogenitě EPS se směs enzymů zdá být nezbytná pro dostatečnou degradaci biofilmu (Simoos a kol., 2010).

Augustin a kol. (2004) prokázali možnost aplikace enzymatických preparátů proti biofilmům v mlékárenství. Avšak eliminační efekt byl znatelně snížen přítomností mléka obsahujícího proteolytické enzymy. Jedním z nejvíce prostudovaných enzymů v boji proti biofilmům je deoxyribonukleáza (DNase), která degraduje eDNA, jež je považována za jednu ze strukturálních složek podílejících se na stabilitě biofilmu (Arciola a kol., 2012). Použití DNasy je však silně závislé na stáří biofilmu. Od jistého stádia růstu biofilmu je ošetření DNasou neúčinné (Okshevsky a kol., 2015). Johansen se svým týmem (1997) zveřejnil výsledky studie, ve které došli k závěru, že směs enzymů hydrolyzujících polysacharidy je schopna odstranit biofilm. V kombinaci s oxidoreduktázami navíc použití této směsi vykazovalo nejen efekt proti biofilmům, ale i baktericidní aktivitu. Další enzym, jehož aktivita proti biofilmu *S. aureus* byla prokázána je aminopeptidáza získaná z *Aspergillus oryzae* (Elchinger a kol., 2014).

Použití této enzymatické technologie je dosti komplikované. Specifita způsobu účinku enzymů je velice složitá. Navíc je zapotřebí identifikace enzymů účinných proti více druhům biofilmů. Proto přípravky obsahující hned několik různých enzymů budou základním předpokladem pro úspěšnou regulaci biofilmů touto technologií (Meyer, 2003). Mimo to použití enzymů jakožto agent proti biofilmu je, v porovnání s použitím konvenčních procedur, metodou vysoce nákladnou, která bývá často i patentově chráněná (Simoos a kol., 2010).

## POUŽITÍ BAKTERIOFÁGŮ

Bakteriofágy jsou viry postihující bakterie (Abedon, 2015), vyznačující se zpravidla vysokou specifitou a netoxicitou pro člověka (Simoos a kol., 2010). Prvně byli bakteriofágy klinicky aplikováni již na začátku 20. století (Merril a kol., 2003).

Existují 2 hlavní reprodukční cykly bakteriofágů. Prvním je lytický cyklus, kdy dochází k pomnožení virů v hostitelské buňce a její lýze. Uvolněné viry následně infikují další buňky. Druhý cyklus je lyzogenní. V tomto případě se genom viru začlení do genomu hostitelské buňky a tím přechází i do genomu dceřiné buňky vzniklé po replikaci. Proto jsou logicky jen lytické bakteriofágy předmětem zájmu v boji proti biofilmům (Sillankorva a Azeredo, 2014).

Bohužel doposud nebyla vyvinuta úspěšná metoda pro využití bakteriofágů v boji proti bakteriálním biofilmům, která by byla v praxi přijata potravinářskými závody. Jedním z problémů je vysoké ovlivnění aktivity fágů chemickým složením prostředí a dalšími faktory jako je teplota, koncentrace viru či stáří biofilmu (Simoaes a kol., 2010). Mimo to byla popsána koexistence bakteriofágů a bakterií v biofilmu. Z tohoto důvodu odborníci doporučují kombinovat ošetření bakteriofágy s enzymy či detergenty degradující biofilmovou materii (Srey a kol., 2013). Jednou z možností použití v praxi je aplikace bakteriofágů na povrch materiálu za účelem preventivního ošetření (Sillankorva a Azeredo, 2014). Odvětvím, kterému je použití bakteriofágů v praxi nejbližší je zemědělská prvovýroba, a to ošetření sklízecích čepelí pro špenát bakteriofágovým sprejem, který představuje alternativu pro kartáčování a máčení těchto čepelí v dezinfekčních přípravcích (Srey a kol., 2013).

### **QUORUM-SENSING INHIBITORY**

Zjištění, že mnoho druhů bakterií komunikuje pomocí QS, nabízí další možnost eliminace biofilmů. Snadno si můžeme představit, že úplné pochopení mechanismu QS může vést k objevu široce používané eliminační strategie s významným efektem na utváření biofilmů (Simoaes a kol., 2010). V tomto případě bude zapotřebí použití QS inhibitorů, které by mohli sloužit jak při prevenci, tak při přímém ošetření zejména bakteriálních infekcí způsobených přítomností biofilmu v organismu, který byl do těla zavlečen buď přirozenou cestou nebo implantací cizího tělesa (Arciola a kol., 2012).

### **ULTRAZVUK**

Aplikace ultrazvuku je známou technikou v různých odvětvích potravinářského průmyslu a to zejména v procesech sterilizace a extrakce (Chemat a kol., 2011). Použití ultrazvuku jako prostředku k odstranění biofilmu z nerezové oceli a z polypropylenových materiálů bylo shledáno účinným. Pro zvýšení účinnosti byl ultrazvuk kombinován s aplikací enzymů či ozonu. Dále se prokázalo, že aplikace ultrazvuku zvýšila efektivitu působení ATB, což je vysvětleno jejich rychlejší distribucí v biofilmu (Srey a kol., 2013).

Jak již bylo zmíněno výše, kombinace dvou a více odlišných technik, které se osvědčily jako efektivní, je žádoucí, ne-li nezbytná pro eliminaci bakteriálních biofilmů. Překážkový efekt, o němž je řeč, je základem konzervace potravin, který je aplikovatelný i na regulaci biofilmů. Kromě příkladů kombinací uvedených v předešlých podkapitolách v praxi lze zařadit i UV záření či přírodní produkty například rostlinného původu (Srey a kol., 2013).

### **4.3 Antibakteriální aktivita látek rostlinného původu**

V posledních třech dekadách bylo objeveno mnoho nových derivátů ATB a dalších syntetických léčiv s cílem eradikovat bakterie zodpovědné za rozličná onemocnění. Avšak zejména ATB indukují mutace v genomu těchto bakterií, odrážející se ve zvýšené četnosti výskytu rezistence na tyto léky (Gupta a kol., 2016a). Existují tedy dva hlavní důvody, proč v současnosti stoupá zájem o téma antimikrobiálních účinků rostlinných extraktů. Prvním je rozšíření spektra antimikrobiálních léků předepisovaných lékaři a druhým důvodem je skutečnost, že si lidé uvědomují důsledky nadměrného užívání léků (Sher, 2009). Etnofarmakologové, botanici, mikrobiologové, chemici přírodních látek – ti všichni dnes doslova prohledávají Zemi za účelem nalezení fyto-sloučenin, jejichž objevení by vedlo k posunu léčby infekčních onemocnění (Cowan, 1999). Nadto použití ATB není povoleno v potravinářství (Chemat a kol., 2011). Jako východisko z této problematické situace výzkumníci vidí použití léčivých rostlin s prokazatelným obsahem antimikrobiálních látek, tradičně používaných lidmi na různých místech planety (Gupta a kol., 2016a).

Látky rostlinného původu jsou používány po dlouhá tisíciletí nejen v tradiční medicíně, ale také v kuchyni jako dochucovadla a konzervanty pro prodloužení údržnosti potravin. Takovéto látky jsou tak hojně užívané zejména díky svým antimikrobiálním, antioxidačním a farmaceutickým účinkům. Ve většině případů jsou tyto bioaktivní látky produktem sekundárního metabolismu rostlin. Mezi nejtypičtější představitele patří chinony, saponiny, flavonoidy, taniny, kumariny, terpenoidy a alkaloidy. Rozdílnost v jejich struktuře a chemickém složení se odráží v odlišnosti mechanismu účinku (Gyawali a Ibrahim, 2014).

#### **4.3.1 Chinony**

Chinony jsou tvořeny cyklickým řetězcem s dvěma ketonovými substituenty. Vyskytují se běžně v přírodě a jsou charakteristické svou vysokou reaktivitou (Cowan, 1999). Tyto sloučeniny bývají velice často barevné, a proto jsou hojně používány jako přírodní barviva. Chinony se podílejí na hnědnutí krájeného nebo poškozeného ovoce a zeleniny. Stejně tak se



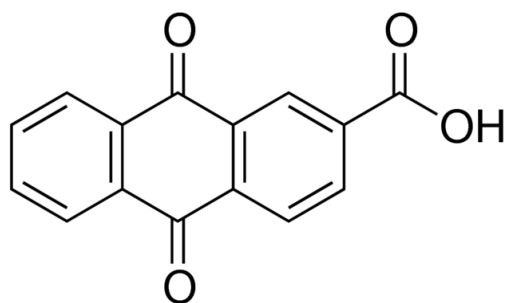
účastní syntézy melaninu v lidské kůži (Omojate a kol., 2014). Redox potenciál zejména chinon-hydrochinonového páru je velice důležitý v mnoha biologických systémech (Koenzyme Q, vitamín K,...) (Cowan, 1999).

Již před více než půl stoletím Hoffman-Ostenhof (1947) publikoval skutečnost, že antibiotický efekt chinonů není zajištěn jednou jedinou reakcí, nýbrž že se jedná o složitý proces, jehož součástí je hned několik různých reakcí. Existuje tedy více mechanismů antibakteriálního působení chinonů. Jedním z nich je tvorba kovalentně vázaného, tedy irreverzibilního, komplexu nukleofilních aminokyselin v bílkovinách, které jsou inaktivovány a tím dochází ke ztrátě buněčných funkcí. Dále také pravděpodobně dochází k reakcím chinonů s adheziny, polypeptidy buněčných stěn a enzymů vázaných na membrány mikroorganismů (Cowan, 1999). Z tohoto důvodu je potenciál využití chinonů jako antibakteriálních agens velmi vysoký. Chinony mohou také učinit substrát nedostupný pro MO (Omojate a kol., 2014).

Jako u všech látek rostlinného původu je však základním předpokladem pro jejich použití jako antimikrobiálních přípravků netoxicity pro lidský organismus. Proto musí být vždy provedeny toxikologické studie (Cowan, 1999).

#### **4.3.1.1 Antrachinon-2-karboxylová kyselina**

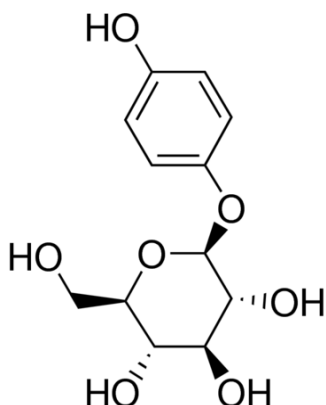
Všechny antrachinony mají polycyklický řetězec obsahující dvě benzenová jádra s karboxylovou skupinou na 9. a 10. uhlíku (Langdon-Jones a Pope, 2014). Antrachinon-2-karboxylová kyselina (AQCA) je antrachinonový derivát, který je užíván pacienty trpícími alergiemi (Tsai a kol., 1993). Antimikrobiální aktivita AQCA stále není dostatečně prozkoumána. Doposud bylo publikováno jen málo studií zabývajících se antimikrobiální aktivitou AQCA. Jednou z nich je například studie, ve které byla zkoumána antibakteriální aktivita AQCA pomocí diskové difuzní metody proti *Helicobacter pylori*, kde byla minimální inhibiční koncentrace rovna 8 µg/ml (Singh, 2014).



Obrázek 3. Vzorec AQCA (Sigma-Aldrich, 2016a)

#### 4.3.1.2 Arbutin

4-hydroxyfenyl- $\beta$ -D-glukopyranosid, jinak nazývaný arbutin je glykosylovaný hydrochinon s dezinfekčními a depigmentačními vlastnostmi (bělí kůži). Proto je hojně používán v kosmetice jako bělicí agens díky své schopnosti inhibovat tyrozinázovou aktivitu (Jedsadayamata, 2005). Arbutin je syntetizován širokou skupinou rostlin. Ve vyšších koncentracích je obsažen v rostlině *Bergenia crassifolia* (Bergenie tučnolistá) (Pop a kol., 2009).



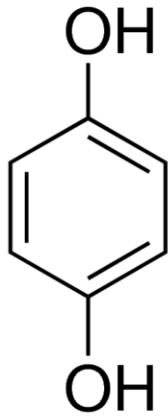
Obrázek 4. Vzorec arbutinu (Sigma-Aldrich, 2016b)



Obrázek 5. Bergerie tučnolistá (San Marco growers, 2001)

#### 4.3.1.3 Hydrochinon

Hydrochinon, též benzen-1,4-diol, je dvojsytný fenol s oxidačně-redukční aktivitou. Tato látka vytváří nebarevné krystalky a jeho roztoky na vzduchu rychle hnědnou z důvodu oxidace. Hydrochinon je také produktem hydrolýzy arbutinu (Bang a kol., 2008).



obrázek 6. Vzorec hydrochinonu (Sigma-Aldrich, 2016c)

## 5 Materiál a metodika

### 5.1 Pomůcky a přístroje

- Kádinky, odměrné válce, krimpovací vialky o objemu 20 ml, krimpovací kleště, magnetické míchadlo, plastová korýtka, injekční stříkačky, plastové zkumavky s uzávěrem o objemu 10, 15 a 50 ml, zkumavky Eppendorf o objemu 2 ml, stojánky na zkumavky, laboratorní lžičky, automatické pipety o maximálním objemu 100, 300, 1000 a 10 000  $\mu$ l a pipetovací špičky o odpovídajícím objemu, injekční stříkačky, mikrotitrační destičky s 96 jamkami s víčkem, Petriho misky, klávovací pytle, gumové rukavice.
- Vařič s magnetickým mícháním, pH metr, analytické váhy, běžné váhy, autokláv, inkubátor, flow-box, ultrazvuk, vibrační míchadlo, plynový kahan, optický denzimetr k měření McFarlandovy stupnice, spektrofotometr.

### 5.2 Chemikálie

- Destilovaná voda pro přípravu kultivačních médií, fyziologického roztoku, roztoku krystalové violeti a jako rozpouštědlo pro penicilin.
- Dimethylsulfoxid (Penta, Česká republika) jako rozpouštědlo pro testované rostlinné látky.
- Tween 80 (Sigma-Aldrich, Německo) sloužící jako emulgátor pro zlepšení rozpustnosti testovaných látek.
- Fyziologický roztok pro výplach mikrotitračních destiček: 0,9 %  $\Theta$  NaCl (Sigma-Aldrich, Německo) v destilované vodě.
- Metanol pro fixaci biofilmu (Lachner, Česká republika).
- Krystalová violet' (Sigma-Aldrich, Čína) pro barvení biofilmu.
- Etanol (Penta, Česká republika) pro spektrofotometrické vyhodnocení nárůstu biofilmu.
- Chlorid draselný (Sigma-Aldrich, Německo), Trizma base (Sigma-Aldrich, USA) a NaCl (Sigma-Aldrich, Německo) pro přípravu pufru.
- 35% kyselina chlorovodíková pro úpravu pH pufru.

### 5.3 Kultivační média

- Bujón Mueller-Hinton (MHB), nakoupený od firmy Oxoid (Anglie) který byl použit na přípravu zásobního (skladovaného v lednici při teplotě do 7 °C) a sekundárního inokula (kultivovaného 24 hod při 37 °C). Bujón MH také posloužil k ověření kvality použitého kmene.
- Bujón Tryptone Soya (TSB), nakoupený od firmy Fluka (Indie) namíchaný dle návodu s přidavkem 1 % glukózy. TSB byl připraven z pufru a posloužil k přípravě finálního inokula a ke kultivaci v mikrotitračních destičkách.

### 5.4 Použitý kmen *S. aureus*

Pro pokus byl použit kmen *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC® 29213™). *S. aureus* ATCC 29213 je kmen sensitivní vůči oxacilinu a tudíž se nejedná o MRSA.

### 5.5 Použité účinné látky

- Penicilin (Fluka, Čína)
- Antrachinon-2-karboxylová kyselina (Sigma-Aldrich, Německo).
- Arbutin (Sigma-Aldrich, Slovensko).
- Hydrochinon (Sigma-Aldrich, Německo).

### 5.6 Stanovení antibakteriální aktivity vybraných rostlinných látek

#### 5.6.1 Příprava inokula

Nejprve bylo založeno zásobní inokulum, a to smícháním 10 ml MHB s 5 kapkami základního. Takto připravené se po 24 hod inkubace při 37 °C skladovalo v chladicím boxu při teplotě do 7 °C. Inokulum, které bylo použito pro přípravu zásobního, bylo již předpřipraveno a skladováno v mrazicím boxu při teplotě -80 °C.

Zásobní inokulum následně posloužilo k přípravě sekundárního. To bylo připraveno z 5 ml MHB a 3 kapek zásobního inokula. Po 24 hod inkubace bylo toto inokulum použito pro přípravu finálního, kdy bylo do 15 ml zkumavky odebráno 10 ml TSB. Nato se změřila optická denzita na denzitometru a přidalo se takové množství pracovního inokula, aby byla denzita zkumavky s TSB zvýšena o 0,5 McF, což odpovídá koncentraci  $1 \times 10^8$  CFU/ml.

## 5.6.2 Příprava základních koncentrací testovaných látek

Inhibiční aktivita rostlinných látek antrachinon-2-karboxylová kyselina (AQCA), arbutin (ARB) a hydrochinon (HQ) byly testovány v koncentracích ( $\mu\text{g/ml}$ ): 512; 256; 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1. Pro všechny látky, včetně penicilinu, byla nejprve potřebná navážka přepočítaná v závislosti na čistotě použitých látek, jelikož v ani jednom případě nebyly k dispozici látky o 100% čistotě.

Pro antrachinon-2-karboxylovou kyselinu, arbutin a hydrochinon byly připraveny zásobní roztoky. Po navážení daného množství účinné látky na analytických vahách bylo přidáno odpovídající množství rozpouštědla dimethylsulfoxid (DMSO) s tím, že koncentrace zásobního roztoku byla 100 krát vyšší, aby nedošlo k ovlivnění výsledku analýzy způsobeným přítomností vyššího množství rozpouštědla. Tzn., že koncentrace zásobního roztoku byla 51,2 mg/ml. Ze zásobního roztoku bylo poté odpipetováno 18  $\mu\text{l}$  do zkumavek Eppendorf, které byly skladovány v mrazicím boxu při teplotě  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro každý test byla vzata vždy jedna zkumavka Eppendorf, do níž bylo přidáno 1782  $\mu\text{l}$  TSB, čímž bylo docíleno finální koncentrace roztoku 512  $\mu\text{g/ml}$ .

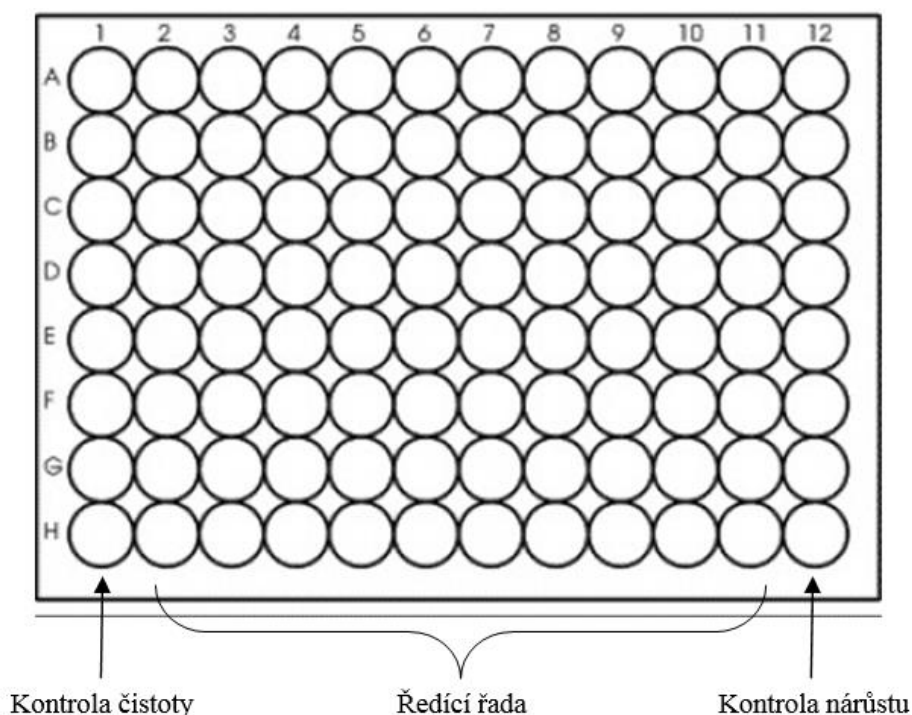
V některých případech bylo použito ultrazvukové lázně pro zlepšení rozpouštění látek v rozpouštědlu. To platilo zejména pro AQCA, který se vyznačoval sníženou rozpustností.

Jako kontrolní látka posloužil penicilin o koncentraci ( $\mu\text{g/ml}$ ): 256; 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5. Navážka penicilinu byla rozpuštěna v odpovídajícím množství destilované vody tak, aby výsledná koncentrace byla 100 krát vyšší. Tzn., že koncentrace zásobního roztoku byla 25,6 mg/ml. V tomto případě byla rozpouštědlem destilovaná voda. Následně bylo odpipetováno 18  $\mu\text{l}$  z tohoto zásobního roztoku do zkumavky Eppendorf a přidáno 1782  $\mu\text{l}$  TSB. Zásobní roztok penicilinu byl připraven před každým testem, z důvodu jeho snížené stability během rozmrazení.

## 5.6.3 Vytvoření koncentrační řady

Po přípravě základní koncentrace (512  $\mu\text{g/ml}$  pro AQCA, ARB a HQ; 256  $\mu\text{g/ml}$  pro penicilin) bylo přistoupeno k vytvoření koncentrační řady na mikrotitračních destičkách, kde 1. sloupec sloužil pro kontrolu čistoty (sterility), 2. – 11. sloupec obsahoval sériové ředění a 12. sloupec sloužil jako kontrola nárůstu (nedošlo k přidavku testované rostlinné látky).

Nejprve bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  TSB do prvního sloupce a 80  $\mu\text{l}$  do 3. – 12. sloupce. Poté bylo odměřeno 160  $\mu\text{l}$  ze zásobních roztoků do jamek 2. sloupce. Dále bylo provedeno ředění, tak že bylo odpipetováno 80  $\mu\text{l}$  z 2. do 3. sloupce, vyměněny pipetovací špičky, promíchán obsah 3. sloupce (jedno napuštění a vypuštění pipetou) a přepipetováno 80  $\mu\text{l}$  z 3. do 4. sloupce. Takto se postupovalo až do 11. sloupce, kdy byla diluce zakončena přepipetováním 80  $\mu\text{l}$  z 11. sloupce do odpadu. Následně bylo do každého sloupce kromě prvního (kontrola čistoty) přidáno 20  $\mu\text{l}$  připraveného finálního inokula. Výsledná koncentrace buněk v zaočkovaných destičkách byla  $2 \times 10^7$  CFU/ml. Mikrotitrační destičky s takto připravenou ředící řadou, sloupcem kontroly čistoty a kontroly nárůstu byly ponechány po 24 hod v inkubátoru při 37 °C.



Obrázek 7. Design experimentu (WK Lab, 2016)

#### 5.6.4 Ověření kvality použitého kmene *S. aureus*

Před započítím pokusu byla ověřena kvalita použitého kmene bakterie podle referenční metody (CLSI, 2012). To bylo provedeno podobně, jako je popsáno v kapitole 5.6.3. (Vytvoření koncentrační řady), ale pracovalo se s odlišným kultivačním médiem a koncentrací ATB. Stejně tak byla inokulace provedena odlišně.

Nejprve se připravil zásobní roztok penicilinu o koncentraci 16 $\mu\text{g/ml}$  stejným postupem jako je popsáno v kapitole 5.6.3. (Příprava základních koncentrací testovaných látek) s rozdílem,

že v tomto případě se pracovalo výhradně s médiem MH. Následně bylo po 200  $\mu\text{l}$  vytvořeného roztoku napipetováno do jamek druhého sloupce mikrotitrační destičky. Poté se napipetovalo do všech zbylých jamek po 100  $\mu\text{l}$  média MH. Nato se provedlo ředění tak že bylo odpipetováno 100  $\mu\text{l}$  z 2. do 3. sloupce, vyměněny pipetovací špičky, promíchán obsah 3. sloupce (jedno napuštění a vypuštění pipetou) a přepipetováno 80  $\mu\text{l}$  z 3. do 4. sloupce. Takto se postupovalo až do 11. sloupce, kdy byla diluce zakončena přepipetováním 80  $\mu\text{l}$  z 11. sloupce do odpadu.

Po vytvoření koncentrační řady bylo provedeno zaočkování inokulem připraveným stejně jak je popsáno v kapitole 5.6.1 (Příprava inokula), ve kterém bylo médium TSB nahrazeno MH. Takto připravené finální inokulum bylo přelito do Petriho misky. Poté se za použití kovové inokulační destičky s hroty (zvané „ježek“) provedlo zaočkování, kdy hroty byly ponořeny do lihu a opáleny plamenem za účelem sterilizace. Po vychlazení byly hroty ponořeny do inokula v Petriho misce a následně provedena inokulace založené mikrotitrační destičky tak, aby 1. sloupec, tedy kontrola sterility, nebyla kontaminována a zůstala sterilní. Výsledná koncentrace buněk v zaočkovaných destičkách byla  $5 \times 10^5$  CFU/ml (CLSI, 2012).

Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla změřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 512 nm. Absorbance každé jamky mikrotitračních destiček s víčkem byla změřena před inkubací a po inkubaci (po 24 hod). Následně byly hodnoty před inkubací odečteny od hodnot po inkubaci. Získané výpočty byly dále zprůměrovány pro každou testovanou látku. Nakonec byly hodnoty poděleny kontrolou nárůstu a převedeny na procenta.

MIC naměřená při tomto ověřovacím testu byla 0,25  $\mu\text{g/ml}$ . Referenční MIC pro *S. aureus* ATCC 29213 za použití penicilinu a výše popsané metody se pohybuje mezi 0,25 a 2  $\mu\text{g/ml}$  (CLSI, 2013). Proto bylo vyhodnoceno, že použitý kmen je čistý a jeho růstové vlastnosti odpovídají referenčním hodnotám.

### **5.6.5 Stanovení minimální inhibiční koncentrace pro planktonické buňky**

Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) testovaných látek pro planktonické buňky byla změřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 512 nm. Absorbance každé jamky mikrotitračních destiček s víčkem byla změřena před inkubací a po inkubaci (po 24 hod). Následně byly hodnoty před inkubací odečteny od hodnot po inkubaci. Získané



výpočty byly dále zprůměrovány pro každou testovanou látku. Nakonec byly hodnoty poděleny kontrolou nárůstu a převedeny na procenta.

### **5.6.6 Stanovení minimální inhibiční koncentrace pro biofilm**

Před vlastním stanovením minimální inhibiční koncentrace pro biofilm (MBIC) byl biofilm narostlý na dně mikrotitračních destiček po 24 hodinové inkubaci zafixován a obarven, a to následujícím způsobem:

- Obsah mikrotitračních destiček byl opatrně vyklepnut do patřičného odpadu
- Do každé jamky bylo napipetováno 280  $\mu$ l fyziologického roztoku (0,9 %) a poté byl obsah opatrně vyklepnut do patřičného odpadu. Toto bylo celkem třikrát zopakováno, a to za účelem vymytí jamek.
- Mikrotitrační destičky se během 5 min nechaly vyschnout.
- Biofilm v každé jamce byl zafixován 100  $\mu$ l metanolu, který se nechal působit po dobu 20 min. Poté byl obsah jamek znovu opatrně vyklepnut do patřičného odpadu.
- Mikrotitrační destičky se po dobu 5 min nechaly vyschnout.
- Biofilm v každé jamce byl obarven 100  $\mu$ l CV, která se nechala působit po dobu 20 min. Poté byl obsah jamek opět opatrně vyklepnut do patřičného odpadu a mikrotitrační destičky byly vymyty vodou pod sprchou.
- Mikrotitrační destičky se během 5 min nechaly vyschnout.
- Do každé jamky bylo napipetováno 100  $\mu$ l etanolu, který zajistil uvolnění CV.

Dále byla změřena absorbance každé mikrotitrační destičky s víčkem při vlnové délce 540 nm. Získané hodnoty byly zprůměrovány pro každou testovanou látku a od průměru byla odečtena absorbance kontroly čistoty. Nakonec byly hodnoty poděleny kontrolou nárůstu a převedeny na procenta.

### **5.6.7 Definice minimálních inhibičních koncentrací**

Získané výsledky byly vyjádřeny pomocí následujících parametrů. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla vyjádřena minimální koncentrací testované látky ( $\mu$ g/ml), která inhibovala  $\geq 80$  % buněk. Minimální inhibiční koncentrace pro biofilm byla definována jako MBIC. Dále byla stanovena inhibiční koncentrace pro 50 % buněk, a to jako IC50 pro inhibici růstu planktonických buněk a BIC50 pro biofilm.

## 6 Výsledky

Látky rostlinného původu (antrachinon-2-karboxylová kyselina, arbutin a hydrochinon) byly testovány proti růstu planktonických buněk a tvorbě biofilmu bakterie *S. aureus* v koncentracích 512 – 1 µg/ml, a to vždy po osmi opakováních pro každý pokus. Celkem byly provedeny 3 pokusy. Pro kontrolu kvality byl použit penicilin.

Přestože MIC všech testovaných látek byla vyšší než nejvyšší testovaná koncentrace 512 µg/ml (tabulka 5), byla u všech testovaných látek zaznamenána inhibiční aktivita proti tvorbě biofilmu (Tabulka 6).

Tabulka 5. Inhibiční koncentrace testovaných látek pro planktonické buňky *S. aureus*

Testovaná látka	MIC (µg/ml)	IC50 (µg/ml)
<b>Antrachinon-2-karboxylová kyselina</b>	>512	256
<b>Arbutin</b>	>512	>512
<b>Hydrochinon</b>	>512	>512
<b>Penicilin</b>	64	64

MIC: minimální inhibiční koncentrace (pro 80 % planktonických buněk); IC50: inhibiční koncentrace (pro 50 % planktonických buněk). Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr z 8 opakování a 3 nezávislých pokusů.

Tabulka 6. Inhibiční koncentrace testovaných látek pro biofilm *S. aureus*

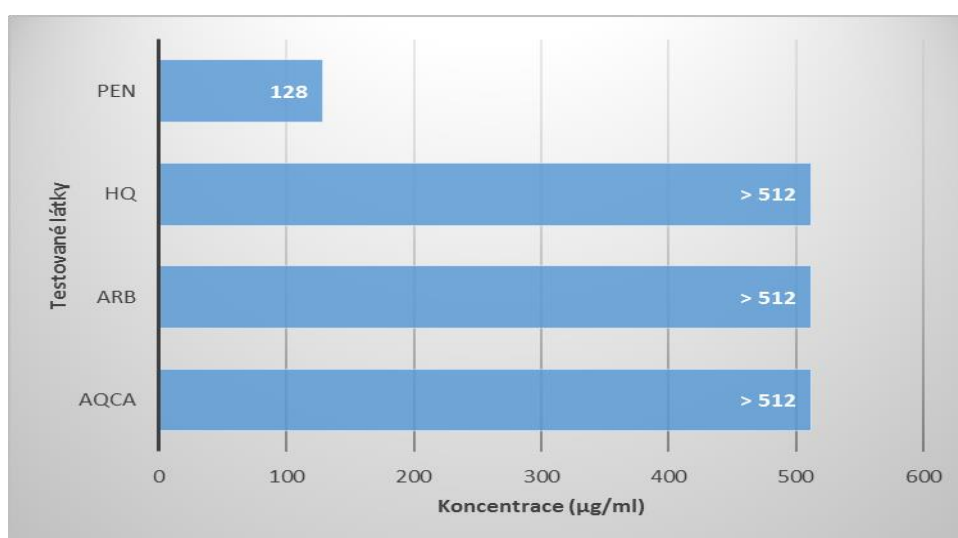
Testovaná látka	MBIC (µg/ml)	BIC50 (µg/ml)
<b>Antrachinon-2-karboxylová kyselina</b>	128	64
<b>Arbutin</b>	128	64
<b>Hydrochinon</b>	128	64
<b>Penicilin</b>	64	64

MBIC: minimální inhibiční koncentrace (pro 80 % biofilmu); BIC50: Minimální inhibiční koncentrace (pro 50 % biofilmu). Hodnoty jsou vyjádřené jako průměr z 8 opakování a 3 nezávislých pokusů.

## 6.1 Přímý Inhibiční efekt testovaných látek na růst planktonických buněk

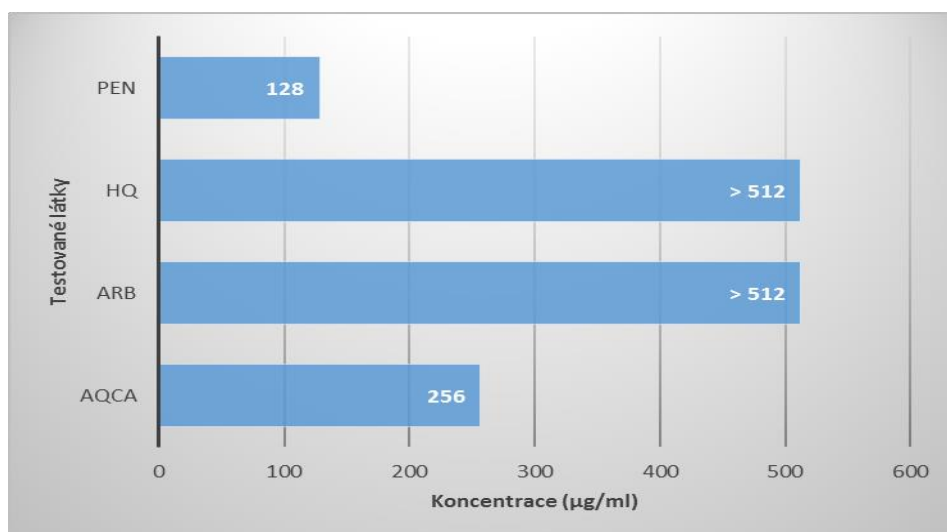
Dle grafu 2 je evidentní, že jediným testovaným chinonem, který vykázal inhibiční efekt proti planktonickým buňkám, byl AQCA, jehož IC<sub>50</sub> je rovna 256 µg/ml (graf 2). Avšak pro všechny testované látky byla zjištěná MIC vyšší než 512 µg/ml (graf 1). Kontrolní antibiotikum, jehož MIC a MBIC dosáhla 64 µg/ml bylo účinnější v inhibici planktonických buněk než testované látky (graf 1 a 2).

Graf 1. MIC testovaných látek



PEN: penicilin; HQ: hydrochinon, ARB: arbutin; AQCA: antrachinon-2-karboxylová kyselina. Inhibiční koncentrace jsou vyjádřené jako průměr z 8 opakování a 3 nezávislých pokusů.

Graf 2. IC<sub>50</sub> testovaných látek

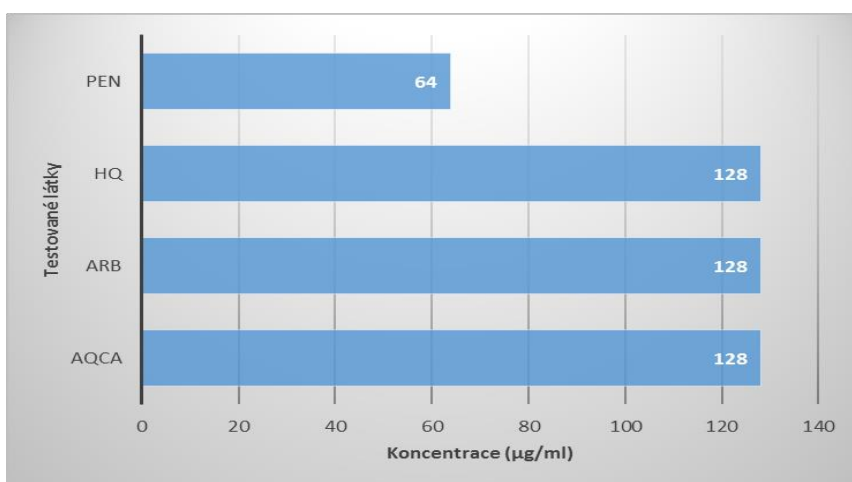


PEN: penicilin; HQ: hydrochinon, ARB: arbutin; AQCA: antrachinon-2-karboxylová kyselina. Inhibiční koncentrace jsou vyjádřené jako průměr z 8 opakování a 3 nezávislých pokusů.

## 6.2 Preventivní inhibiční efekt testovaných látek na růst biofilmu

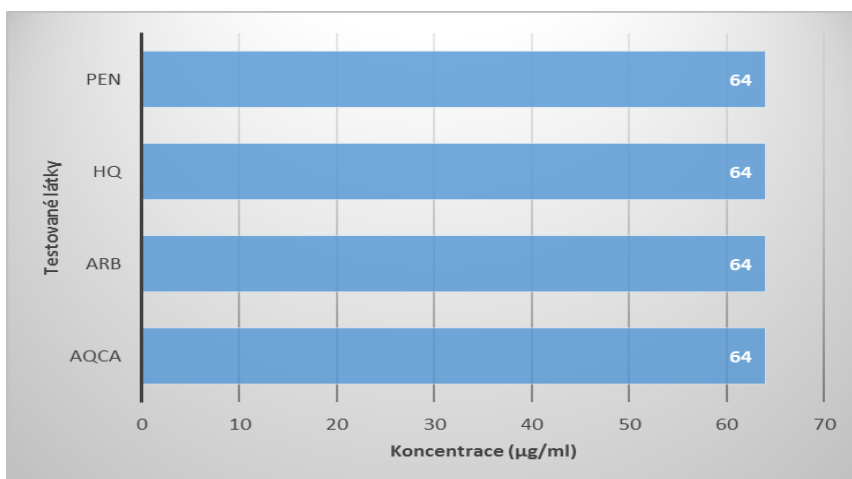
Všechny testované chinony vykazaly stejnou úroveň inhibice tvorby biofilmu *S. aureus*. Jak je vidět na grafu 3, MBIC pro AQCA, ARB a HQ byla 128  $\mu\text{g/ml}$ , zatímco MBIC pro kontrolní antibiotikum byla o jednu koncentraci nižší (64  $\mu\text{g/ml}$ ). Pro BIC50 vykazaly všechny testované látky včetně kontrolního antibiotika stejnou účinnost, a to při koncentraci 64  $\mu\text{g/ml}$  (graf 4).

Graf 3. MBIC testovaných látek



PEN: penicilin; HQ: hydrochinon, ARB: arbutin; AQCA: antrachinon-2-karboxylová kyselina. Inhibiční koncentrace jsou vyjádřené jako modus z 8 opakování a 3 nezávislých pokusů.

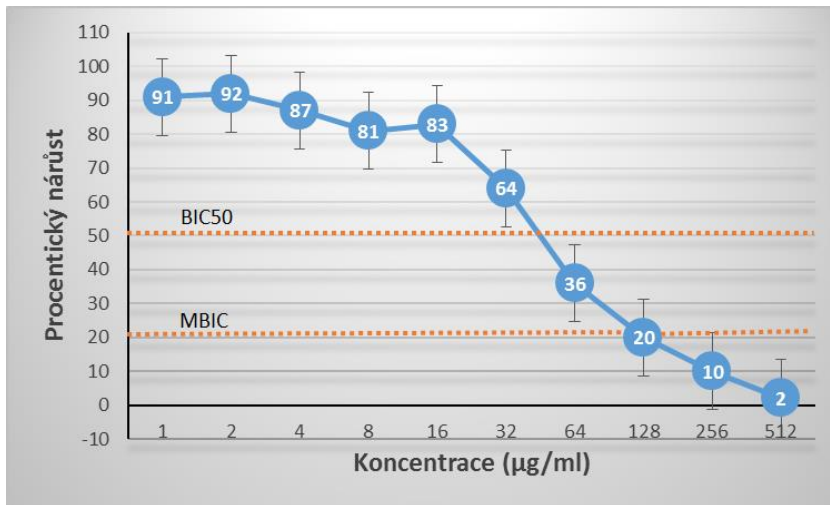
Graf 4. BIC50 testovaných látek



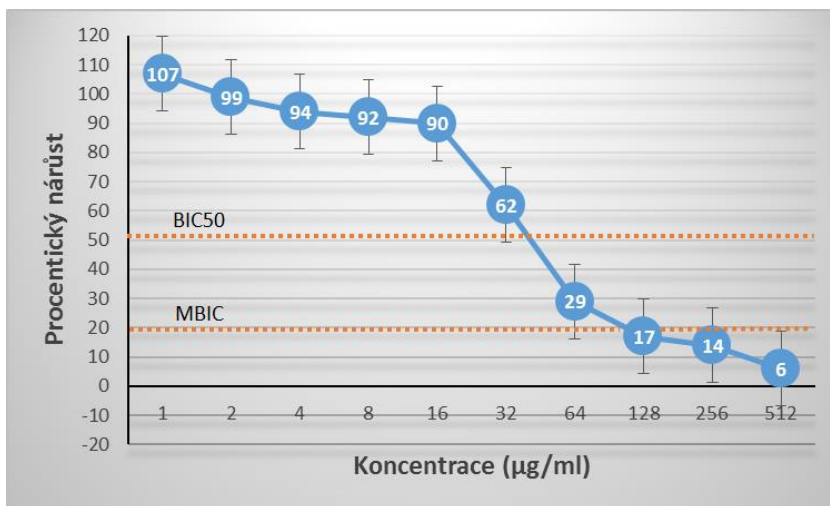
PEN: penicilin; HQ: hydrochinon, ARB: arbutin; AQCA: antrachinon-2-karboxylová kyselina. Inhibiční koncentrace jsou vyjádřené jako modus z 8 opakování a 3 nezávislých pokusů.

V grafu 5 až 7 je znázorněna inhibiční aktivita testovaných látek v závislosti na jejich koncentraci v médiu.

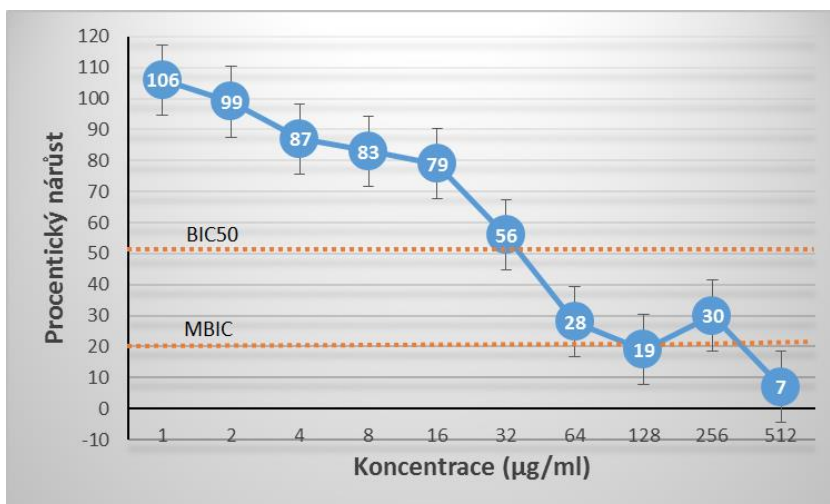
Graf 5. Inhibice tvorby biofilmu *S. aureus* v závislosti na koncentraci antrachinon-2-  
karboxylová kyselina.



Graf 6. Inhibice tvorby biofilmu *S. aureus* v závislosti na koncentraci arbutinu



Graf 7. Inhibice tvorby biofilmu *S. aureus* v závislosti na koncentraci hydrochinonu



## 7 Diskuze

V této diplomové práci byla testována aktivita vybraných rostlinných látek (antrachinon-2-karboxylová kyselina, arbutin a hydrochinon) jak proti růstu planktonických buněk (buněk v tekutém médiu), tak zejména proti biofilmům bakterie *S. aureus* ATCC 29213. V experimentu bylo použito také antibiotika (penicilin), které posloužilo jako srovnávací reference.

Metoda barvení krystalovou violetí, která byla pro kvantifikaci biofilmu v tomto experimentu použita, je metodou velice často používanou pro detekci a kvantifikaci biofilmu. Je v porovnání s jinými metodami levná, časově méně náročná a k její aplikaci není zapotřebí technologií, které by nebyly k dispozici v běžně vybavené laboratoři. Tato metoda je používána pro kvantifikaci biofilmů produkovaných širokým spektrem mikroorganismů. Nevýhodou této metody je však její nízká opakovatelnost a reprodukovatelnost. Důvodem je potřeba přesné manipulace, od přípravy vzorku, přes pipetování, až po vlastní barvení a vymývání mikrotitračních destiček. Druhou nevýhodou této metody je, že neumožňuje rozlišit mezi živými a mrtvými buňkami. Tato skutečnost je důvodem, proč nemůže být metoda, která byla aplikována pro tento experiment, použita pro přímé testování antimikrobiálních látek, tedy pro tzv. citlivostní analýzy. (Peeters a kol., 2008).

Jak ukazuje graf 1, MIC pro všechny testované chinony byla vyšší než nejvyšší testovaná koncentrace (512  $\mu\text{g/ml}$ ). Kontrolní antibiotikum s MIC = 128  $\mu\text{g/ml}$  a IC<sub>50</sub> = 128  $\mu\text{g/ml}$  tedy inhibovalo růst planktonických buněk nejučinněji v porovnání s testovanými chinony. I IC<sub>50</sub> pro arbutin a hydrochinon byla vyšší než nejvyšší testovaná koncentrace (512  $\mu\text{g/ml}$ ). Jediný testovaný chinon s definovanou inhibiční koncentrací byla antrachinon-2-karboxylová kyselina, pro kterou byla IC<sub>50</sub> 256  $\mu\text{g/ml}$ , tedy o jednu koncentraci vyšší než pro kontrolní antibiotikum (graf 2).

Jak ilustruje graf 3, získaná minimální inhibiční koncentrace pro biofilm (MBIC) byla pro všechny testované chinony (AQCA, ARB a HQ) 128  $\mu\text{g/ml}$ , kdežto pro kontrolní antibiotikum byla MBIC o jednu koncentraci nižší (64  $\mu\text{g/ml}$ ). V případě BIC<sub>50</sub> však došlo u všech testovaných chinonů k poklesu účinné inhibiční koncentrace, a to na 64  $\mu\text{g/ml}$  (graf 4). Tím se testované chinony dostaly na stejnou úroveň inhibice tvorby biofilmu *S. aureus* jako kontrolní antibiotikum penicilin. To je důkazem ověření hypotézy, jelikož preventivní inhibiční aktivita proti tvorbě biofilmu je srovnatelná s penicilinem, který sice nejlépe

inhiboval růst planktonických buněk, avšak jeho antibiofilmová aktivita se téměř neliší od testovaných rostlinných látek.

Z výsledků vychází jako neúčinnější inhibitor růstu planktonických buněk antrachinon-2-karboxylová kyselina, která mezi testovanými chinony, jako jediná, vykázala inhibiční efekt při koncentraci nižší než 512 µg/ml, jak ilustruje graf 2. V tomto případě byla IC<sub>50</sub> pro AQCA rovna 256 µg/ml. Navíc je třeba vzít v potaz nízkou rozpustnost AQCA, se kterou jsem se setkal při přípravě jejího zásobního roztoku. Po přípravě zásobního roztoku totiž dochází k velice rychlé zpětné agregaci částic AQCA i po použití ultrazvukové lázně a přidání emulgujícího přípravku Tween 80, který usnadňuje tvorbu suspenze. To byl také důvod, proč došlo k vysrážení AQCA na dně jamek mikrotitračních destiček. Bohužel neexistuje vědecká studie, která by se hlouběji zabývala rozpustností AQCA a která by popisovala metodu na přípravu vyšších koncentrací než 2,7 µg/ml (Tsai a kol. 1993). Avšak i přes negativní zkušenost s rozpustností této látky bylo pokračováno v pokusu, jelikož tato látka vykazovala nejvyšší inhibiční aktivitu proti růstu planktonických buněk ze všech tří testovaných chinonů. Díky této skutečnosti je možné se domnívat, že připravená ředící řada pro AQCA neodpovídala předpokládaným koncentracím. To znamená, že reálná koncentrace byla pravděpodobně nižší než předpokládaná. Proto lze usuzovat, že AQCA by ve skutečnosti mohla být mnohem účinnější, než jak je uvedeno ve výsledcích. Je tedy velice pravděpodobné, že kvůli problematické rozpustnosti došlo k ovlivnění výsledku pokusu. Nalezení metody umožňující připravit dostatečně vysokou a přesnou koncentraci by mohlo napomoci uplatnění AQCA jako antimikrobiální látky v praxi.

Bohužel nelze porovnat získané výsledky s jinými pracemi zabývajícími se studiem inhibiční aktivity stejných látek proti stafylokokovým biofilmům. Proto jsou zde pro porovnání uvedeny práce, v nichž byla evaluovaná inhibiční aktivita látek strukturně podobných jako v této práci či látek stejných, avšak inhibujících biofilmy jiných druhů bakterií.

Alizarin (1,2-dihydroxyantrachinon) strukturně velice podobný AQCA vykázal účinnou inhibici tvorby biofilmu při koncentraci 10 µg/ml. Společně s alizarinem byla prokázána inhibiční aktivita proti *S. aureus* i pro purpurin (1,2,4-Trihydroxyantrachinon) a chinalizarin (1,2,5,8-tetrahydroxyantrachinone), oba ze skupiny antrachinonů. Autoři této studie vysvětlují vysokou účinnost těchto derivátů antrachinonu přítomností hydroxylové skupiny na 1. a 2. uhlíku, jelikož ostatní testované antrachinony nesly hydroxylovou skupinu na jiném uhlíku, anebo ji neobsahovaly vůbec (Lee a kol. 2016). Toto zjištění trochu modifikuje

tvrzení, že zásadní je pro antimikrobiální aktivitu chinonů počet uhlíků (Riffelen a kol., 2002). Toto by mohlo vysvětlovat relativně nízkou inhibiční aktivitu AQCA, jelikož tato molekula neobsahuje hydroxylové skupiny, nýbrž jen jednu karboxylovou. Szegediové (2015) testovala inhibiční aktivitu emodinu (strukturně podobného AQCA) proti planktonickým buňkám i biofilmu bakterie *S. aureus* a naměřila hodnotu MIC 128  $\mu\text{g/ml}$  a MBIC 128 mg. Přestože emodin obsahuje více hydroxylových skupin než AQCA, tak u něj nebyla prokázána vyšší inhibiční aktivita proti tvorbě biofilmu. Výsledky Szegediové (2015) a fakt, že všechny testované chinony v této diplomové práci vykazaly téměř stejný stupeň inhibiční aktivity, jsou v rozporu s tvrzením Riffela a kol. (2002), dle něhož by nejvyšší inhibiční efekt měla vykazat látka s největším počtem hydroxylových skupin. Proto se zdá být poloha hydroxylových skupin na antrachinonovém řetězci jedním z důležitých parametrů ovlivňujících antibakteriální a antibiofilmovou aktivitu antrachinonových derivátů.

Kim a kol. (2010) testoval hydrochinon proti *S. aureus* KCTCT1927 za použití diskové diluční metody. Jím získaná hodnota MIC 64  $\mu\text{g/ml}$  prokazuje inhibiční aktivitu proti růstu bakterie *S. aureus*, přestože mnou naměřená MIC byla vyšší než 512  $\mu\text{g/ml}$ . Důvodem rozdílných výsledků je však odlišný kmen bakterie a metoda, kterou Kim a kol. (2010) použily. Tert-butyhydrochinon (TBHQ), používaný jako potravinový konzervant, a jeho produkt tert-butybenzochinon (TBBQ) jsou deriváty hydrochinonu. Jejich antimikrobiální aktivita byla evaluována ve studii Ooi a kol. (2013), a to jak proti planktonickým buňkám, tak proti tvorbě biofilmu. Zde byla naměřena hodnota MIC 16  $\mu\text{g/ml}$  a MBIC 64  $\mu\text{g/ml}$ . V tomto případě byl v pokusu použit shodný kmen *S. aureus* ATCC 29213. Kromě antioxidační aktivity TBBQ se dále vyznačuje schopností zabíjet pomalu rostoucí či nerostoucí buňky, tím že naruší permeabilitu jejich membrány. TBBQ dále působí synergicky s gentamycinem (Ooi a kol., 2016). Z toho vyplývá, že jak hydrochinon, tak jeho deriváty se zdají být účinné jako antibakteriální a antibiofilmové agens.

Intenzita antibakteriálního účinku arbutinu závisí na stupni hydrolýzy této molekuly v prostředí. Podmínkou pro pozitivní terapeutický efekt je rozštěpení molekuly arbutinu na účinný hydrochinon a glukózu (Jahodář a kol., 1985). To je v souladu s výsledky této diplomové práce, jelikož hydrochinon a arbutin vykazaly naprosto stejnou inhibiční aktivitu pro všechny zjišťované parametry (graf 1 – 4). Proto lze předpokládat, že během inkubace došlo k hydrolýze molekul arbutinu na hydrochinon. Qin a kol. (2014) také vyhodnotil, že arbutin a hydrochinon vykazují naprosto stejné inhibiční účinky. V tomto případě však byla zjišťována tyrozinázová aktivita.



Vzhledem k tomu, že se nepodařilo stanovit minimální inhibiční koncentraci proti planktonickým buňkám a že byla testována jen preventivní aktivita chinonů proti tvorbě biofilmu, se nedá předpokládat, že by tyto látky měly výrazný účinek proti již vytvořenému biofilmu. Přesto by jistým způsobem mohlo být možné využít tyto látky jako inhibitory Quorum-sensing, jehož správné fungování je nezbytné pro započetí tvorby biofilmu. Vodítkem k tomuto tvrzení by mohlo být zjištění Rasmussena (2005), který ověřil, že p-benzochinon, strukturně blízký hydrochinonu, lze uplatnit jako inhibitor QS a tím potlačit tvorbu biofilmu.

## 8 Závěr

V této práci byla stručně popsána patogenní bakterie *S. aureus*, schopna tvorby biofilmu, a důsledky jejího působení na lidský organismus a zařízení zejména v potravinářském průmyslu. V praktické části této práce byla zhodnocena inhibiční aktivita testovaných látek rostlinného původu (chinonů), které byly vybrány na základě jejich, již prokázané či předpokládané, antimikrobiální aktivity.

Kromě penicilinu, byla antrachinon-2-karboxylová kyselina vyhodnocena jako neúčinnější z testovaných látek proti planktonickým buňkám. V případě preventivního účinku proti tvorbě biofilmu vykázaly všechny testované chinony stejný stupeň inhibice. Hypotéza byla tedy potvrzena, jelikož všechny testované látky ve finále inhibovaly tvorbu bakteriálního biofilmu podobně jako penicilin.

Vzhledem k tomu, že se nepodařilo stanovit minimální inhibiční koncentraci proti planktonickým buňkám a že byla testována jen preventivní aktivita chinonů proti tvorbě biofilmu, se nedá předpokládat, že by tyto látky měly výrazný účinek proti již vytvořenému biofilmu. Přesto by jistým způsobem mohlo být možné využít tyto látky jako inhibitory Quorum-sensing. Dále se jako potenciální možnost jeví využití synergických účinků testovaných látek mezi sebou či s jinými antimikrobiálními látkami za účelem zvýšení účinnosti jejich aplikace.

## 9 Literární zdroje

- Abedon, S. T. 2015. Ecology of Anti-Biofilm Agents II: Bacteriophage Exploitation and Biocontrol of Biofilm Bacteria. *Pharmaceuticals*. 8 (3). 559-589.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L. Costerton, J. W. 2012. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*. 33 (26). 5967-5982.
- Asad, S, Opal, S. M. 2008. Bench-to-bedside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. *Critical Care*. 12. 236. 1-11.
- Asao, T., Kumeda, Y. Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozaki, S. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the indiscriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*. 130 (1). 311-314.
- Augustin, M., Ali-Vehmas, T., Atroshi, F. 2004. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 7(1). 55–64.
- Bang, S. H., Han, S. J., Kim, D. H. 2008. Hydrolysis of arbutin to hydroquinone by human skin bacteria and its effect on antioxidant activity. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 7 (3). 189-93.
- Barsoumian, A. E., Mende, K., Sanchez, C. J., Beckius, M. L., Wenke, J. C., Murray, C. K., Akers, K. S. 2015. Clinical infectious outcomes associated with biofilm-related bacterial infections: a retrospective chart review. *BMC Infectious Diseases*. 15 (223). 1-7.
- Bassler, B. L. 2002. Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Cell*. 109 (4). 421-424.
- Blaschek, H., Wang, H., Agle, M (eds.). *Biofilm in the food environment*. Blackwell Publishing Professional. Ames. 194 s. ISBN: 978-0-8138-2058-3.
- Boles, R. B., Horswill, A. R. 2011. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in Microbiology*. 19 (9). 449-455.
- Bremer, P., Seale, B., Flint, S., Palmer, J. 2009. Biofilm in dairy processing. In: Fratamico, P. M., Annous, B. A., Gunther, N. W. (eds.). *Biofilms in the food and beverage industries*. CRC Press. Boca Raton. s. 396-431. ISBN: 978-1-84569-477-1.
- Bryers, J. D., Ratner, B. D. 2004. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. *ASM News-American Society for Microbiology*. 70 (5). 232-232.
- Carpentier, B. 2009. Biofilms in red meat processing. In: Fratamico, P. M., Annous, B. A., Gunther, N. W. (eds.). *Biofilms in the food and beverage industries*. CRC Press. Boca Raton. s. 375-395. ISBN: 978-1-84569-477-1.
- Chaibenjwong, P., Foster, S. J. 2011. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Archives of Microbiology*. 193 (2). 125-135.

- Chambers, H. F. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerging Infections Diseases. 7 (2). 178-82.
- Chemat, F., Zill-e-Huma, Khan, M. K. 2011. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. Ultrasonics Sonochemistry. 18 (4). 813-835.
- Christensen, G. D., Sipson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., Beachey, E. H. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. Journal of clinical Microbiology. 22 (6). 996-1006.
- Cloete, E., Van Der Merwe, A., Richards, M. 2009. Biofilms in the food and beverage industries: an introduction. In: Fratamico, P. M., Annous, B. A., Gunther, N. W. (eds.). Biofilms in the food and beverage industries. CRC Press. Boca Raton. s. 3-41. ISBN: 978-1-84569-477-1.
- CLSI. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory institute. Wayne. ISBN: 1-56238-988-2.
- CLSI. 2013. Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute. ISBN: 1-56238-898-3.
- Cowan, M. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews. 12 (4). 564-582.
- Di Ciccio, P., Vergara, A., Festino, A. R., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A. 2015. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. Food Control. 50. 930-936.
- Donlan, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging Infectious Diseases. 8 (9). 881-90.
- Elchinger, P. H., Delattre, C., Faure, S., Roy, O., Badel, S., Bernardi, T., Taillefumer, C. Michaud, P. (2014). Effect of proteases against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Letters in applied microbiology, 59 (5). 507-513.
- Flemming, H. C. 2002. Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures. Applied Microbiology and Biotechnology. 59 (6). 629-640.
- Flemming, H. C., Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology. 8 (9). 623-33.
- Forsythe, S. J. 2010. The Microbiology of Safe Food. Wiley-Blackwell. 496 s. ISBN: 978-1-4051-4005-8. 295-297.
- Gupta, D., Dubey, J., Kumar, M. 2016a. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of some medicinal plants against selected common human pathogenic microorganisms. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 6 (1). 15-20.

- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., Tribedi, P. 2016b. Biofilm, pathogenesis and prevention – a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*. 198 (1). 1-15.
- Gustafson, J. E., Muthaiyan, A., Dupre, J. M., Ricke, S. C. 2014. *Staphylococcus aureus* and understanding the factors that impact enterotoxin production in foods: A review. *Food Control*. 2014: 1-14. (in press)
- Gyawali, R., Ibrahim, S. A. 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*. 46. 412-429.
- Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., Iqbal, M. 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 15(4). 305-311.
- Hoffman-Ostenhof, O. 1947. Mechanism of the Antibiotic Action of Certain Quinones. *Science*. 105 (2734). 549-550.
- Hoiby, N. 2014. A personal history of research on microbial biofilm and biofilm infections. *Pathogens and Disease*. 70 (3). 205-211.
- Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 35 (4). 322-332.
- Huseby, M. J., Kruse, A. C., Digre, J., Kohler, P. L., Vocke, J. A., Mann, E. E., Bayles, W. K., Bohach, G. A., Schlievert, P. M., Ohlendorf, D. H., Earhart, C. A., Novick, R. P. 2010. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *National Academy of Science*. 107 (32). 14407-14412.
- Jahodář, L., Jílek, P., Pátková, M., Dvořáková, V. 1985. Antimikrobiální působení arbutinu a extraktu z listů medvědice léčivé in vitro. *Československá farmacie*. 34 (5). 174-178.
- Jedsadayamata, A. 2005. In Vitro Antiglycation Activity of Arbutin. *Naresuan University Journal*. 13(2). 35-41.
- Johansen, C., Falholt, P., Gram, L. 1997. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (9). 3724-3728.
- Kiedrowski, M. R., Horswill, A. R. 2011. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 11 (1241). 104-121.
- Kim, M. H., Jo, S. H., Ha, K. S., Song, J. H., Jang, H. D., Kwon, Y. I. 2010. Antimicrobial activities of 1,4-benzoquinones and wheat germ extract. *Journal of Microbiology and biotechnology*. 20(8). 1204-9.
- Kirby, W. M. 1944. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant *Staphylococci*. *Science*. 99: 2579. 452-453.
- Lai, J. S., Lin, C. C., Chiang, T. M. Tyrosinase inhibitory activity and thermostability of the flavonoid complex form *Sophora japonica* L (Fabaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 13 (2). 243-247.

- Langdon-Jones, E. E., Pope, S. J. A. 2014. The coordination chemistry of substituted anthraquinones: Developments and applications. *Coordination Chemistry Reviews*. 269: 32-35.
- Langsrud, S. 2009. Biofilm Formation by Gram-positive Bacteria Including *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium avium* and *Enterococcus* spp. In *Food processing environments*. In: Fratamico, P. M., Annous, B. A., Gunther, N. W. (eds.). *Biofilms in the food and beverage industries*. CRC Press. Boca Raton. s. 250-269. ISBN: 978-1-84569-477-1.
- Le, K. Y., Otto, M. 2015. Quorum-sensing regulation in staphylococci – an overview. *Front. Microbiol.* 6 (1174). 1-9.
- Lee, J. H., Kim, Y. G., Yong, R. S., Lee, J. 2016. Calcium-chelating alizarin and other anthraquinones inhibit biofilm formation and the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*. 6: 19267.
- Mack, W. N., Mack, J. P., Ackerson, A. O. 1975. Microbial Film Development in a Trickling Filter. *Microbial Ecology*. 2 (3). 215-226.
- Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R., Endres, J. L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L. H., Smeltzer, M. S., Horswill, A. R., Bayles, K. W. 2009. Modulation of eDNA release and Degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS ONE*. 4 (6). e5822.
- Marshall, J. H., Wilmoth, G. J. 1981. Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids. *J. Bacteriol.* 147 (3). 900-913.
- McCallum, N., Berger-Bachi, B., Senn, M. M. 2010. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*. 300 (2). 118-129.
- Meyer, B. 2003. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 51 (4). 249-253.
- Monroe, D. 2007. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *Biochemistry and Molecular Biology*. 5 (11). 2458-2461.
- Noble, W. C., Valkenburg, H. A., Wolters, C. H. L. 1967. Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. *The Journal of Hygiene*. 65 (4). 567-573.
- Ogston, A., Witte, W. 1984. On Abscesses. *Reviews of infectious diseases*. 6 (1). 122-128.
- Okshevsky, M., Reina, V. R., Meyer, R. L. 2015. Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Current opinion in biotechnology* 33. 73-80.
- Omojate, G. C., Enwa, F. O., Jewo, A. O., Eze, C. O. 2014. Mechanisms of Antimicrobial Actions of Phytochemicals against Enteric Pathogens – A Review. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. 2 (2). 77-85.
- Ooi, N., Chopra, I., Eady, A., Cove, J., Bojar, R., O'Neill, A. J. 2013. Antibacterial activity and mode of action of tert-butylhydroquinone (TBHQ) and its oxidation product, tert-butylbenzoquinone (TBBQ). *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*. 68(6). 1297-304.

- Ooi, N., Eady, E. A., Cove, J. H., O'Neil, A. J. 2016. Tert-butyl benzoquinone: mechanism of biofilm eradication and potential for use as a topical antibiofilm agent. *Journal of Antimicrobial chemotherapy*. ISSN 0305-7453. (in press)
- Otto, M. 2008. Staphylococcal biofilm. In: Romeo, T (ed.). *Bacterial Biofilms*. Springer-Verlag. Berlin. 207-228. ISBN: 978-3-540-75418-3.
- Pawsey, R. K. 2002. *Cases Studies in Food Microbiology for Food Safety and Quality*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 494 s. ISBN: 0-85404-626-7. 349.
- Peeters, E., Nelis, H. J., Coenye, T. 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*. 72 (2). 157-165.
- Pop, C., Vlase, L., Tamas, M. 2009. Natural Resources Containing Arbutin. Determination of Arbutin in the Leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. Acclimated in Romania. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*. 37 (1). 129-132.
- Qin, L., Wu, Y., Liu, Y., Chen, Y., Zhang, P. 2014. Dual effects of alpha-arbutin on monophenolase and diphenolase activities of mushroom tyrosinase. *PLoS ONE*. 9 (10). 1-7.
- Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M. E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kote, M., Nielsen, J., Eberl, L., Givskov, M. 2005. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol*. 187. 1799–1814.
- Ray, B., Bhunia, A. 2014. *Fundamental food microbiology*. CRC Press. Boca Raton. 663 s. ISBN: 978-1-4665-6443-5.
- Rewatkar, A. R., Wadher, B. J. 2013. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* – Biofilm formation Methods. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 8 (5). 36-40.
- Riffel, A., Medina, L. F., Stefani, V., Santos, R. C., Bizani, D., Brandelli, A. 2002. In vitro antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 35 (7). 811-818.
- San Marco Growers. *Bergenia crassifolia* - Winter Blooming Bergenia [online]. 2001. [cit. 2016-03-04]. Dostupné <Z [http://www.smgrowers.com/products/plants/plantdisplay.asp?plant\\_id=250](http://www.smgrowers.com/products/plants/plantdisplay.asp?plant_id=250)>.
- Sher, A. 2009. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. *Gomal Journal of Medical Sciences*. 7 (1). 72-78.
- Shi, X., Zhu, X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*. 20 (9). 407-413.
- Schindler, J. 2008. *Ze života bakterií*. ACADEMIA. Praha. 61-73 s. ISBN: 978-80-200-1666-9.
- Sigma-Aldrich. Anthraquinone-2-carboxylic acid [online]. 2016a [cit. 2016-03-04]. Dostupné z <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/252727?lang=en&region=CZ>>.

Sigma-Aldrich. Arbutin [online]. 2016b [cit. 2016-03-04]. Dostupné z <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/arbutin2722549776711?lang=en&region=CZ>>.

Sigma-Aldrich. Hydroquinone [online]. 2016c [cit. 2016-03-04]. Dostupné z <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/hydroquinone1101112331911?lang=en&region=CZ>>.

Silbergeld, E. K., Davis, M., Leibler, J. H., Peterson, A. E. 2008. One reservoir: redefining the community origins of antimicrobial-resistant infections. *Medical Clinics of North America*. 92 (6). 1391-1407.

Sillankorva, S., Azeredo, J. 2014. Bacteriophage Attack as an Anti-biofilm Strategy. In: Donelli, G. (ed.). *Microbial Biofilms Methods and Protocols*. Human Press. London. s. 287-298. ISBN: 978-1-4939-0466-2.

Simoos, M., Simoos, L. C., Vieira, M. J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT – Food Science and Technology*. 43 (2010). 573-583.

Singh, A. S. 2014. *Herbal drugs as Therapeutic Agents*. CRC Press. Boca Raton. 163 s. ISBN: 978-1-4665-9861-4.

Sleiniute, J., Siugzdaite, J. 2015. Distribution of coagulase-positive staphylococci in humans and dogs. *Acta Veterinaria Brno*. 84 (4). 313-320.

Smith, J., Fratamico, P. M., Uhlich, G. 2009. Molecular mechanisms involved in biofilm formation by food-associated bacteria. In: Fratamico, P. M., Annous, B. A., Gunther, N. W. (eds.). *Biofilms in the food and beverage industries*. CRC Press. Boca Raton. s. 42-98. ISBN: 978-1-84569-477-1.

Somerville, G. A., Proctor, R. A. 2009. The biology of Staphylococci. In: Crossley, K. B., Jefferson, K. K., Arcger, G. L., Fowler, V. G. (eds). *Staphylococci in Human Disease: Second Edition*. Blackwell Publishing. Chichester. s. 3-18. ISBN: 978-1-44430-846-4.

Sutherland, I. W. 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. 9 (5). 222-227.

Srey, S., Jahid, I. K., Ha S.-D. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*. 31 (2). 572-585.

Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiologica Methods*. 40 (2). 175-179.

Sternberg, C., Bjarnsholt, T., Shirtliff, M. 2014. Methods for Dynamic Investigations of Surface-Attached In Vitro Bacterial and Fungal Biofilms. In: Donelli, G. (ed.). *Microbial Biofilms Methods and Protocols*. Human Press. London. s. 3-22. ISBN: 978-1-4939-0466-2.

Stewart, P. S. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int. J. Med. Microbiol.* 292. 107-113.



Storgards, E. 2009. Biofilms and brewing. In: Fratamico, P. M., Annous, B. A., Gunther, N. W. (eds.). Biofilms in the food and beverage industries. CRC Press. Boca Raton. s. 432-454. ISBN: 978-1-84569-477-1. p. 432-454.

Szegediová, B. 2015. Vliv rostlinných chinonů na tvorbu biofilmů u vybraných patogenních potravinových mikroorganismů. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 66 s.

Šťastková, Z., Karpíšková, R., Borkovcová, I. 2012. Možnosti detekce stafylokokových enterotoxinů. Chemické listy. 106. 745-749.

Tan, S. Y., Chew, S. C., Givskov, M., Yang, L. 2014. Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilms. Current Opinion in Biotechnology. 26. 1-6.

Tiemersma, E. W., Bronzwaer, S. L., Lyytikäinen, O., Degener, J. E., Schrijnemakers, P., Bruinsma, N., Monen, J., Witte, W., Grundmann, H. 2004. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe, Emerging Infectious Diseases. 10 (9). 1627-34.

Tsai, S.-Y., Kuo, S.-C., Lin, S.-Y. 1993. Physicochemical Characterization of 9,10-Anthraquinone 2-Carboxylic Acid. Journal of Pharmaceutical Sciences. 82 (12). 1250-1254.

Van Houdt, R. Michiels, C. W. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. Journal of Applied Microbiology. 109 (4). 1117-1131.

Whitehead, K. A., Verran, J. 2015. Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. Current Opinion in Food Science. 2. 84-91.

WK Lab. Seahorse XFe96 [online]. 2016. [cit. 2016-02-25]. Dostupné z <<http://www.wklab.org/instrument-booking/seahorse-bioanalyzer/>>.

## 10 Seznam zkratek

AQCA: Antrachinon-2-karboxylová kyselina

ARB: Arbutin

ATB: Antibiotika

$A_w$ : Vodní aktivita

CV: Krystalová violet

Da: Dalton

DMSO: Dimetylsulfoxid

DNase: Deoxyribonukleáza

eDNA: Extracelulární DNA

EPS: Extracelulární polymerické sloučeniny

HQ: Hydrochinon

MBIC: Minimální inhibiční koncentrace pro biofilm

McF: McFarland

MIC: Minimální inhibiční koncentrace

MO: Mikroorganismus

MRSA: Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

OCT: Optická koherenční tomografie

OD: Optická denzita

QS: Quorum-sensing

SE: Stafylokokové enterotoxiny

TBBQ: tert-butylbenzochinon

TBHQ: Tert-butylhydrochinon

UV: Ultrafialové záření

## 11 Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázek 1. Fáze tvorby biofilmu .....	22
Obrázek 2. Biofilm <i>S. aureus</i> .....	22
Obrázek 3. Vzorec AQCA .....	35
Obrázek 4. Vzorec arbutinu .....	35
Obrázek 5. Bergerie tučnolistá.....	35
Obrázek 6. Vzorec hydrochinonu .....	36
Obrázek 7. Design experimentu.....	40
Tabulka 1. Vnější faktory ovlivňující růst <i>S. aureus</i> .....	13
Tabulka 2. Vnější faktory ovlivňující produkci enterotoxinů.....	16
Tabulka 3. Zastoupení složek v materii biofilmu .....	19
Tabulka 4. Důležité faktory ovlivňující adhezi buněk k povrchu.....	20
Tabulka 5. Inhibiční koncentrace testovaných látek pro planktonické buňky <i>S. aureus</i> .....	43
Tabulka 6. Inhibiční koncentrace testovaných látek pro biofilm <i>S. aureus</i> .....	43
Graf 1. MIC testovaných látek.....	44
Graf 2. IC50 testovaných látek .....	44
Graf 3. MBIC testovaných látek .....	45
Graf 4. BIC50 testovaných látek.....	45
Graf 5. Inhibice tvorby biofilmu <i>S. aureus</i> v závislosti na koncentraci antrachinon-2- karboxylová kyselina. ....	46
Graf 6. Inhibice tvorby biofilmu <i>S. aureus</i> v závislosti na koncentraci arbutinu .....	46
Graf 7. Inhibice tvorby biofilmu <i>S. aureus</i> v závislosti na koncentraci hydrochinonu .....	46