

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Aktivita konopné silice proti stafylokokovým biofilmům

Diplomová práce

Bc. Kateřina Jamborová
Výživa a potraviny

Ing. Pavel Nový, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Aktivita konopné silice proti stafylokokovým biofilmům" jsem vypracoval(a) 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(ka) uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 27.4.2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Pavlu Novému Ph.D., vedoucímu mé diplomové práce, za jeho cenné rady a trpělivost při vedení mé práce. Rovněž bych chtěla poděkovat za vstřícnost a pomoc při získání potřebných informací a podkladů a za čas, který mi věnoval.

Aktivita konopné silice proti stafylokokovým biofilmům

Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo stanovit minimální inhibiční koncentraci a bakteriální inhibiční koncentraci samostatného tetracyklinu a konopné silice získané z Cannabis Nurse Jackie a vyhodnotit jejich vzájemné účinky při jejich vzájemné kombinaci proti planktonickým buňkám a biofilmu *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

Testování probíhalo kultivací na 96jamkových mikrotitračních destičkách při počátečních koncentracích u samostatně testovaného tetracyklinu 512 $\mu\text{g/ml}$ a konopné silice 1024 $\mu\text{g/ml}$. U kombinace konopné silice a tetracyklinu byly pro minimální inhibiční koncentraci použity počáteční koncentrace u tetracyklinu 2048 $\mu\text{g/ml}$ a konopné silice 1024 $\mu\text{g/ml}$. Pro zjištění hodnoty biofilmové inhibiční koncentrace byly použity počáteční koncentrace u tetracyklinu 1 $\mu\text{g/ml}$ a konopné silice 256 $\mu\text{g/ml}$.

U samostatně působícího tetracyklinu byla minimální inhibiční koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$ a biofilmová inhibiční koncentrace 0,25 $\mu\text{g/ml}$. U samostatně působící konopné silice byla minimální inhibiční koncentrace vyšší než nejvyšší testovaná koncentrace 1024 $\mu\text{g/ml}$ a biofilmová inhibiční koncentrace u konopné silice byla 32 $\mu\text{g/ml}$. U kombinace tetracyklinu a konopné silice byla minimální inhibiční koncentrace určena při koncentraci tetracyklinu 2 $\mu\text{g/ml}$ a konopné silice 8 $\mu\text{g/ml}$. Biofilmová inhibiční koncentrace u kombinace těchto dvou látek byla stanovena pro koncentrace 0,5 $\mu\text{g/ml}$ u tetracyklinu a 2 $\mu\text{g/ml}$ u konopné silice.

Kombinace těchto dvou testovaných látek působila antagonisticky. Za antagonistický účinek mohla nejspíše konopná silice, která svým působením na membrány bakteriální buňky *S. aureus* snižovala antibakteriální účinky tetracyklinu.

Klíčová slova: antibakteriální, antimikrobiální, *Cannabis*, *Staphylococcus aureus*, synergie

Activity of hemp essential oil against staphylococcal biofilms

Summary

A goal of this diploma thesis was to determine a minimum inhibitive concentration and a bacterial inhibitive concentration of a separated tetracycline and a hemp essence gained from Cannabis Nurse Jackie and evaluate their mutual effects in their mutual combinations against planktonic cells and a biofilm of *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

The testing was processed by a cultivation in a 96wells microplates at an initial concentration of a separately tested tetracycline 512 µg/ml and the hemp essence 1024 µg/ml.. For a combination of the hemp essence and the tetracycline were used used initial concentrations of the tetracycline 2048 µg/ml and the hemp essence 1024 µg/ml. For the finiding out of a value of the biofilm inhibitive concentration were used initial concentrations of the tetracycline 1 µg/ ml and of the hemp essence 256 µg/ml.

For the individually working tetracycline was the minimum inhibitive concentration 1 µg/ml and the biofilm inhibitive concentration 0,25 µg/ml. For the individually working hemp essence was the minimum inhibitive concentration higher than the highest tested concentration 1024 µg/ml and the biofilm inhibitive concentration of the hemp essence was 32 µg/ml. For the combination of the tetracycline and the hemp essence was the minimum inhibitive concentration specified during the concentration of the tetracycline 2 µg/ml and the hemp essence 8 µg/ml. The biofilm inhibitive concentration for the combination of these two agents was set 0,5 µg/ml for concentration of tetracycline and 2 µg/ml for the concentration of the hemp essence.

A combination of these two tested agents was working antagonistically. The antagonistic effect was probably caused by the hemp essence, which was decreasing antibacterial effects of tetracycline by the impact on membrane of *S. aureus* bacterial cells.

Keywords: antibacterial, antimicrobial, *Cannabis*, *Staphylococcus aureus*, synergy

Obsah

Úvod.....	9
1. Literární rešerže	12
1.1 Biofilm	12
1.1.1 Charakterizace biofilmu.....	12
1.1.1.1 Tvorba biofilmu	13
1.1.1.2 Quorum sensing	14
1.1.1.3 Biofilmy v potravinách a potravinářství	15
1.1.1.4 Biofilmy ve zdravotnictví.....	17
1.1.2 Staphylococcus aureus	17
1.1.2.1 Toxiny produkované <i>S. aureus</i>	18
1.1.2.1 Vznik rezistence.....	19
1.1.3 Vybrané alternativní metody inhibice biofilmů	20
1.1.3.1 Inhibitory Quorum Sensing	20
1.1.3.2 Bakteriociny.....	21
1.1.3.3 Bakteriofágy	22
1.1.3.3 Enzymy	23
1.1.3.4 Biosurfaktenty.....	24
1.1.3.5 Antimikrobiální povrchy.....	25
1.1.3.6 Rostlinné silice.....	25
1.2 Cannabis sativa L.	29
1.2.1 Charakteristika	29
1.2.2 Složení bioaktivních látek	30
1.2.2.1 Kanabinoidy.....	31
1.2.3 Antimikrobiální účinky	32
2 Metodika	33
2.1 Použité bakterie, rostlinné materiály, chemikálie a přístroje	33
2.1.1 Použité bakterie	33
2.1.2 Použité chemikálie	33
2.1.3 Použité přístroje	33
2.1.4 Příprava médií.....	33
2.1.5 Extrakce silice.....	34
2.1.6 Kultivace bakteriálního biofilmu	34
2.1.6.1 Příprava inokula	34
2.1.6.2 Příprava antibiotika a konopné silice	34

2.1.6.3	Příprava pro stanovení hodnoty MIC u <i>S. aureus</i> při synergickém působení tetracyklinu a konopné silice	34
2.1.6.4	Příprava pro stanovení hodnoty BIC u <i>S. aureus</i> při synergickém působení tetracyklinu a konopné silice	35
2.1.6.5	Barvení biofilmu	35
2.1.6.6	Stanovení hustoty nárůstu bakterií.....	35
2.1.6.7	Stanovení biofilmu	35
2.1.6.8	Vyhodnocení synergických interakcí.....	35
3	Výsledky.....	37
3.1	Testování kmenů <i>S. aureus</i> v různých médiích.....	37
3.2	MIC tetracyklinu, konopné silice a jejich kombinace na <i>S. aureus</i> ATCC 43300 38	
3.2.1	Hodnota MIC tetracyklinu na <i>S. aureus</i>	38
3.2.2	Hodnota MIC konopné silice na <i>S. aureus</i>	39
3.2.3	Hodnota MIC při kombinaci konopné silice a tetracyklinu.....	40
3.2.4	Vypočtená hodnota FIC pro hodnoty MIC pro kombinaci konopné silice a tetracyklinu.....	40
3.3	BIC tetracyklinu, konopné silice a jejich kombinace.....	41
3.3.1	Vyobrazení BIC tetracyklinu na biofilm <i>S. aureus</i>	41
3.3.2	Vyobrazení BIC konopné silice na biofilm <i>S. aureus</i>	42
3.3.3	Vyobrazení BIC kombinace tetracyklinu a konopné silice na biofilm <i>S. aureus</i> 43	
3.3.4	Vypočtená hodnota FIC pro hodnoty BIC pro kombinaci konopné silice a tetracyklinu.....	43
4	Diskuze	45
4.1	Minimální inhibiční koncentrace	45
4.2	Biofilmová inhibiční koncentrace	46
5	Závěr.....	48
6	Literatura	49

Úvod

Mikroorganismy, jako jsou bakterie, mají tendenci se agregovat a růst na povrchích ve formě biofilmu, kterým se chrání před antimikrobiálními, dezinfekčními, ale i mechanickými účinky (Bi et al. 2021; Sudagidan et al. 2021).

S bakteriálními biofilmy se můžeme setkat v přírodním, průmyslovém, ale i nemocničním prostředí, ve kterém mohou adherovat k různým povrchům (Bi et al. 2021; da Silva et al. 2020)). V nemocničním prostředí jsou infekce zesílené biofilmem považovány za jednu z největších hrozeb pro lidské zdraví, díky jejich schopnosti tvorby chronických infekčních onemocnění, které je velice náročné efektivně léčit. (Aiello et al. 2021). Schopnost tvorby biofilmu bakteriemi může způsobit vznik infekcí způsobujících dlouhodobou léčbu ran, ale i další závažné klinické komplikace (Poma et al. 2021). Jednou z největších komplikací, kterou bakteriální biofilmy ve zdravotnictví způsobují, je antimikrobiální rezistence. Zároveň schopnost tvorby biofilmu umožňuje bakteriím se vyhnout lidským obranným mechanismům, což také výrazně komplikuje léčbu infekce (Mirzaei et al. 2020).

Stejně jako u lidské populace, mohou bakteriální biofilmy způsobovat infekce také i u volně žijících či hospodářských zvířat (Heckman & Soto 2021). U hospodářských zvířat mohou bakteriální biofilmy tvořené nejčastěji *S. aureus* způsobovat jedno z nejnákladnějších onemocnění v mlékařství, a to mastitidu u skotu (Bohl et al. 2021). U volně žijících zvířat se můžeme setkat například s biofilmy tvořenými *Streptococcus iniae* způsobujícími vysokou úmrtnost široké škály volně žijících ryb (Heckman & Soto 2021).

Bakteriální biofilmy vyskytující se v průmyslu pak mohou negativně ovlivňovat kvalitu konečného produktu vlivem mikrobiální kontaminace, způsobovat koroze a s nimi spojené snížení účinnosti přenosu tepla. Mohou mít však i pozitivní přínos, kdy se biofilmy využívají například při postupech čištění odpadních vod, bioremediačních procesech a výrobě elektrické energie v podobě mikrobiálních palivových článků (Poma et al. 2021).

Jednou z bakterií, která je schopna tvorby biofilmu a s ním spojené rezistence je *S. aureus* (Sharabiani et al. 2021). *S. aureus* je grampozitivní, fakultativně anaerobní bakterie, která způsobuje širokou škálu onemocnění a může se v lidském, ale i zvířecím těle, vyskytovat jako patogen či jako komenzální organismus (Pérez et al. 2020; Torabi et al. 2021). *S. aureus* je typický pro svou širokou škálu faktorů virulence, která mu umožňuje snadnější přežití v prostředí. Mezi tyto faktory virulence patří již zmíněná tvorba biofilmu, toxinů a schopnost tvorby rezistence vůči antimikrobiálním látkám (Sharabiani et al. 2021). Tvorba biofilmu *S. aureus* ovlivňuje především zdravotnictví, kde ve formě methicilin-rezistentního či vankomycin-rezistentních *S. aureus* výrazně komplikuje léčbu (Eld et al. 2021; Hasan et al. 2016; Ceballos et al. 2019). Dále se s biofilmem tvořeným *S. aureus* můžeme setkat i v potravinářském průmyslu, kde se vyskytuje zejména v potravinách s vysokým obsahem bílkovin, jako je maso, mléko, mléčné výrobky, vejce a ryby (Kang et al. 2019; Zhang et al. 2021).

Z důvodu neustálého růstu rezistence některých bakterií na antibakteriální látky se v posledních letech hledají nová účinná antibiotika, ale i jiné alternativní způsoby inhibice bakteriálních biofilmů, které by dokázaly antibiotika v inhibici biofilmu nahradit. Mezi nejslibnější varianty alternativních způsobů inhibice biofilmů patří například využití

rostlinných silic, inhibitorů *quorum sensing*, bakteriocinů, bakteriofágů, enzymů či biosurfaktentů (Toushik et al. 2020).

Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je ověření účinku konopné silice na stafylokokový biofilm samostatně a v kombinaci s konvenčními antimikrobiálními látkami.

Hypotéza: Na základě předběžných výsledků působení konopné silice proti tvorbě biofilmu *S. aureus* a na základě synergických účinků s některými antimikrobiálními látkami lze očekávat, že konopná silice:

1. bude potlačovat tvorbu biofilmu u různých kmenů *S. aureus*;
2. bude účinná i v kombinaci s dalšími konvenčními antimikrobiálními látkami

1. Literární rešerže

1.1 Biofilm

Bakteriální biofilmy jsou v přírodě široce rozšířeny a mohou vážně ohrožovat veřejné zdraví. Nebezpečné jsou především tím, že umožňují bakteriím vznik rezistence na antimikrobiální látky, která následně velmi komplikuje léčbu infekcí. Existuje hned několik možností inhibice bakteriálního biofilmu, jako je využití antibiotik, bakteriofágů či inhibitorů Sensing quorum, ty však nemusí být vždy dostatečně účinné (Zhang et al. 2020).

Mezi bakterie tvořící biofilm patří například *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Lactobacillus reuteri* a další (Pourhajibagher et al. 2021; Wang et al. 2021).

1.1.1 Charakterizace biofilmu

Infekce zesílené biofilmem se staly jednou z největších hrozeb pro lidské zdraví a velkou výzvou pro moderní medicínu. Infekce spojené s biofilmem jsou každoročně zodpovědné za stovky tisíc chronických infekcí po celém světě a podle mnoha studií tvoří tyto infekce 60 % - 80 % všech bakteriálních infekcí a téměř všech nozokomiálních infekcí (Aiello et al. 2021).

Biofilmy jsou definovány jako mikrobiálně odvozená přisedlá komunita charakterizovaná buňkami, které jsou nevratně připojeny k substrátu nebo rozhraní či k sobě navzájem. Jsou uloženy v matici extracelulárních polymerních látek, které vyrobily a vykazují pozměněný fenotyp s ohledem na rychlost růstu a genovou transkripci. Tato komunita je prostorově heterogenní strukturou, která neustále mění svou formu, ve které se růst a rychlost metabolismu, dostupnost kyslíku a živin, hustota buněk, velikost a morfologie ve struktuře biofilmu výrazně liší (Aiello et al. 2021). Hlavní částí biofilmů jsou mikrokolonie, které jsou tvořeny shluky mikroorganismů umístěných nad maticí. Jejich úkolem je uzavírání kanálů určených pro přepravu kyslíku, živin, odpadu apod (Kumar et al. 2021). K vytvoření zralého biofilmu dochází během několika dní až týdnů, během kterých dochází k jejich růstu a formování (Zhang et al. 2021). V biofilmu jsou vytvořeny kanály, jejichž úkolem je distribuce živin do všech vrstev biofilmu. Tyto kanály jsou tvořené enzymatickým štěpením molekul matrice biofilmu, jako jsou eDNA a proteiny (Raafat et al. 2019).

S. aureus je velmi adaptivním mikroorganismem, který oplývá poměrně silnou schopností tvorby biofilmu na povrchu pevné fáze (Yu et al. 2021). Tvorba biofilmu je zprostředkována pomocí genů *icaADBC* operonem, *agr* lokusem, ale i dalšími geny, které mohou exprimovat celou řadu povrchových složek rozpoznávaných jako adhezivní molekuly (MSCRAMM). Tyto adhezivní molekuly se také podílejí na tvorbě biofilmu. Gen *icaADBC* kóduje polysacharidový mezibuněčný adhesin (PIA), který tvoří více než 90 % biomasy biofilmu. Tato biomasa biofilmu se skládá z extracelulárních polymerních látek (EPS), které jsou tvořeny převážně z polysacharidů, lipidů, bakterií vylučovaných povrchem buněk, extracelulární DNA (eDNA), kyseliny teichoové a proteinových adhesinů, které biofilmům umožňují tvořit trojrozměrnou strukturu (Avila-Novoa et al. 2021). Množství a složení EPS se liší dle druhu, ale i kmene bakterie (Kaneko et al. 2021).

Polysacharidový mezibuněčný adhesin (PIA) je exopolysacharid, který je připojen k povrchu buněk. V literatuře ho můžeme nalézt také pod zkratkou PNAG (poly-N-acetyl- β -(1,6)-glukosamin). Jeho přítomnost v biofilmu podporuje adhezi mezi buňkami, což umožňuje tvorbu robustnějších biofilmů a zároveň jeho kationtová povaha usnadňuje připojení bakterií k povrchu hostitelských buněk, které je nejspíše zprostředkováno pomocí záporně nabitých molekul, jako jsou kyselina teichoová a eDNA uvolňovaných umírajícími buňkami. U stafylokoků nebyl doposud nalezen žádný enzym, který by byl schopný PNAG degradovat (Raafat et al. 2019).

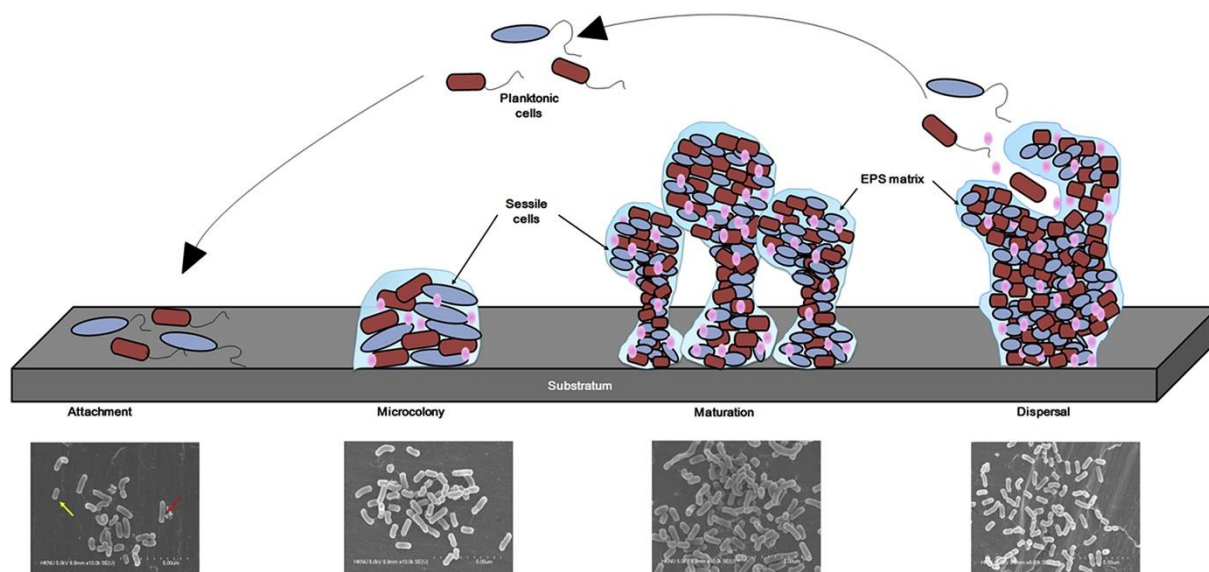
Biofilmy jsou odpovědné například za znečištění procesní vody, zhoršení hygienické kvality pitné vody a mikrobiálně ovlivněnou korozi (Aiello et al. 2021). Mohou však mít pro člověka i prospěšné využití. Své uplatnění našly biofilmy například při čištění odpadních vod, bioremediačních procesech či při výrobě elektrické energie ve formě mikrobiálních palivových článků (MFC) (Poma et al. 2021).

Tvorba biofilmu u bakterií je spojována s vysokou úrovní rezistence vůči antimikrobiálním látkám, která má za následek časté selhání léčby a s tím související zvýšenou morbiditou a mortalitou těchto infekcí. Ukázalo se, že při léčbě antibiotiky infekcí tvořících biofilm dochází k usmrcení pouze oddělených planktonických bakterií a biofilm zůstává i po léčbě neporušený. Studie také ukázaly, že i bakteriální buňky, které se v biofilmu vyskytují v klidné fázi, získávají rezistenci vůči antimikrobiálním látkám (Aiello et al. 2021).

1.1.1.1 Tvorba biofilmu

Tvorba biofilmu je multifaktoriální a adaptivní proces regulovaný různými molekulárními mechanismy. Průběh vzniku biofilmu se dělí do čtyř fází: počáteční reverzibilní a ireverzibilní připojení k povrchu, tvorba mikrokolonií, zrání biofilmu a disperze biofilmu (Poma et al. 2021).

Za biofilm se mohou příležitostně označovat i stafylokokové aglomerace, u kterých nedochází k adhezi k povrchu. V těchto případech je počáteční fází vzniku biofilmu označována mezibuněčná agregace (Raafat et al. 2019).



Obrázek 1 Princip vzniku biofilmu (Raafat et al. 2019)

Počáteční vazba mikroorganismů na abiotické a biotické povrchy závisí jak na vlastnostech materiálu, tak i na vlastnostech povrchu mikrobiálních buněk a je obecně zprostředkována nescifickými jevy, jako jsou hydrofobní, elektrostatické, sterické interakce a van der Waalovy síly. Časná tvorba formujícího se biofilmu složeného z adsorbovaných molekul přítomných v okolním prostředí však může změnit fyzikálně-chemické vlastnosti holého povrchu, a navíc může poskytnout koncentrovaný zdroj živin. Je také známo, že při adhezi k povrchům hrají důležitou roli také fimbrie, flagella, pili a curli, které překonávají odpudivé bariéry a mohou zprostředkovávat přímý fyzický kontakt s povrchem. Jako reakce na povrchový kontakt se syntetizují specifické nebo nescifické adheziny, které podporují nevratnou mikrobiální vazbu způsobující přechod mikroorganismů z planktonické formy na přisedlý životní styl (Poma et al. 2021; Raafat et al. 2019). Adheze k povrchům je u *S. aureus* zajišťována širokým spektrem funkčně redundantních adhesinů, jako jsou MSCRAMM. MSCRAMM jsou ukotveny k buněčné stěně pomocí enzymové sortázy a obsahují domény překlenující buněčnou stěnu, které končí exponovanou doménou vázající se na proteiny lidské matrice. *S. aureus* obsahuje velké množství MSCRAMM. Ty pak hrají klíčovou roli v kolonizaci bakterií a přežití v hostitelských buňkách (Raafat et al. 2019).

Klonální růst ireverzibilně adherovaných buněk vytváří první vrstvu buněčných shluků známých jako mikrokolonie. V tomto kroku se začínají zapojovat molekuly snímající kvora (QS), které začínají uvolňovat extracelulární deoxyribonukleové kyseliny (eDNA) a další důležité složky EPS (Poma et al. 2021)

V průběhu procesu zrání biofilmu se mikroorganismy začnou aktivně množit, i nadále produkují EPS a akumulují signální molekuly, enzymy, živiny, ale i další složky. Složení matrice je v této fázi heterogenní a zahrnuje proteiny, eDNA a polysacharidy. V této fázi jsou biofilmy již složitým a trojrozměrným společenstvím složeným z několika různých mikroprostředí a buněk vyskytujících se v rozdílné metabolické aktivitě (Poma et al. 2021; Raafat et al. 2019)).

Disperze biofilmu je poslední fází tvorby biofilmu. Během disperze dochází k šíření jednotlivých buněk nebo buněčných shluků na nová místa. Předpokládá se, že k tomuto šíření dochází v reakci na nepříznivé změny podmínek v prostředí jako je akumulace metabolitů, vyčerpání živin a kyslíku či změny některých vnějších sil (Poma et al. 2021).

1.1.1.2 Quorum sensing

Quorum sensing (QS) se vyskytuje u všech druhů mikroorganismů a mikroorganismům slouží jako komunikační kanál (Li & Zhao 2020). Jedná se o bakteriální signalizační systém, který funguje prostřednictvím produkce, sekrece a detekce malých signálních molekul nazývaných autoinduktory (Higgins et al. 2021).

QS je běžný komunikační a koordinační mechanismus, který závisí na hustotě bakterií. Řídí růst, proliferaci, patogenitu, tvorbu biofilmu a další související skupinové aktivity bakterií. Dále QS slouží jako ochrana bakterií před širokou škálou environmentálního stresu, který by mohl podporovat bakteriální rezistenci prostřednictvím regulace autoinduktorů (AI) a faktorů virulence. Když koncentrace signálních molekul vylučovaných bakteriemi dosáhne určité prahové hodnoty, odpovídající receptor bude reagovat a vázat se na signální molekuly

k aktivaci exprese specifických cílových genů, což povede k řadě bakteriálních chování, jako je bioluminiscence, tvorba biofilmu, faktor virulence exprese a produkce extracelulární proteázy. Podle různých signálních molekul jsou bakteriální QS systémy rozděleny do tří hlavních kategorií. První kategorií jsou QS systémy zprostředkované acylhomoserinovými laktony (AI-1) u gramnegativních bakterií. Dále jsou QS systémy zprostředkované autoindukujícími peptidy (AIP) u grampozitivních bakterií a třetí skupinu tvoří systémy zprostředkované furanosylborátovými diestery (AI-2), které se mohou vyskytovat jak u grampozitivních, tak i u gramnegativních bakterií (Li et al. 2021).

Mnoho bakteriálních procesů, včetně exprese virulenčního faktoru, tvorby biofilmů, ale i resuscitace životaschopných, ale nekultivovaných buněk (VBNC) je zprostředkováno pomocí *quorum sensing*. VBNC jsou nebezpečné zejména pro bezpečnost potravin, kdy mohou potravinářské patogeny za nepříznivých podmínek v prostředí přejít do stavu VBNC, které se mohou vyhnout tradiční detekci a za vhodných podmínek se mohou znovu resuscitovat a negativně působit na lidské zdraví. Autoinduktory můžeme nalézt v masných výrobcích, mléčných výrobcích, syrové zelenině, ale třeba i ve vodních výrobcích (Li & Zhao 2020).

Na základě environmentálních podnětů reguluje systém *Quorum Sensing* různá mikrobiální chování, jako je například morfogeneze, tvorba biofilmu, bioluminiscence, tvorba rezistence na antimikrobiální látky, regulace exprese faktoru virulence, generace vegetačního klidu atd (Li & Zhao 2020).

1.1.1.3 Biofilmy v potravinách a potravinářství

S. aureus je jedním z nejvýznamnějších patogenů vyskytujících se v potravinách (Bai et al. 2021). Můžeme ho nalézt ve velkém množství potravin, zejména pak v potravinách s vysokým obsahem bílkovin, jako je maso, mléko, vejce, ryby, mléčné výrobky a u drůbeže (Kang et al. 2019; Zhang et al. 2021). Hojně se vyskytuje v mnoha procesech výroby a zpracování potravin, kde tvoří biofilmy (Bai et al. 2021). Tvorba a vývoj bakteriálních biofilmů se může lišit v závislosti na typech potravinářských provozů a umístění zpracovatelského zařízení. Jeho vznik v potravinářském průmyslu je ovlivňován faktory jako jsou kontraktní povrchy, používání rukavic zaměstnanci, pasterizační desky, distribuční potrubí využívané pro dodávku vody či při zpracování tekutých potravin, dávkování, balicí zařízení a skladovací nádrže. Vznik biofilmu v potravinách může zvýšit riziko bakteriální infekce a intoxikace z potravin a ohrozit tím kvalitu a bezpečnost potravin. Ke kontaminaci může dojít v syrovém, minimálně zpracovaném, čerstvém či hotovém jídle a potravinových derivátech během zpracování potravinářských výrobků. Následně tato kontaminace může vést až ke vzniku biofilmu. Některé dominantní bakteriální druhy, mezi které se řadí i *Staphylococcus*, mohou zůstat na pracovních plochách i po očištění a provedení dezinfekce. Pro eliminaci bakteriálních biofilmů v potravinářském průmyslu platí pravidlo, že prevence tvorby biofilmů je pro podnik vždy výhodnější než léčba již vzniklých biofilmů. K zabránění tvorbě biofilmů slouží tedy převážně aktivní aplikace různých protiopatření, jako je například dodržování správných výrobních postupů, hygienických postupů a dobře navržená analýza rizik a kritických kontrolních bodů. Inaktivace nebo usmrcování bakterií v biofilmech je zásadní pro prevenci další tvorby biofilmu. Bylo studováno mnoho chemických a fyzikálních metod, které by mohly zabránit vzniku biofilmů v potravinách, ale doposud nebyla objevena žádná z těchto

metod, která by nezpůsobovala vedlejší nežádoucí účinky na kvalitu potravin. Jako slibná alternativa pro eliminaci vzniku biofilmů v potravinářském průmyslu se jeví využití ekologického a zároveň ekonomického přístupu, při kterém dochází k využití biologických metod. U těchto metod jsou využívány pro prevenci a kontrolu biofilmů bakteriociny, biosurfaktanty (BSs), bakteriofágy, enzymy a látky anti-QS (Toushik et al. 2020).

K časté kontaminaci biofilmy *S. aureus* se můžeme setkat zejména v mlékárenském průmyslu, ve kterém jsou distribuovány po celém mléčném potravinovém řetězci. Ke kontaminaci může dojít buď prostřednictvím potravinářských surovin a nádrží na syrové mléko nebo při zpracování potravin, kdy může dojít ke kontaminaci ze zařízení, které potravinu zpracovává, včetně potrubí, nádrží na sýry, pasterizátory, ale i prostřednictvím povrchů, se kterými přicházejí potraviny do styku a balicího zařízení (Avila-Novoa et al. 2021). Zejména u tradičně ručně vyráběných potravin představuje velkou hrozbu pro dodržení bezpečnosti potravin (Bai et al. 2021).

S. aureus je jedním z nejběžnějších intramamárních patogenů u stád dojnic na celém světě. Za hlavní zdroj kontaminace mléka se považuje infikovaná prsní žláza dojnic (Pacha et al. 2021). V mlékárenském průmyslu tvoří *S. aureus* jednu z hlavních příčin vzniku mastitid u skotu, které jsou v mlékárenském průmyslu označovány za jedno z nejnákladnějších onemocnění. Tato bakterie vyvolává převážně subklinickou mastitidu, která může přecházet v chronické onemocnění a celoživotní perzistenci patogenu (Bohl et al. 2021).

Dalším zdrojem kontaminace potravin biofilmem *S. aureus* mohou být také špatně čištěné stěny potrubí, kterými během zpracování prochází tekuté potraviny, jako jsou například různé ovocné šťávy a omáčky, ale může jím procházet například i mleté maso. Vlivem tohoto nesprávného čištění potrubí může dojít ke křížové kontaminaci zpracovávaných potravin. K ošetření těchto tekutých potravin se tradičně používala mikrovlnná pasterizace či okamžitá sterilace ultravysokými teplotami. Od těchto metod se však již odstupuje. A to zejména kvůli negativním vlivům teploty na senzory a výživové vlastnosti výrobků. V posledních letech se pro zajištění bezpečnosti těchto potravin začaly používat technologie využívající například studeného plazmatu, vysokého napětí v elektrickém poli, vysokého hydrostatického tlaku a vysokotlaké homogenizace (UHPH) (Zhang et al. 2021).

U bakterií přenášených formou biofilmů v potravinách dochází k menší citlivosti na vlivy vnějšího prostředí. Uvádí se, že jejich odolnost vůči environmentálním stresům může být až tisíckrát vyšší než u buněk vyskytujících se v planktonické formě. S výskytem biofilmů se můžeme setkat v mnoha potravinářských průmyslových procesech, které mohou vést ke kontaminaci potravin a poškození zařízení (Yu et al. 2021).

K boji s biofilmy jsou v potravinářství nejčastěji používané chemické dezinfekční prostředky. Proti těm jsou však biofilmy velmi dobře odolné. Díky vytvoření přirozené bariéry složené z EPS dochází k omezení penetrace a difúzi chemických dezinfekčních prostředků do vnitřních buněk biofilmu, které zůstávají i nadále nedotčené, a tedy i životaschopné (Yu et al. 2021).

V posledních letech přitáhl velkou pozornost pro kontrolu potravinářských bakteriálních biofilmů také vysoce intenzivní ultrazvuk (HIU), který působí na změnu adheze biofilmu. Existuje také mnoho studií, které uvádějí, že HIU působí baktericidně. Tyto výsledky studií však nebyly jednoznačné. Účinnost ultrazvukové kontroly biofilmu je závislá na

ultrazvukových podmínkách, povrchových podmínkách, mikrobiálních kmenech a stádiích, ve kterých se biofilmy nachází (Yu et al. 2021).

1.1.1.4 Biofilmy ve zdravotnictví

S. aureus je hlavním patogenem způsobujícím nozokomiální infekce a představuje velkou zátěž pro lékařská zařízení. Tyto infekce jsou v lékařských zařízeních přenášeny buď přímým kontaktem pacientů s kolonizovanými zdravotníky, při zanesení mikroorganismů do ran po invazivním chirurgickém zákroku či při zavádění implantátů (Subramanian & Natarajan 2021) jako jsou srdeční a kosmetické chirurgické implantáty, cévní štěpy či katetry (El-Far et al. 2021). Připojení *S. aureus* na hostitelských tkáních i na implantovaných materiálech je zprostředkováno pomocí adhesinů (Raafat et al. 2019) a mohou způsobovat převážně kožní abscesy, respirační infekce, infekce měkkých tkání či bakteremie. Pokud se bakterie *S. aureus* dostanou do krevního řečiště, mohou způsobit v těle hostitele endokarditidu, osteomyelitidu, nekrotizující pneumonii a sepse (El-Far et al. 2021).

Ve zdravotnictví jsou infekce spojené s bakteriemi tvořícími biofilm velkým problémem. Zatímco planktonické bakteriální buňky způsobují převážně akutní infekce, u bakterií tvořících biofilm dochází převážně ke vzniku chronických infekcí, které je náročné léčit. Léčba těchto infekcí je náročná díky neustále se zvyšující rezistenci na antimikrobiální látky (Kaneko et al. 2021), která vzniká jako důsledek nesprávného a nadměrného používání antibiotik (Campbell et al. 2020). Zároveň se bakterie vyskytující se v biofilmu zvládají vyhnout imunitní odpovědi hostitele (Kaneko et al. 2021). Proto je důležité pro léčbu infekcí způsobenou biofilmy neustále hledat nové způsoby a přístupy léčby. Z tohoto důvodu byly provedeny studie k detekci nových sloučenin s antibakteriálními a anti-biofilmovými účinky, mezi kterými byla zkoumána například léčba pomocí nano-stříbra, bakteriofágů a antibiotickými činidly rostlinného původu. Pozornost v léčbě biofilmových infekcí si získaly i různé biologické účinky přirozeně se vyskytujících látek v rostlinách (El-Far et al. 2021).

V boji proti bakteriálním biofilmům se stávají potenciální terapeutickou možností antimikrobiální látky, které snadno pronikají do biofilmu a narušují ho (Kaneko et al. 2021). K použití se nabízí nebaktericidní terapeutická činidla, která zabraňují tvorbě biofilmu a zároveň zvyšují citlivost na antibiotika. Tyto sloučeniny se označují jako „anti-patogenní látky“ a umožňují prodloužení životnosti aktuálně používaných antibiotik a snížení rychlosti růstu rezistence na tato antibiotika (Campbell et al. 2020).

1.1.2 **Staphylococcus aureus**

Staphylococcus aureus je grampozitivní, kataláza a koaguláza pozitivní, oportunní a fakultativně anaerobní bakterie (Pérez et al. 2020; Torabi et al. 2021), která se může v lidském těle vyskytovat jako patogen či jako komenzální organismus, který kolonizuje různé části těla. Uvádí se, že přibližně u 30% populace dochází ke kolonizaci *S. aureus*. Nejčastěji je lokalizován v přední části nosu. Studie také potvrdily, že právě nazální kolonizace zvyšuje riziko vzniku klinických infekcí (Sharabiani et al. 2021). Dále můžeme tuto grampozitivní bakterii izolovat také například z kůže či horních cest dýchacích (El-Far et al. 2021). Přenos *S. aureus* je zprostředkovan pomocí kontaktu s kontaminovanými rukama, přenosem v prostředí či formou respiračních onemocnění, kdy dojde k vdechnutí kontaminovaného vzduchu

(Sharabiani et al. 2021). *S. aureus* je označován za nejvíce patogenní mikrobiální druh mezi stafylokoky, který způsobuje hned několik onemocnění (Moussé et al. 2020).

S. aureus je uznáván jako jeden z hlavních lidských bakteriálních patogenů, který způsobuje široké spektrum nozokomiálních a komunitně přenosných infekcí, které mohou způsobovat širokou škálu onemocnění, a to od zánětlivého onemocnění kůže až po stav, který může být i život ohrožující. Infekce způsobené *S. aureus* představují velkou zátěž pro veřejné zdraví po celém světě (Memariani et al. 2021). Jeho nebezpečnost vyplývá především z jeho široké škály faktorů virulence, kterými oplývá. Mezi tyto faktory se řadí tvorba toxinů, biofilmu, rezistence vůči různým antibiotikům (Sharabiani et al. 2021). K vysoké virulenci této bakterie napomáhá také výskyt adhezínů, jako jsou proteiny vázající kolagen (Cna), fibronektin (FnBP), elastin (Ebp) a shlukovací faktor (Clf), které umožňují bakteriím snadný úchyt na povrchu hostitelské buňky, následnou invazi do hostitelských buněk či únik před imunitní reakcí (Memariani et al. 2021; Sharabiani et al. 2021).

Pro léčbu stafylokokových infekcí jsou používány různé třídy antibiotik, jako jsou například: aminoglykosidy, fluorochinolony, makrolidy, glykopeptidy, straptograminy a oxazolidinony. Díky celosvětovému rozšiřování rezistence na antibiotika však dochází k snižování možností léčby infekcí způsobených touto bakterií. Jedním z nejdůležitějších multirezistentních patogenů se uvádí methicilin-rezistentní SA, označovaný pod zkratkou MRSA (Memariani et al. 2021).

1.1.2.1 Toxiny produkované *S. aureus*

S. aureus je označován za hlavní příčinu otrav potravinami způsobených tvorbou enterotoxinů. Uvádí se, že celkem 75 % hlášených případů potravinových infekcí způsobených bakteriemi tvoří právě tato bakterie. K vyvolání potravinové otravy dochází při požití potravy obsahující vysoké dávky stafylokokových toxinů, přičemž *S. aureus* vytváří hned několik druhů toxinů, mezi které patří toxin-1 syndromu toxického šoku (TSST-1), enterotoxiny (SE), exfoliativní toxiny (ExTs), Panton Valentine Leucocidin (PVL), adhesiny, hemolysins, exfoliativní toxiny (ETA a ETB) (Sharabiani et al. 2021; Moussé et al. 2020), přičemž TSST-1, SE a PVL mají superantigenní aktivitu, která může způsobovat proliferaci T buněk a uvolňovat prozánětlivé cytokiny (Sharabiani et al. 2021).

Jednotlivé stafylokokové toxiny se od sebe mohou odlišovat svými vlastnostmi a působením na lidské zdraví. Například enterotoxin vyprodukovaný *S. aureus* je tolerantní jak k teplu, tak i k nízkému pH a proteolytickým enzymům. Při tepelném opracování a konzervaci potravin tedy dojde pouze k usmrcení živých bakterií *S. aureus*, ale enterotoxin zůstává nepoškozený. Může tedy po konzumaci kontaminované potravy i po jejím tepelném zpracování a konzervaci působit toxicky (Yan et al. 2021). Celkem již bylo popsáno 24 stafylokokových enterotoxinů. Mezi příznaky otravy stafylokokovými enterotoxiny patří nevolnost, zvracení, křeče v břiše a v některých případech i průjem (Silva et al. 2020).

Panton Valentine Leucocidin (PVL) spolu s toxinem syndromu toxického šoku (TSST-1) a enterotoxiny (SE) patří do skupiny pyrogenních superantigenních toxinů. Zatímco PVL působí jako cytotoxin a toxin tvořící póry, TSST-1 vyvolává svým působením u hostitele imunitní hyperaktivitu. Exfoliativní toxiny zase způsobují porušení integrity kůže a způsobují

závažné dermatologické syndromy (Motallebi et al. 2021), které jsou označovány jako syndrom opárené kůže (Sharabiani et al. 2021).

1.1.2.1 Vznik rezistence

Kmeny mikroorganismů rezistentních na antimikrobiální léčbu se staly hlavními riziky v oblasti medicíny a zdravotní bezpečnosti (Cui et al. 2019). Antimikrobiální rezistence není však znepokojivá jen u lidí, ale i u zvířat. Rezistence na léky je jev, který se přirozeně vyskytuje v průběhu času. Obvykle se rezistence vytváří v důsledku genetických modifikací získaných mutací a selekcí neboli také vertikálním přenosem genů nebo získáváním genů mezi kmeny a druhy mikroorganismů, také označovaném jako horizontální přenos genů (Pérez et al. 2020).

Léčba infekcí *S. aureus* je stále komplikovanější a náročnější v důsledku vzniku různých typů rezistence na antibiotika (Chakraborty et al. 2018). *S. aureus* dokáže na antimikrobiální látky reagovat pozoruhodně všestranně. V dřívějších dobách se k léčbě infekcí způsobených *S. aureus* používala β -laktamová antibiotika, tetracyklin, klindamycin a sulfa. V současné době je však léčba těchto infekcí díky vzniku antimikrobiální multirezistence (MDR) mnohem náročnější. K rozšíření incidence rezistence na antimikrobiální látky došlo u *S. aureus* pozoruhodně rychle (Hasan et al. 2016).

Vznik rezistence na léky lze však urychlit i nesprávným používáním antimikrobiálních látek. Bylo například prokázáno, že použití subinhibičních koncentrací antibiotik může stimulovat přenos horizontálních genů souvisejících s rezistencí. Další komplikací u antimikrobiální rezistence je, že genetické determinanty způsobující rezistenci lze snadno přenášet mezi různými hostiteli, včetně lidí, zvířat a životního prostředí (Pérez et al. 2020). Z tohoto důvodu představuje rozsáhlé používání antimikrobiální léčby jak u lidí, tak i u zvířat velký problém pro veřejné zdraví. V současné době je odpovědné používání antimikrobiálních látek klinickými lékaři a hledání terapeutických alternativ ke snížení používání antimikrobiálních látek a snížení antimikrobiální rezistence prioritou jak ve veterinární medicíně, tak i ve veřejném zdraví (Molineri et al. 2021).

1.1.2.1.1 MRSA

S. aureus je mikroorganismus, který je schopný získat několik mechanismů antimikrobiální rezistence, přičemž jedním z nejdůležitějších je rezistence na methicilin (Ceballos et al. 2019). Methicilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA) je schopný přežít v přítomnosti β -laktamových antibiotik ve většině případů díky získání genové kazety obsahující *mecA* kódující protein 2a vázající penicilin (PBP_{2a}) s nízkou afinitou k penicilinu. V přítomnosti β -laktamů přebírá PBP_{2a} zkřížené propojení vláken peptidoglykanu (PGN) v buněčné stěně MRSA, což vede ke sníženému zesíťování PGN (Ceballos et al. 2019; Eld et al. 2021). MRSA se tak stal rezistentním na řadu antibiotik, včetně penicilu, tetracyklinu, methicilinu a vankomycinu (Chakraborty et al. 2018).

Díky těmto vlastnostem způsobují MRSA větší komplikace při léčbě a vyšší morbiditu u pacientů postižených MRSA. Zároveň představují i větší ekonomickou zátěž ve srovnání se *S. aureus* citlivým na methicilin (MSSA) (Ceballos et al. 2019; Eld et al. 2021). Dalším genem, u kterého bylo objeveno, že způsobuje rezistenci na methicilin je *mecC* (Ceballos et al. 2019).

MRSA je jedním z nejvýznamnějších patogenů způsobujících infekce spojené se zdravotní péčí (HA-MRSA), komunitou (CA-MRSA) a hospodářskými zvířaty (LA-MRSA). Na rozdíl od kmenů HA-MRSA, které postihují pacienty s rizikovými faktory spojenými se zdravotní péčí, CA-MRSA mohou infikovat i zdravé a mladší lidi vyskytující se mimo nemocniční zařízení. To naznačuje zvýšenou virulenci vyskytující se u CA-MRSA (Egea et al. 2014). K přenosu MRSA z hospodářských zvířat na člověka může dojít při nedodržování dostatečných hygienických postupů dvěma způsoby, a to fyzickým kontaktem s infikovaným zvířetem či konzumací masa nebo jiného potravinářského výrobku, jako jsou například mléčné produkty (Chakraborty et al. 2018).

1.1.2.1.2 VRSA

Až donedávna byl vankomycin nejspolehlivějším řešením pro infekce způsobené MRSA. První objev rezistence na vankomycin u *S. aureus* se objevil v roce 1997 u japonského pacienta, u kterého došlo k nadměrnému používání vankomycinu během léčby. Izoláty VRSA vykazují úplnou rezistenci vůči vankomycinu (Hasan et al. 2016).

Mechanismus působící na rezistenci na vankomycin u *S. aureus* stále není úplně jasný. Genetická analýza prvního izolátu VRSA odhalila konjugativní plazmid 57,9 kilobázové multirezistence. V tomto plazmidu byl nalezen transpozon Tn₁₅₄₆, který obsahuje determinant rezistence vůči vanA. Další geny na tomto plazmidu kódovaly rezistenci na trimethoprim (dfrA), β-laktamy (blaZ) a aminoglykosidy (aacA-aphD) (Hasan et al. 2016). Předpokládá se však, že na vzniku rezistence na vankomycin u *S. aureus* se podílely dva mechanismy, a to změna v buněčné stěně a získání van genů (Fasihi et al. 2017). V důsledku vzniku VRSA se objevuje nutná a okamžitá potřeba objevu nových účinných terapeutických metod (Hasan et al. 2016).

1.1.3 Vybrané alternativní metody inhibice biofilmů

Pro inhibici tvorby biofilmu bylo navrženo hned několik strategií. Jednou z těchto strategií je prevence nebo narušení mikrobiální adheze k abiotickým povrchům modifikací povrchové chemie nebo topografie. Další strategií je použití povlaků s baktericidními nebo bakteriostatickými a antiadhezivními vlastnostmi. Alternativní metody se pak zaměřují na narušení zralého biofilmu enzymatickými nebo mechanickými metodami a na eradikaci bakteriálních komunit spojených s tvorbou biofilmu pomocí antimikrobiálních peptidů a bakteriofágů (Poma et al. 2021).

V posledním desetiletí došlo k vyvinutí nových metod určených k inhibici biofilmů. Mezi tyto metody spadá například vývoj nových antiadhezivních materiálů, použití ultrazvuku a magnetických polí k eradikaci biofilmu nebo k dosažení penetrace léčiva. Tyto metody však řeší pouze inhibici tvorby biofilmu pouze v životním prostředí a na klinických abiotických površích (Aiello et al. 2021).

1.1.3.1 Inhibitory Quorum Sensing

Vhodným prostředkem pro boj s bakteriálními infekcemi tvořícími biofilm se ukázalo použití inhibitorů *Quorum Sensing Inhibitors* (QSI). Jedná se o malé molekuly, které oplývají inhibičními schopnostmi proti systému *Quorum Sensing* (QS), který umožňuje komunikaci

mezi bakteriálními buňkami v biofilmu (Aiello et al. 2021). QSI lze rozdělit na inhibitory přírodního původu, mezi který patří mikrobiální, rostlinný i živočišný původ, a na syntetické sloučeniny. Mechanismy QSI se rozdělují podle tří způsobů inhibice, a to na inhibici syntézy signálních molekul, podporu degradace signálních molekul a soutěž se signálními molekulami o vazbu na receptorové proteiny. QSI byly navrženy jako slibné alternativy k antibiotikům a jejich použití bylo navrženo v kombinaci s antibiotiky. Cílem této kombinace bylo snížit užívání antibiotik a zvýšit jejich antibakteriální účinnost. Není však stále dostatečně probádáno, zda používání QSI pro léčbu bakteriálních infekcí může vyvolat bakteriální rezistenci (Li et al. 2021).

Nedávno byl zjištěn inhibiční účinek na QS u resveratrolu (RSV), který inhiboval růst biofilmu jak u grampozitivních, tak i u gramnegativních bakterií. Z výsledků biologických testů, které zkoumaly vliv RSV na inhibici biofilmu *S. aureus* bylo patrné, že RSV dokáže inhibovat proces QS blokací jejich počáteční adheze k povrchu. Přestože se zdá být RSV atraktivní pro výrobu nových farmaceutických produktů svým širokým spektrem antimikrobiální aktivity, bezpečností a nízkou cenou, má pro výrobu léků i některé negativní vlastnosti jako je například jeho nízká rozpustnost ve vodě, nízká biologická dostupnost či nestabilita v biologických tekutinách. Pokud by se však podařilo podávat RSV v liposomech, které zvyšují jeho rozpustnost a stabilitu ve vodě, mohl by se stát RSV účinným lékem v boji proti bakteriálním infekcím tvořícím biofilm (Aiello et al. 2021).

1.1.3.2 Bakteriociny

Neustále se zvyšující výskyt rezistence na antibiotika u většiny mikroorganismů spolu s nešetrným chováním antibiotik k životnímu prostředí vyžadují nové alternativní způsoby léčby mikrobiálních infekcí. Mezi tyto alternativní metody patří i využití bakteriocinů.

Bakteriociny jsou skupina ribosomálně syntetizovaných proteinů nebo peptidů produkovaných určitými mikroorganismy, u kterých se předpokládá potenciální aktivita proti patogenním mikroorganismům a bakteriím tvořící biofilm (Toushik et al. 2020). Mikroorganismy produkující bakteriociny jsou před působením vlastního bakteriocinu chráněny imunitním systémem, který je exprimován současně se strukturálními geny bakteriocinu (Duarte et al. 2013). Typicky jsou bakteriociny produkovány bakteriemi mléčného kvašení (LAB), u kterých studie odhalily celkem 785 domnělých shluků bakteriocinových genů obsažených ve dvanácti hlavních rodech LAB. V posledních několika letech vzbudily bakteriociny velký zájem díky svému šetrnému chování k životnímu prostředí (Toushik et al. 2020). Kromě toho jsou také obecně považovány za bezpečné a netoxické pro eukaryotické buňky. K jejich inaktivaci dochází prostřednictvím trávicích proteáz, které ovlivňují střevní mikrobiotu minimálně (Duarte et al. 2013). Zároveň bylo zjištěno jejich široké využití v různých potravinářských výrobcích ve formě přísad do potravin. Jsou využívány například při výrobě fermentované zeleniny, mléčných výrobků, alkoholických nápojů nebo mohou být použity i jako přísada do masa (Toushik et al. 2020). Lze je ale také využít k léčbě a prevenci některých bakteriálních infekcí, včetně bovinní mastitidy (Duarte et al. 2013).

Bakteriociny lze klasifikovat na základně hned několika faktorů, mezi které patří jejich primární struktura, molekulová hmotnost, jejich biochemické nebo genetické vlastnosti,

enzymatická a tepelná stabilita, přítomnost či nepřítomnost posttranslačních modifikací aminokyselin a mikrobicidních aktivit (Toushik et al. 2020).

Bakteriociny jsou primárně rozděleny do tří různých tříd. Bakteriociny třídy I jsou malé posttranslačně modifikované peptidy s konsensuální sekvencí GX₃TX₃EC a do této třídy patří například lantibiotika. Bakteriociny třídy II jsou malé, tepelně stabilní, nemodifikované peptidy s izoelektrickými body v rozmezí od 8,3 do 10,0 a shodnou sekvencí YGNGV a do této třídy je řazen například pediocin. Bakteriociny třídy III jsou velké, tepelně labilní peptidy, se shodnou sekvencí KYYGNGVXCXKX₂CXVD/NWX₂A. Do bakteriocinů třídy III se řadí například zoocin. Tyto hlavní třídy se dále dělí podle jejich malých rozdílů ve vlastnostech do podtříd. V posledních několika letech bylo identifikováno velké množství bakteriocinů izolovaných a identifikovaných z grampozitivních i gramnegativních mikroorganismů. Díky těmto objevům vzniklo hned několik databází shromažďujících informace o mikroorganismech produkujících bakteriocin, jako jsou například LABiocin a BAGEL (Toushik et al. 2020).

Bakteriociny se do potravin přidávají hned z několika důvodů. Prodlužují dobu použitelnosti potravin, zabraňují jejím změnám během skladování, omezují používání chemických a teplotních úprav, zabraňují přenosu kažení a přenosu patogenních mikroorganismů v potravinách, čímž zároveň zabraňují i vzniku bakteriálních biofilmů (Toushik et al. 2020).

Bakteriociny mohou také inhibovat tvorbu biofilmů určitých mikroorganismů pomocí interference RNA polymerázy, aspartyl-tRNA syntetázy a DNA gyrázy, která vede k narušení DNA, RNA a proteinového metabolismu bakterií. Většinou tímto způsobem inhibují pouze gramnegativní bakterie. Prokázalo se však, že například kruhový bakteriocinový enterocin AS-48 působí proti biofilmu *S. aureus* jak samostatně, tak i v kombinaci s dalšími biocidy. Dalším bakteriocinem, který může zabránit planktonovým buňkám ve vytváření biofilmu, a dokonce i proniknout do matrice zralého biofilmu *Staphylococcus* sp., je saktibiotický bakteriocin hyicin 4244 (Toushik et al. 2020) vytvářený *S. hyicus* 4244. Jedná se o první saktibiotikum objevené u stafylokoků (Duarte et al. 2018). Dalším bakteriocinem působícím inhibičně proti biofilmům *S. aureus* je amylolysin získávaný z *Bacillus amyloliquefaciens* GA₁ (Toushik et al. 2020).

1.1.3.3 Bakteriofágy

Bakteriofágy neboli také fágy jsou nejhojnější a všudypřítomné virové organismy v biosféře (Toushik et al. 2020). Jedná se o přirozené nepřátele bakterií, které mohou napadat i bakteriální biofilmy (Azaredo et al. 2021). Díky svým jedinečným vlastnostem jako je přirozený výskyt, bezpečnost pro člověka i životní prostředí a vysoká specifita k bakteriím přenášenými potravinami, jsou bakteriofágy atraktivní alternativou pro prevenci biofilmů v potravinách (Toushik et al. 2020).

Bakteriofágy obsahují enzymy degradující polysacharidy, které by mohly potenciálně eradikovat bakteriální biofilmy degradací EPS, a tím deaktivovat zralé biofilmy. Kromě toho bakteriofágy kódují tail-spike proteiny jako jsou endolysin a lysin a lytické strukturní proteiny, které se díky jejich schopnostem pronikat a odstraňovat biofilm používají jako anti-biofilmová činidla. Lýza cílových bakterií v biofilmech pomocí fágů může potenciálně snižovat stabilitu biofilmu, což umožňuje další disperzi fágů do bakteriálních biofilmů (Toushik et al. 2020).

Za posledních deset let se zájem o fagy prudce zvýšil, a to nejen kvůli zvýšenému povědomí o důsledcích biofilmů na lidské zdraví, ale především z důvodu, že roste množství důkazů o tom, že fagy působí proti biofilmům účinněji než tradiční antibiotika. Většina vědeckých publikací zabývajících se vlivem bakteriofágů na biofilm také potvrzuje, že fagy lze využít jak proti monodruhovým biofilmům, tak i při léčbě vícedruhových biofilmů, a to zvláště u biofilmů vytvořených *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *S. aureus* (Azeredo et al. 2021).

V současné době se bakteriofagy úspěšně používají v boji proti monobakteriálním i smíšeným bakteriálním biofilmům, ale také i k jejich kontrole. Studie prokázaly, že například stafylofagy vB_SauM_phiIPLA-RODI a vB_SepM_phiIPLA-C1C znatelně snižují tvorbu biofilmů *S. aureus* a *S. epidermidis* na deskách Transwell® (Toushik et al. 2020).

Šíření bakteriofágů na buňkách biofilmu je silně závislé na chemickém složení a vlastnostech okolí, jako je růstová fáze, médium, teplota a koncentrace fágů (Toushik et al. 2020). Dalším důležitým faktorem pro účinnou eradikaci biofilmů fagy je hustota biofilmu. Pokud jsou biofilmy řídké, je nepravděpodobné, že dojde k setkání fágů s bakteriemi biofilmu a snaha o eradikaci biofilmu fagy bude neúčinná (Azeredo et al. 2021). Soubor různých bakteriofágů či bakteriofágů s různými enzymy a dezinfekčními prostředky degradujícími polysacharidy by byl široce použitelný pro eradikaci široké škály biofilmů bakteriálních druhů (Toushik et al. 2020).

Dnes je již několik fágem zprostředkovaných biokontrolních látek široce využíváno k regulaci hlavních potravinových patogenních a kazících bakterií vyskytujících se ve formě biofilmu (Toushik et al. 2020).

Proti *S. aureus* působí například bakteriofág SATA-8505, u kterého byla potvrzena redukce biofilmu po 48 hodinách expozice fágu na polystyrénové mikrotitrační destičce. Dalšími bakteriofagy působícími proti biofilmům *S. aureus* jsou již zmiňované phiIPLA-RODI a phiIPLA-C1C, u kterých během výzkumu došlo ke snížení biofilmu o 2–4 log jednotky po 4 hodinách po ošetření (Toushik et al. 2020).

1.1.3.3 Enzymy

Enzymy jsou jedním z dalších alternativních způsobů, které vznikly pro kontrolu kvality a bezpečnosti potravin. Enzymy jsou využívány jako inovativní antibiofilmové látky, které mají schopnost rozkládat extracelulární polymerní látky matricové složky (mikrobiální DNA, polysacharidy a proteiny (Gutiérrez 2019; Toushik et al. 2020). Jejich jedinečnou vlastností je vysoká biologická rozložitelnost, která společně s nízkou toxicitou pro životní prostředí činí enzymy ekologickým opatřením proti tvorbě biofilmů. Ze sedmi tříd enzymů, vykazují čtyři hlavní třídy anti-biofilmovou činnost. Mezi tyto třídy spadají hydrolázy, oxidoreduktázy, transferázy a lyázy (Toushik et al. 2020).

Během povrchové adheze vytvářejí bakteriální buňky již zmíněné EPS, které lze snadno degradovat pomocí enzymů. Proto je za ideální metodu inhibice počáteční adheze a eliminace vytvořených struktur bakteriálních biofilmů považováno využití enzymů právě proti bakteriemi vytvořeným EPS (Toushik et al. 2020).

Enzymy jsou vysoce specifické pro substráty, proto se enzymatický způsob působení může u jednotlivých druhů výrazně lišit na základě obsahu matrice EPS. Enzymy mohou

narušovat biofilmy čtyřmi způsoby. Jedním z těchto mechanismů je napadání buněk v matici biofilmu, které způsobují lýzu buněk. Druhým mechanismem enzymy přímo napadají a degradují složky matice biofilmu. Třetím mechanismem mohou enzymy působit proti činnosti QS. A posledním mechanismem, kterým enzymy dokážou inhibovat tvorbu biofilmů, je zvýšení katalytické účinnosti antibakteriálních látek proti bakteriálním biofilmům (Toushik et al. 2020).

Štěpení různých vazeb polysacharidů v bakteriálních biofilmech je katalyzován zejména hydrolázami a lyázami. Dalšími enzymy podílející se na inhibici biofilmu jsou nukleázy, které inhibují biofilm jak u grampozitivních, tak i gramnegativních bakterií (Toushik et al. 2020). Díky bohatému složení matrice biofilmu a substrátové specifitě enzymů je pro prevenci a eradikaci bakteriálních biofilmů často nutné použít směs enzymů. Kromě toho je také známo, že kombinace enzymů a dalších látek redukujících biofilm vede ke zvýšení celkové antibiofilmové aktivity (Borges et al. 2020; Toushik et al. 2020).

Studie zabývající se antibiofilmovou aktivitou enzymů proti biofilmům *S. aureus* zjistila pozitivní účinky metaloproteázy, která na polystyrénové mikrotitrační destičce redukovala biofilm *S. aureus* o 62–78 %. Dále byla zjištěna antibiofilmová aktivita působící proti biofilmům tvořeným *S. aureus* i u DNase I, u které došlo k redukci biofilmu o 80 %. Dále při působení DNase I na biofilm MRSA, došlo k odstranění 58 % biofilmu. Lysostafin odstranil smíšený biofilm *S. aureus* citlivého na methicilin a MRSA z 76 %. U α -amylázy došlo k odstranění 97 % smíšeného biofilmu (Toushik et al. 2020).

1.1.3.4 Biosurfaktenty

Biosurfaktenty neboli také mikrobiální povrchově aktivní látky jsou extracelulárně syntetizované, nízkomolekulární (5-15 kDA), amfifilní, povrchově aktivní molekuly, které mají jak hydrofobní, tak hydrofilní charakter (Toushik et al. 2020). Tyto mikrobiální povrchově aktivní látky tvoří různé povrchově aktivní molekuly, mezi které patří neutrální lipidy, mastné kyseliny, fosfolipidy, látky podobné proteinům, komplexy polysacharidů a proteinů a lipopeptidy a glykolipidy (Yan et al. 2019). Biosurfaktenty (BS) se rozdělují do kategorií dle jejich chemického složení a mikrobiálního původu. Molekuly BS mají schopnost oslabovat interakce mezi bakterie-bakterie a bakterie-povrch (Toushik et al. 2020). Mezi činnosti BS patří například i usnadnění transportu živin svým produkujícím mikroorganismům, dále mohou zasahovat do interakcí mezi mikroby a hostiteli a do mechanismů sensing quorum (Giordani et al. 2019).

Díky svým vysoce účinným disperzním a antiadhezivním účinkům, které inhibují kolonizaci patogeny, jsou BS považovány za silné „zelené“ antimikrobiální látky (Toushik et al. 2020). Při srovnání se syntetickými povrchově aktivními látkami vykazují BS jedinečné vlastnosti, jako je jejich přirozený původ, jejich snadná příprava, nízká toxicita, vysoká biologická rozložitelnost a jejich schopnost účinně inhibovat biofilmy během různých fyzikálních podmínek (Yan et al. 2019).

Při absorpci BS na povrch přicházející do styku s potravinami může změnit hydrofobicitu povrchu a snížit tak proces bakteriální adheze či narušit tvorbu zralého biofilmu. Například mikrobiální glykolipidy z mořské bakterie sp. MAB36 může úspěšně měnit povrch bakteriálních buněk změnou složení mastných kyselin v membráně, čímž zvyšuje inhibici biofilmů tvořených např. *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus*, ale i *S. aureus*. Dalším

příkladem mohou sloužit například rhamnolipidy, které jsou povrchově modifikujícími molekulami z *P. aeruginosa*, které mohou dispergovat více než 98 % bakteriálních biofilmů a působit baktericidně proti *E. coli* a *S. aureus* (Toushik et al. 2020). BS jsou produkovány mnoha druhy bakterií, mezi které patří např. druhy *Candida* uvolňující sophorolipidy, *Pseudomonas aeruginosa* uvolňující rhamnolipidy či *Bacillus subtilis* uvolňující iturin a surfaktin (Yan et al. 2019).

Mezi typy povrchově aktivních látek jsou nejrepresentativnějšími členy BS lipopeptidy, které účinně dispergují bakteriální biofilmy. Například lipopeptidová sloučenina polymyxin D1 z mořské mikroflóry *Paenibacillus polymyxa* vykazuje silnou antibiofilmovou aktivitu jak proti monofilním, tak i smíšeným bakteriálním biofilmům. Mezi BS inhibující tvorbu biofilmu *S. aureus* patří například rhamnolipid, surfaktin, NIOT-AMKV06, polymyxin, furan či sophorolipid (Toushik et al. 2020).

1.1.3.5 Antimikrobiální povrchy

Antimikrobiální povrchy můžeme rozdělit na anorganické a organické, přičemž anorganické povrchy jsou označovány za stabilnější ve vnějších podmínkách. V posledních letech na sebe přitáhlo velkou pozornost využití tenkých vrstev kovů a oxidů kovů, u kterých byly objeveny jedinečné antibakteriální, fyzikální, chemické, optické, ale i elektrické vlastnosti. Díky těmto vlastnostem našly své využití ve sklářských technologiích, biomedicinském inženýrství, optoelektronice, ale i v mnoha dalších odvětvích. Jedná se o dvourozměrné nanostrukturované tenké filmy spadající do kategorie nízkodimenzionálních systémů, které k zabránění vzniku biofilmu využívají přítomnosti reaktivních forem kyslíku. Jedním z nejslibnějších anorganických oxidů kovů se jeví oxid zinečnatý. Pro svou antibakteriální činnost se stal vhodným antimikrobiálním činidlem pro možné využití při balení a konzervaci potravin, výrobě kožních masťů či dodávání léčiv. Při obohacení oxidu zinečnatého některými prvky, konkrétně se jedná o cín, mangan, hořčík, antimon, kobalt, dusík a Indium, dochází ke zvýšení jeho antimikrobiální účinnosti (Kumar et al. 2021).

1.1.3.6 Rostlinné silice

Léčivé rostliny, byliny, koření a olejnatá semena jsou bohatým zdrojem přírodních antioxidantů, jako jsou flavonoidy, kurkuminoidy, třísloviny, terpenoidy a lignany. S přibývajícím znalostmi o jejich antioxidačních a antimikrobiálních vlastnostech roste zájem o extrakci těchto přírodních bioaktivních sloučenin, které našly své uplatnění v potravinářském a farmaceutickém průmyslu (El-Maati et al. 2016).

Rostlinné silice (RS) jsou těkavé olejovité kapaliny extrahované z aromatických rostlinných materiálů, které tvoří nepodporující médium pro růst mnoha bakterií a hub (Bazargani & Rohloff 2016; Cui et al. 2020; Kang et al. 2019). Jsou to těkavé látky přirozeně produkováné sekundárním mechanismem rostlin, které se získávají z částí rostlin, jako jsou květy, pupeny, stonky, listy, semena, kořeny, ovoce, kůra či dřevo (Lee et al. 2019; Tariq et al. 2019). RS jsou u rostlin skladovány v dutinách, sekrečních a epidermických buňkách, kanálech či žlázových trichomech (Tariq et al. 2019).

RS jsou komplexní směsi přírodních sloučenin, které obsahují přibližně 20-60 složek zastoupených v různém množství. Hlavní složky, které jsou typicky dvě nebo tři, tvoří téměř 20-70 % složení ve srovnání s jinými složkami přítomnými v omezeném množství. Unikátní biologické vlastnosti a vůně éterických olejů jsou dány právě hlavními složkami RS, které tvoří terpeny a fenyylpropanoidy. Díky bohaté přítomnosti již zmíněných terpenů, fenolických látek a aldehydů, které inhibují celou řadu bakteriálních, plísňových, ale i virových patogenů, našly RS bohaté uplatnění v biolékařství (Tariq et al. 2019). Mnoho RS má nejen přímou antimikrobiální aktivitu, ale jsou také hodnoceny jako zdroj možných modifikátorů rezistence (Cui et al. 2020).

Schopnost odolávat RS se u bakterií vyskytuje jen zřídka, a to z důvodu složité struktury a různých mechanismů funkce RS (Saki et al. 2020). Pro své širokospektré antimikrobiální účinky jsou považovány za přírodní a bezpečnou alternativu k syntetickým antiseptikům a antibiotikům (Kang et al. 2019). Antimikrobiální aktivita RS je způsobena jejich vysokou hydrofobicitou, která umožňuje RS procházet bakteriálními membránami a působit přímo na ně, což má za následek ztrátu iontů a snížení membránového potenciálu, ztrátu funkce protonových pump a vyčerpání ATP nebo může vést k poškození proteinů, lipidů a organel přítomných v bakteriální buňce a způsobit tím buněčnou smrt (Pesavento et al. 2015).

Dále byla u RS potvrzena antioxidační činnost a schopnost odpuzovat hmyz. Další unikátní vlastností některých RS je schopnost urychlit transdermální pronikání drog. Tyto RS jsou schopné pronikat kůží a minimalizovat tak bariérovou odolnost. Tyto RS jsou označovány jako sorpční promotory či látky zvyšující penetraci (Tariq et al. 2019).

Svým složením představují komplexní a heterogenní směsi látek zahrnujících několik strukturních tříd s různým biosyntetickým původem. Hlavní skupinu tvoří terpeny a terpenoidy spolu s aromatickými či alifatickými sloučeninami. Mezi jejich výhody v použití můžeme zařadit jejich snadnou izolaci z rostlinného materiálu, nízkou toxicitu u savců a jejich snadný a rychlý rozklad ve vodě (Bazargani & Rohloff 2016). Složení RS v rostlinách se může lišit v závislosti na různých faktorech, mezi které patří např. původ rostliny a její vegetační období při sklizni, část rostliny určená k extrakci a další (Saki et al. 2020).

V posledních letech se zvyšuje zájem o použití biologicky aktivních sloučenin izolovaných z rostlin k léčbě mikrobiálních infekcí způsobených rezistencí na antibiotika. Studie zjistily, že éterický olej z *litsea cubeba*, *oregana* a *hřebíčku* účinně inhibují MRSA (Cui et al. 2020). Další studie zabývající se antibiofilmovou aktivitou éterických olejů proti biofilmům *S. aureus* potvrdily účinnost thymochinonu, látek získaných ze semen *Nigella sativa* L., oleje z citronové trávy, oregánového oleje, karvakrolu a thymolu, cassia, oleje z balzámu peruánského, oleje z červeného tymiánu, čajovníkového oleje, dále pak oleje z levandule a meduňky (Bazargani & Rohloff 2016). U RS byly také potvrzeny synergické účinky v kombinaci s antibiotiky či jinými oleji. Tato schopnost synergie RS a antibiotik může zabránit šíření bakteriální rezistence (Saki et al. 2020).

1.1.3.6.1 Kardamová silice

Kardamom se získává ze semen *Elettaria cardamomum* Maton patřící do čeledi Zingiberaceae. Pěstuje se většinou v jižní Indii, Tanzanii, Guatemale a na Srí Lance (Keivani et al. 2018). Zelený kardamom se po celém světě používá pro kulinářské a tradiční farmaceutické aplikace, kdy se využívá k léčbě infekcí zubů a dásní, plic a plicní tuberkulózy

a poruch zažívacího traktu a ledvin. Sušené plody této rostliny jsou uváděny na trh jako jedno z nejdražších koření (Preedy 2015). Kardamové silice (KS) se využívá k aromatizaci široké škály zpracovaných potravin, nápojů, želatiny, cukrovinek, ale i mléčných výrobků. Hlavními aromatickými složkami KS jsou 1,8-cineol, α -terpineol, α -pinen, β -pinen, limonen a allo-aromadendren. U KS jsou prokázány protizánětlivé, antifungální a antimikrobiální aktivity (Keivani et al. 2018).

Vysokou aktivitou proti MRSA oplývá i KS, u které bylo zjištěno, že účinně odstraňuje biofilm z MRSA na povrchu různých materiálů (plast, ocel a sklo). Na základě studií bylo také zjištěno, že KS nejprve zničí bariéru biofilmu a způsobí, že bakterie ztratí metabolickou aktivitu. Druhým krokem pak KS inhibovala počáteční adhezi MRSA a lze předpokládat, že inhiboval i tvorbu extracelulárního polymeru (Cui et al. 2020).

1.1.3.6.2 Máťová silice

Mentha piperita L., je důležitá léčivá rostlina patřící do čeledi *Lamiaceae*. *Mentha piperita* se dnes již pěstuje ve všech částech světa. Primárně se pěstuje pro svůj olej, který se získává z listů kvetoucí rostliny. Máťový olej se používá k aromatizaci farmaceutických a orální přípravků, jako jsou zubní pasty a ústní vody. Máťový esenciální olej vykazuje inhibiči proti bakteriím, houbám i kvasinkám (Shalayel et al. 2017). Máťová silice (MS) obsahuje většinu biologických látek vyskytujících se v mátě, včetně mentolu a mentonu. U MS byl potvrzen inhibiční účinek na patogeny přenášené potravinami. Dále byla u MS potvrzena silná antibakteriální a antibiofilmová aktivita proti *S. aureus*. Buněčné membrány *S. aureus* byly po aplikaci MS nevratně poškozeny. Dále MS účinně zabraňovala tvorbě biofilmu na polystyrenových mikrodestičkách. Dále při studiu bylo zjištěno, že působením MS na zralý biofilm došlo k jeho inaktivaci (Kang et al. 2019).

1.1.3.6.3 Oregánová silice

Origanum vulgare je běžná bylina široce rozšířená ve Středomoří a Asii. V obsahu oregánové silice (OS) jsou vysoce zastoupeny fenolické látky, včetně karvakrolu, thymolu a γ -terpinenu, jimž jsou také silné antibakteriální a antioxidační účinky přisuzovány (Lee et al. 2019). U OS byl zjištěn inhibiční účinek na různé bakterie a také bylo objeveno jeho široké spektrum antibakteriálních vlastností. Bylo zjištěno, že svým působením na *S. aureus* dokázal OEO zvýšit propustnost jeho buněčných membrán a tím způsobit nevratné poškození buněčné membrány. Dále byla u OS objevena schopnost inhibovat respirační metabolismus MRSA ovlivněním metabolitů a klíčových enzymů cyklu TCA (Cui et al. 2019). OS a karvakrol, který tvoří většinou složku OS, mají silné inhibiční účinky proti *S. aureus*. Inhibičně působí jak na planktonické buňky *S. aureus*, ale i na tvorbu biofilmu na polystyrenových površích (Dos Santos Rodrigues, 2017). Studie také potvrdily, že OS je vhodná i jako potravinářská přídatná látka, která působí bakteriostaticky a baktericidně už při koncentraci 0,5 %, při které nedochází k změně chuti potravin. Může tedy sloužit jako konzervační látka zabraňující vzniku kontaminace potravinářskými patogeny (Pesavento et al. 2015).

1.1.3.6.3. Čajovníková silice

Čajovníková silice (ČS) získaná z australské původní rostliny *Melaleuca alternifolia* na sebe upozornila svými širokospektrálními antimikrobiálními a protizánětlivými účinky (Kwieciński et al. 2009; Thomsen et al. 2013). Antimikrobiálně působí jak proti grampozitivním, tak i proti gramnegativním bakteriím, včetně antimikrobiálně rezistentních a multirezistentních mikroorganismů MIC se obecně u ČS pohybují v rozmezí 0,12 – 0,5 %. Minimální baktericidní koncentrace se u ČS pohybují v rozmezí 0,12 – 1 %. ČS také přitahuje zvláštní pozornost pro své možné využití pro dekolonizaci nosičů MRSA (Thomsen et al. 2013).

ČS se skládá přibližně ze sta různých sloučenin. Jednou z hlavních antibakteriálních složek je terpinen-4-ol. Při studii vlivu ČS na *S. aureus* bylo prokázáno, že ČS účinně zabíjí *S. aureus* jak v suspenzi, tak i v biofilmech. Dále bylo zjištěno, že už 1 % ČS byla schopna inhibovat metabolismus biofilmů *S. aureus*. Zejména u vyšších koncentrací ČS dochází k eradikaci biofilmu nejen pomocí usmrcení bakterií, ale také částečně poškozením extracelulární matrice. Díky těmto vlivům pak dochází k odstranění biofilmu z povrchu (Kwieciński et al. 2009).

Některé studie však naznačují, že expozice ČS může přispět k rozvoji antimikrobiální rezistence u lidských patogenů. Tyto studie uvádí, že při vystavení bakterií nízkým, subinhibičním hladinám ČS došlo u těchto bakterií ke zvýšení jejich MIC na ČS a několik dalších antimikrobiálních látek (Thomsen et al. 2013).

1.1.3.6.4 Hřebíčková silice

Hřebíček má obrovský potenciál jako konzervační prostředek proti kažení potravin a patogenním bakteriím (El-Maati et al. 2016; Heredia-Guerrero et al. 2018). Hřebíčková silice (HS) vzniká extrakcí materiálu z rostliny *Syzygium aromaticum* (Heredia-Guerrero et al. 2018). Jeho největší složku tvoří eugenol, který vykazuje silné insekticidní a antioxidační vlastnosti (El-Maati et al. 2016; Heredia-Guerrero et al. 2018). Obsahuje však i řadu dalších bioaktivních sloučenin, jako jsou například seskviterpeny a triterpenoidy (El-Maati et al. 2016). HS byly zjištěny antimikrobiální a antioxidační vlastnosti (Heredia-Guerrero et al. 2018). Je účinný proti mnoha bakteriím, např. proti orálním bakteriím, *E. coli*, *Salmonella enterica* či *Staphylococcus aureus* (El-Maati et al. 2016). Své uplatnění našel například jako přísada do potravin, ale hojně se jeho účinků využívá například i v zubní péči, kde působí antibakteriálně proti orálním bakteriím způsobující zubní kaz a periodontální onemocnění (El-Maati et al. 2016; (Heredia-Guerrero et al. 2018)). Kromě již zmíněné antimikrobiální aktivity byla u HS potvrzená také inhibice tvorby biofilmu *S. aureus* a anti-kvorové vlastnosti (Alibi et al. 2020). Při studii antibakteriálních účinků HS na bakterie bylo zjištěno, že vyšší odolnost proti tomuto esenciálnímu oleji se vyskytuje u gramnegativních bakterií, která je prisuzována vnější membráně těchto bakterií, která je před chemickými látkami a léky chrání (El-Maati et al. 2016).

1.1.3.6.5 Koriandrová silice

Coriandrum sativum L. je jednoletá bylina z čeledi *Apiaceae*. pocházející ze středomořské oblasti. Dnes je již široce pěstována po celém světě jako kulinářská a léčivá bylina (Beyzi et al. 2017; Molina et al. 2020). Koriandrová silice (KS) je široce používána v potravinářském, zdravotnickém, kosmetickém, ale například i v čokoládovém průmyslu po

celém světě (Beyzi et al. 2017). Jako koření se používají čisté a suché plody. Plody koriandru obsahují těkavé i pevné oleje, bílkoviny, celulózu, pentozany, třísloviny, šťavelany a minerály. Studie odhalily, že ve svém složení obsahuje bioaktivní složky s antimikrobiálními, antioxidačními, protizánětlivými, analgetickými, ale i dalšími účinky (Molina et al. 2020). Hlavní složku KS tvoří linalool, následovaný kafrem a geraniolem. Linalool může tvořit až 90 % složení KEO. Dále může KS ve svém složení obsahovat například γ -terpinen, α -pinen, geraniol či geranyl-acetát (Beyzi et al. 2017).

Studie nepotvrdily antibakteriální účinnost na *S. aureus* v koncentracích 62,5-1000 $\mu\text{g/ml}$, za to však poukázaly na schopnost KS inhibovat biofilm *S. aureus*. U KS byla potvrzena silná účinnost inhibice metabolické aktivity biofilmu *S. aureus*, která je přisuzována účinkům olejové kyseliny (Molina et al. 2020).

1.1.3.6.5 Skořicová silice

Skořice neboli *Cinnamomum zeylanicum* L. patří do čeledi Lauraceae a rodu *Cinnamomum* (Mohammadi et al. 2020; Zhang et al. 2016). Skořice je považována za jedno z nejoblíbenějších a nejstarších koření používaných jako tradiční bylinný lék (Saki et al. 2020), které je široce distribuováno v Číně, Indii a Austrálii (Zhang et al. 2016). Díky svým antibakteriálním a antioxidačním účinkům našla své uplatnění například v potravinářství, kosmetice a lékařství. Hlavní složkou skořicové silice (SS) je cinnamaldehyd, který může tvořit až 90 % složení SS (Zhang et al. 2016). Dále můžeme v SS najít i další látky jako například benzaldehyd, styren, benzykarboxaldehyd, kyselinu trans-skořicovou, kyselinu (Z,Z)-9,12-oktadekadienovou, eugenol a kumarín (Saki et al. 2020; Zhang et al. 2016).

Zhang et al. (2011) stanovily během studie antibakteriální aktivity SS na *S. aureus* hodnoty MIC a MBC. Hodnota MIC byla stanovena pro koncentraci 1.0 mg/ml. Hodnota MBC pak byla stanovena pro koncentraci 2.0 mg/ml (Zhang et al. 2016).

Ze studií zkoumajících antimikrobiální účinky SS na MRSA vyšlo najevo, že MRSA je na působení SEO velmi citlivá. Saki et al. (2020) uvádějí MIC skořicového esenciálního oleje na MRSA 1,25 $\mu\text{l/ml}$, při které došlo k inhibici 40 %. (Saki et al. 2020).

1.2 Cannabis sativa L.

1.2.1 Charakteristika

Konopí (*Cannabis sativa* L.), známé také jako indické konopí je jednoletá krytosemenná bylina patřící do čeledi Cannabaceae, pocházející se Střední Asie, kde hrála historicky důležitou roli při léčbě a výživě, ve které působila jako bohatý zdroj vlákniny (Bonini et al. 2018; Frassinetti et al. 2020; Nafis et al. 2019). Konopí však bylo používáno i během náboženských rituálů, při kterých mělo usnadnit meditaci a komunikaci s bohy (Bonini et al. 2018). *Cannabis sativa* L. je široce pěstována v oblastech s mírným podnebím. V tradiční medicíně jsou listy *C. sativa* dobře známé pro své hořké, opojné, tonické, analgetické a afrodiziakální vlastnosti (Nafis et al. 2019). V medicíně se *C. sativa* používá pro své antioxidační, protizánětlivé, antiemetické, antiparazitické, antibakteriální, antivirové, protiplísňové, antipyretické, diuretické, imunoprotektivní vlastnosti. Dále se *C. sativa* využívá pro mírnění bolestí, hojení kožních ran a léčbě krevních poruch (Chang et al. 2021). Své využití našel i při léčbě hysterie, nespavosti, průjmů, břišních poruch, kožních onemocnění, epilepsie, bolestí, sklerotického multiplexu,

nevolností a zvracení, Parkinsonovy choroby, schizofrenie, glaukomu a mnoha dalších nemocí. Přestože *C. sativa* působí prospěšně při léčbě mnoha onemocnění, existuje také jistá obava spojená s nežádoucími účinky na zdraví (Coronado-Álvarez et al. 2021; Nafis et al. 2019).

Lékařské využití *C. sativa* sahá zhruba před 5000 let, kdy císař Chen Nung vytvořil první čínský lékopis. Podle tohoto starodávného textu byla *C. sativa* předepisována na únavu, revmatismus a léčbu malárie. Čínští lékaři v té době také využívaly semena *C. sativa* jako zdroj rostlinných olejů a bílkovin. Semena *C. sativa* jsou bohatá na γ -linolovou kyselinu, která je doporučována k léčbě různých ekzémů a zánětlivých onemocnění (Bonini et al. 2018). Kromě γ -linolové kyseliny obsahují semena *C. sativa* také linolovou kyselinu, α -linolenovou kyselinu, stearidonovou kyselinu, terpenoidy, β -sitosterol a methylsalicylát (Baldino et al. 2020).

Rozlišují se dva hlavní typy konopí, a to drogový typ konopí a průmyslový typ konopí, které se od sebe liší zejména svým složením. Drogový typ konopí (*C. sativa subsp. indica*) může obsahovat až 20 % psychoaktivní sloučeniny D₉-tetrahydrokanabinol (THC), zatímco průmyslový typ konopí (*C. sativa subsp. sativa*) je typický svým nízkým obsahem THC. Ve většině evropských zemí je současná horní zákonná hranice pro pěstování konopí pro výrobu vláken a semen 0,2 % THC v sušině. Průmyslové konopí je využíváno jako zdroj semen, vlákniny a semenného oleje. Dlouhou dobu se konopná semena používala především jako krmivo pro zvířata. Dnes jsou však konopná semena a výrobky z nich čím dál více uznávána jako vynikající zdroj esenciálních aminokyselin a mastných kyselin i pro výživu člověka (Frassinetti et al. 2020).

1.2.2 Složení bioaktivních látek

Během posledních 10 let vznikl velký zájem o extrakci silic z *Cannabis sativa L* (Baldino et al. 2020). Z *C. sativa* bylo identifikováno více než 500 různých molekul (Coronado-Álvarez et al. 2021), jejichž složení se významně liší v závislosti na rostlinné části, agronomických a environmentálních faktorech. Nejvíce fotochemikálií můžeme nalézt v květenství a listech *C. sativa* (Kornpointner et al. 2021). Nejaktivnějšími sloučeninami jsou kanabinoidy, které spadají do třídy terpenofenolových sloučenin. Kanabinoidy se akumulují především v dutině trichomu ženských květů (Bonini et al. 2018) a v celé rostlině bylo identifikováno přes 104 kanabinoidů (Baldino et al. 2020). Konopná květenství jsou skutečně velmi bohatým zdrojem kanabinoidů, které také představují hlavní chemickou třídu sloučenin přítomných v této rostlině. Nejčastěji zastoupenou sloučeninou z třídy kanabinoidů je kanabidiolová kyselina (CBDA), která je biosyntetizována prekurzorem kanabigerolové kyseliny (CBGA). Tyto nativní kyselé kanabinoidy podléhají spontánní dekarboxylaci působením světla a tepla, což vede k tvorbě jejich neutrálních protějšků, a to kanabidiolu (CBD) a kanabigerolu (CBG). Mezi další kanabinoidy nalezené v konopí patří kanabichromenová kyselina (CBCA), kanabichromen (CBC), kanabidivarinová kyselina (CBDVA) a kanabidivarin (CBDV), přičemž poslední dva jmenované kanabinoidy jsou homology CBDA a CBD (Corni et al. 2020).

Kanabinoidům v konopí je připisováno hned několik biologických vlastností, mezi které patří antioxidační, protizánětlivé, antimikrobiální a neuroprotektivní účinky. Spolu s kanabinoidy jsou v květenstvích konopí přítomny i další bioaktivní sloučeniny, jako jsou flavonoidy a terpeny (Corni et al. 2020).

Při analýze složení listu *C. sativa* pomocí GC-MS byla zjištěna přítomnost mnoha biologicky aktivních látek, mezi kterými byly například: (E)-Caryofylen, α -humulen, karyofylenoxid, monoterpenové uhlovodíky, okysličené monoterpeny, seskviterpenové uhlovodíky, okysličené seskviterpeny, linalool, myrcén, limonen, α -pinen, β -pinen, carveol, α -terpineol, ale i další sloučeniny (Nafis et al. 2019).

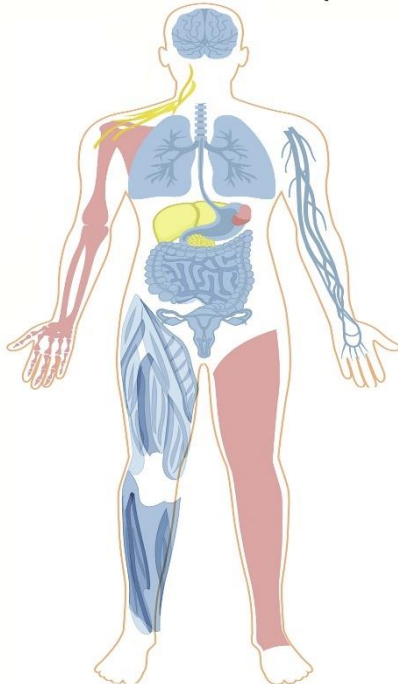
1.2.2.1 Kanabinoidy

Kanabinoidy jsou aromatické uhlovodíkové sloučeniny tvořené C_{21} a obsahující kyslík. Přírodně se vyskytují v rostlině *C. sativa*, jakož i jiné přírodní nebo syntetické sloučeniny, které napodobují jejich chemickou strukturu a funkci (Chye et al. 2020). Syntetizují se zejména ve žláznatých trichomech, ale můžeme je nalézt i v rostlinné matici, kde se vyskytují jako neutrální fytocannabinoidy a jako fytocannabinoidové kyseliny, které zahrnují Δ^9 -tetrahydrokanabinolovou kyselinu (Δ^9 -THCA), kanabidiolovou kyselinu (CBDA) a kanabigerovou kyselinu (CBGA). Tyto kyselé kanabinoidy jsou však považovány za neaktivní a k získání jejich aktivní formy dochází prostřednictvím dekarboxylace, při které dochází k přeměně kyselých kanabinoidů na jejich neutrální aktivní formy (Baldino et al. 2020).

Jedním z nejvíce zkoumaných kanabinoidů je Δ^9 -tetrahydrokanabinol (Δ^9 -THC), který je charakteristický svými psychotropními farmakologickými účinky. Mezi účinky vyvolané Δ^9 -THC spadá paranoia, halucinace, úzkost a kognitivní deficity. Tyto účinky jsou spojeny s vazbou Δ^9 -THC k CB_1/CB_2 kanabinoidním receptorům jako součást molekulárního mechanismu účinku (Coronado-Álvarez et al. 2021).

Primárně prostřednictvím presynaptických CB_1/CB_2 kanabinoidních receptorů působí na modulaci uvolňování neurotransmiterů v centrálním nervovém systému. Vzhledem k tomu,

**Distribution of the
CB1/CB2 cannabinoid receptors**



Obrázek 2 CB_1 a CB_2 cannabinoidní receptory
(Coronado-Álvarez et al. 2021)

že CB₁/CB₂ receptory jsou primárně spojeny s proteiny Gi/o typu G citlivými na pertusový toxin, po jejich aktivaci dochází k poklesu intracelulární koncentrace cAMP inhibicí aktivity adenylátcyklázy. Kanabinoidní receptory byly zmapovány jak u člověka, tak i u několika dalších živočišných druhů. Kanabinoidní receptory CB₁ byly nalezeny v CNS, zatímco kanabinoidní receptory CB₂ byly nalezeny v makrofázích, leukocytech, slezině, plicích a varlatech (Coronado-Álvarez et al. 2021). Mezi další fytoKANABINOIDY patří již výše zmíněné CBG, CBD, Δ⁹-THC a CBC (Nalli et al. 2018).

Dalším velmi známým canabinoidem vyskytujícím se v *C. sativa* je cannabidiol (CBD). Na rozdíl od THC u cannabidiolu (CBD) nebyly pozorovány žádné psychotropní účinky a několik studií zabývajících se vlastnostmi CBD uvádí jejich antikonbulzivní, neuroprotektivní, antioxidační, protizánětlivé, analgetické a antiemetické vlastnosti. CBD vykazuje velmi širokou farmakologickou aktivitu. Na rozdíl od THC má nízkou afinitu k CB₁ a CB₂ a působí jako inverzní agonista těchto receptorů. Může tak antagonistovat některé účinky THC, jako např. úzkost, hlad a tachykardii (Alves et al. 2020).

Jednotlivé kanabinoidy či jejich směsi lze použít při léčbě zánětlivých a neurodegenerativních onemocnění, epilepsii a neuropatických bolestech (Baldino et al. 2020).

1.2.3 Antimikrobiální účinky

Rostliny *Cannabis sativa* L. jsou bohaté na přírodní sloučeniny s antimikrobiálními vlastnostmi. Díky svému složení představují extrakty z *Cannabis sativa* L. slibné řešení v boji proti růstu rezistence vůči antibiotikům. Mnoho studií zabývajících se *Cannabis sativa* L. poukázalo na antibakteriální aktivitu bioaktivních sloučenin z těchto rostlin, které působí na grampozitivní a gramnegativní multirezistentní bakterie, přičemž dokáže antibakteriálně působit také i na MRSA (Frassinetti et al. 2020). Mezi biologicky aktivní látky vyskytující se v *C. sativa* patří kromě již zmíněných fytoKANABINOIDŮ také alkaloidy, flavonoidy, glykosidy, pryskyřice, monoterpeny, seskviterpeny a steroidy, steroly, voskové estery, n-alkany, aldehydy a alkoholy (Baldino et al. 2020; Chakraborty et al. 2018; Nalli et al. 2018).

Bylo navrženo hned několik antimikrobiálních mechanismů účinků této rostliny na bakteriální buňky. Fytochemikálie obsažené v *Cannabis sativa* L. mohou obecně působit poškození bakteriální membrány, inhibovat tvorbu bakteriálního biofilmu nebo potlačovat faktory virulence, jako jsou enzymy a toxiny (Frassinetti et al. 2020).

C. sativa je již dlouho známa tím, že obsahuje antibakteriální kanabinoidy. U všech pěti hlavních kanabinoidů, tj. kanabidiol, kanabichromen, cannabigerol, THC a kanabinol byla prokázána silná aktivita vůči MRSA (Appendino et al. 2008). Nafis et al. (2019) stanovili hodnotu MIC esenciálního oleje získaného z *C. sativa* působícího proti *S. aureus* v koncentraci 4,7 mg/ml.

2 Metodika

2.1 Použité bakterie, rostlinné materiály, chemikálie a přístroje

2.1.1 Použité bakterie

Staphylococcus aureus ATCC 25923, (OXOID, UK)
Staphylococcus aureus ATCC 29213, (OXOID, UK)
Staphylococcus aureus ATCC 33592, (OXOID, UK)
Staphylococcus aureus ATCC 43300, (OXOID, UK)

2.1.2 Použité chemikálie

Tetracyklin 88 %
Ethanol 96,6 %, denaturovaný lékařským benzínem
Glukóza, (OXOID, UK)
Chlorid sodný, (DORAPIS, ČR)
Methanol G. R., (lach:ner, ČR)
Krystalová violet (C.I. 42555), (Sigma-Aldrich, ČR)
Trizma base, (Sigma-Aldrich, ČR)
Chlorid draselný, (OXOID, UK)
Tween 80, (lach:ner, ČR)
Mueller-Hinton bujón (MHB), (OXOID, UK)
Brain-Heart-Infusion bujón (BHI), (OXOID, UK)
Trypton-sójový bujón (TSB), (OXOID, UK)
Kyselina chlorovodíková 35 % p. a., (lach:ner, ČR)

2.1.3 Použité přístroje

McFarland Densitometer DEN-1B (biosan)
Termomixer PHMP-4 (Grant-bio)
Reader na mikrotitrační destičky Synergy H1 (BioTek)
Váha AB45-S, (METTLER TOLEDO)
Váha ES 220A, (SWISS MADE)
Vortex RS-VF10, (PHOENIX Instrument)
Ultrazvuková čistička BANDELIN, (SONEC DIGITEC)
Soxhletův extraktor
Pipety eppendorf, Research plus
pH metr, pH 50

2.1.4 Příprava médií

V počáteční fázi pokusu jsme si připravili celkem pět médií, a to Mueller-Hinton bujón určený pro přípravu inokula a čtyři různá média určená pro kultivaci, a to:

- Trypton-sójový bujón (TSB) s přidaným 1 % glukózy
- Trypton-sójový bujón (TSB) s přidaným 1 % glukózy a 2 % chloridu sodného

- Brain-Heart-Infusion bujón (BHI) s přidaným 1 % glukózy
- Brain-Heart-Infusion bujón (BHI) s přidaným 1 % glukózy a 2 % chloridu sodného

Bujóny byly naváženy dle návodu uvedeném na obale bujónů a smíchány spolu s pufrům připraveným z trizma base (6,1 g/l), chloridu sodného (8 g/l) a chloridu draselného (0,2 g/l), u kterého byla upravena hodnota pH pomocí kyseliny chlorovodíkové na 7,6.

2.1.5 Extrakce silice

Konopná silice byla extrahována z květenství odrůdy Nurse Jackie (ČZU v Praze, ČR), která byla až do extrakce skladována v sušeném stavu při teplotě -20 °C. Extrakce byla provedena vodní destilací pomocí clavengerova aparátu. Hmotnost rostlinného materiálu činila 42,32 g. Extrakce probíhala po dobu 3,5 hodin a její výtěžnost byla 320 µl. Extrakci jsme získali konopnou silici světlazelené barvy.

2.1.6 Kultivace bakteriálního biofilmu

2.1.6.1 Příprava inokula

Inokula bakterií *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 byla kultivována v tekutém živném médiu Mueller-Hinton bujón při teplotě 35 °C po dobu 24 hodin. Těsně před samotným zaočkováním mikrotitračních destiček bylo inokulum standardizováno postupným přidáním do čistého kultivačního média až do navýšení density o 0,5 jednotek Mc Farlanda.

2.1.6.2 Příprava antibiotika a konopné silice

Bylo odebráno a zváženo určité množství tetracyklinu, které bylo následně rozpuštěno v 98 % ethanolu tak, aby splňovalo požadovanou koncentraci. Takto připravený roztok tetracyklinu se zhomogenizoval pomocí vortexu tak, aby byl roztok homogenní. Následně z rozpuštěného tetracyklinu bylo odebráno 10 µl, které byly přidány do 990 µl bujónu BHI s 1 % glukózy a 2 % chloridu sodného.

Konopná silice byla extrahována z genotypu Nurse Jackie prostřednictvím extrakce vodní párou. Dále byla silice rozpuštěna v Tweenu 80 a 98 % ethanolu, které byly smíchány v poměru 1:2 a následně pomocí vortexu a ultrazvukové čističky po dobu 5 minut bez ohřevu, řádně promíchány tak, aby vznikl homogenní roztok. Následně bylo z roztoku obsahujícího silici odebráno 10 µl, které byly následně přidány do 990 µl bujónu BHI s 1 % glukózy a 2 % chloridu sodného tak, aby došlo ke zředění silice na koncentraci 1024 µg/ml.

2.1.6.3 Příprava pro stanovení hodnoty MIC u *S. aureus* při synergickém působení tetracyklinu a konopné silice

Do bujónu BHI s 1 % glukózy a 2 % chloridu sodného o objemu 80 µl byl dvojitým ředěním přidán roztok tvořený směsí tetracyklinu o počáteční koncentraci 2048 µg/ml a konopné silice o počáteční koncentraci 1024 µg/ml. Tyto koncentrace byly vybírány tak, aby byly 4krát vyšší než MIC u samostatně testovaného tetracyklinu a silice. Po dokončení dvojitého zředění bylo přidáno 20 µl bujónů BHI s 1 % glukózy a 2 % chloridu sodného spolu s bakteriemi *S. aureus*, který byl připraven pomocí McFarland Densitometru, kdy došlo ke

změření optické hustoty bujónu a následně k její navýšení o 0,5 McFarlandovy jednotky pomocí přidáním inokula.

Po zaočkování se daly mikrotitrační destičky kultivovat do termomixeru při 250 otáčkách, 35 °C po dobu 24 hodin.

2.1.6.4 Příprava pro stanovení hodnoty BIC u *S. aureus* při synergickém působení tetracyklinu a konopné silice

Do bujónu BHI s 1 % glukózy a 2 % chloridu sodného o objemu 80 µl byl dvojitým ředěním přidán roztok tvořený směsí tetracyklinu o počáteční koncentraci 1 µg/ml a konopné silice o počáteční koncentraci 256 µg/ml. Tyto koncentrace byly vybírány tak, aby byly 4krát vyšší než MIC u samostatně testovaného tetracyklinu a silice. Po dokončení dvojitého zředění bylo přidáno 20 µl standardizovaného inokula, takže počáteční koncentrace bakterií byla přibližně 4×10^7 KTJ.

Po zaočkování se daly mikrotitrační destičky kultivovat do inkubátoru s třepačkou při 250 otáčkách a 35 °C po dobu 24 hodin.

2.1.6.5 Barvení biofilmu

Po uplynulých 24 hodinách kultivace byl obsah jamek z mikrotitračních destiček vyprázdněn. Následovalo promývání jamek roztokem 0,9 % NaCl, při kterém byla každá jamka mikrotitrační destičky třikrát promyta 200 µl tohoto roztoku. Po třetím opakování se nechaly mikrotitrační destičky po dobu 5 minut oschnout. Po uplynulých 5 minutách bylo přidáno do každé jamky mikrotitrační destičky 100 µl methanolu, který se následně nechal působit po dobu 20 minut. Po uplynulých 20 minutách došlo k vyprázdnění methanolu z jamek a jamky se nechaly schnout po dobu 5 minut. Po uplynulých 5 minutách bylo do každé jamky přidáno 100 µl 0,5 % roztoku krystalové violeti a nechalo se působit po dobu 20 minut. Po 20 minutách působení byl obsah jamek vyprázdněn a jamky byly opatrně omývány od zbytků roztoku krystalické violeti pod tekoucí vodou. Po osušení mikrotitračních destiček bylo přidáno 100 µl 98 % ethanolu.

2.1.6.6 Stanovení hustoty nárůstu bakterií

Pro stanovení nárůstu planktonických buněk v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky byl použit Reader na mikrotitrační destičky. Optická densita byla měřena při 512 nm.

2.1.6.7 Stanovení biofilmu

Nárůst biofilmu byl měřen prostřednictvím Readeru na mikrotitrační destičky při 540 nm.

2.1.6.8 Vyhodnocení synergických interakcí

Synergické interakce byly vyhodnoceny podle metodiky EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (EUCAST, 2020) Podle té jsou účinky

kombinací dvou látek hodnoceny na základě součtu jejich frakčních inhibičních koncentrací (Σ FIC. Pro výpočet Σ FIC u dvou antibakteriálních látek uvádí vzorec:

$$\Sigma\text{FIC} = \text{FIC}_{(A)} + \text{FIC}_{(B)}$$

kde:

$$\text{FIC}_{(A)} = \frac{\text{MIC}(A \text{ v kombinaci s } B)}{\text{MIC}(A \text{ samostatně})}$$

$$\text{FIC}_{(B)} = \frac{\text{MIC}(B \text{ v kombinaci s } A)}{\text{MIC}(B \text{ samostatně})}$$

Výsledek je pak vyhodnocen podle kritérií uvedených v tabulce č. 1:

Tabulka 1 Kritéria hodnocení synergických interakcí podle EUCAST

Index	Synergický účinek	Aditivní účinek	Bez vzájemného ovlivnění účinků	Antagonistický účinek
FIC nebo FBC	$\leq 0,5$	$> 0.5-1$	> 1 do < 2	≥ 2

3 Výsledky

V první fázi praktické části diplomové práce byl testován růst planktonických buněk a biofilmu čtyř různých kmenů *Staphylococcus aureus* na čtyřech různých médiích a byla sledována inhibiční schopnost tvorby biofilmů kultivovaných kmenů *S. aureus* dvěma různými samostatně testovanými antibiotiky, a to tetracyklinem o počáteční koncentraci 4 µg/ml a oxacilinem o počáteční koncentraci 0,125 µg/ml.

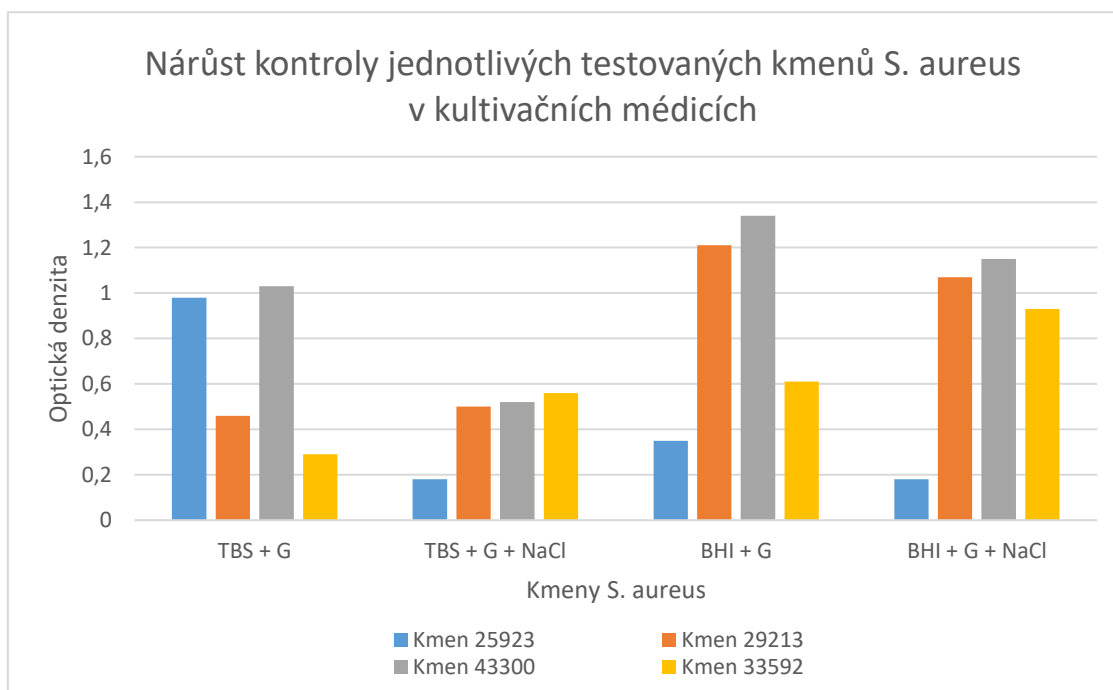
V druhé praktické části diplomové práce byla testována minimální inhibiční koncentrace tetracyklinu 88 %, silice získané z Cannabis Nurse Jackie a jejich společná kombinace koncentrací pro zjištění jejich synergických, aditivních či antagonistických účinků na planktonické buňky *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

Dále byla testována koncentrace BIC tetracyklinu 88 %, silice získané z Cannabis Nurse Jackie a jejich společná kombinace koncentrací pro zjištění synergických, aditivních či antagonistických účinků proti biofilmu *Staphylococcus aureus*.

3.1 Testování kmenů *S. aureus* v různých médiích

Inhibice tvorby biofilmů kultivovaných kmenů *S. aureus* byla testovaná dvěma různými, samostatně testovanými antibiotiky, a to tetracyklinem o počáteční koncentraci 4 µg/ml a oxacilinem o počáteční koncentraci 0,125 µg/ml.

Graf 1 - Nárůst kontroly jednotlivých testovaných kmenů *S. aureus* v kultivačních médiích



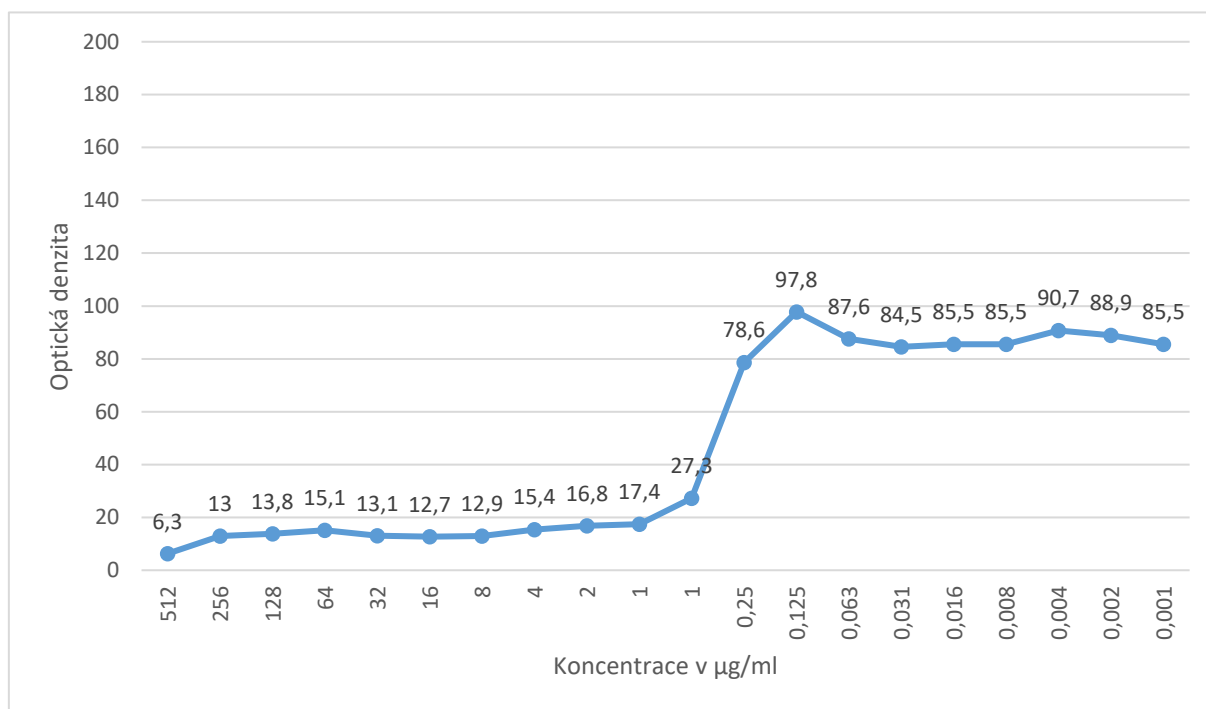
Po jednodenní kultivaci při 35 °C došlo k nejvyššímu nárůstu biofilmu u kmene *S. aureus* ATCC 43300 na médiu BHI s přidavkem 1 % glukózy a 2 % chloridu sodného. Na základě tohoto zjištění jsme dále ve výzkumu pokračovali už pouze s tímto kmenem, u kterého

byla zpozorována vyšší citlivost na tetracyklin než na oxycillin. Proto byl jako antibiotikum zvolen tetracyklin.

3.2 MIC tetracyklinu, konopné silice a jejich kombinace na *S. aureus* ATCC 43300

3.2.1 Hodnota MIC tetracyklinu na *S. aureus*

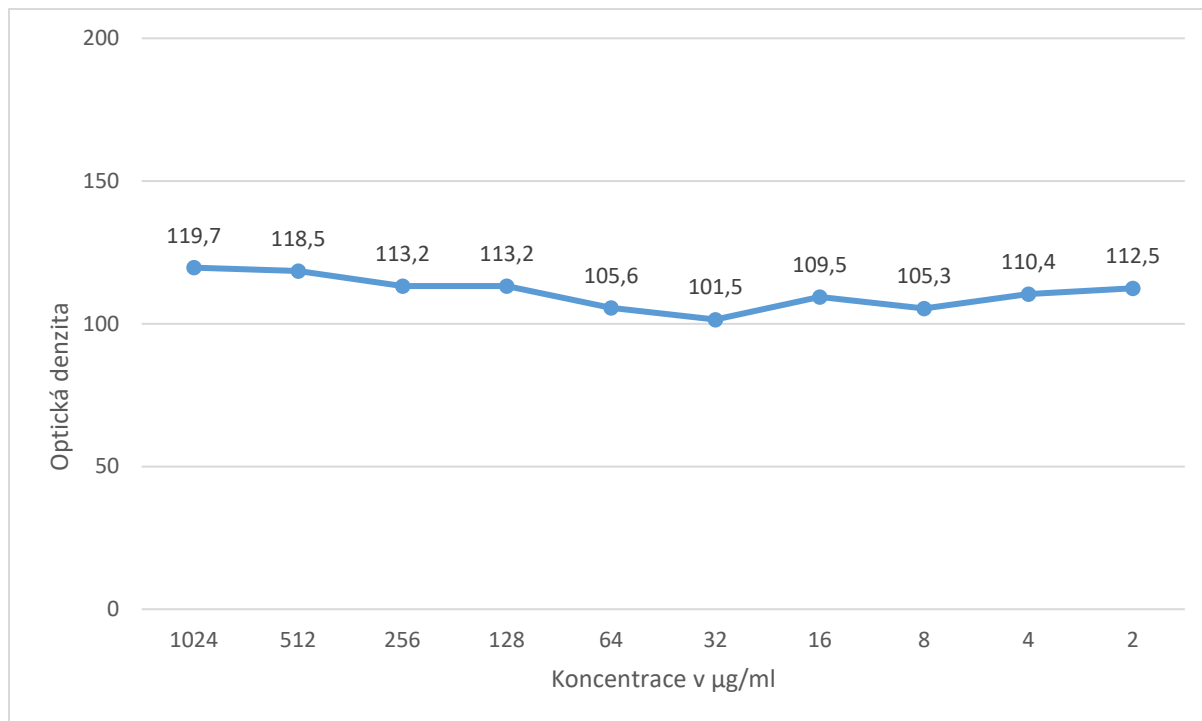
Graf č. 2: Měření hustoty planktonických buněk při působení tetracyklinu o počáteční koncentraci 512 $\mu\text{g/ml}$



Graf č. 2 znázorňuje průměrné hodnoty nárůstu planktonických buněk *S. aureus* ATCC 43300 v BHI s přidáním 1 % glukózy a 2 % chloridu sodného, do kterého byl přidán tetracyklin o čistotě 88 % a počáteční koncentrací 512 $\mu\text{g/ml}$, který byl následně zředěn dvojitým ředěním. K inhibici planktonických buněk došlo až do koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$, která byla označena jako MIC (IC_{50}) tetracyklinu působící na kmen *S. aureus* ATCC 43300.

3.2.2 Hodnota MIC konopné silice na *S. aureus*

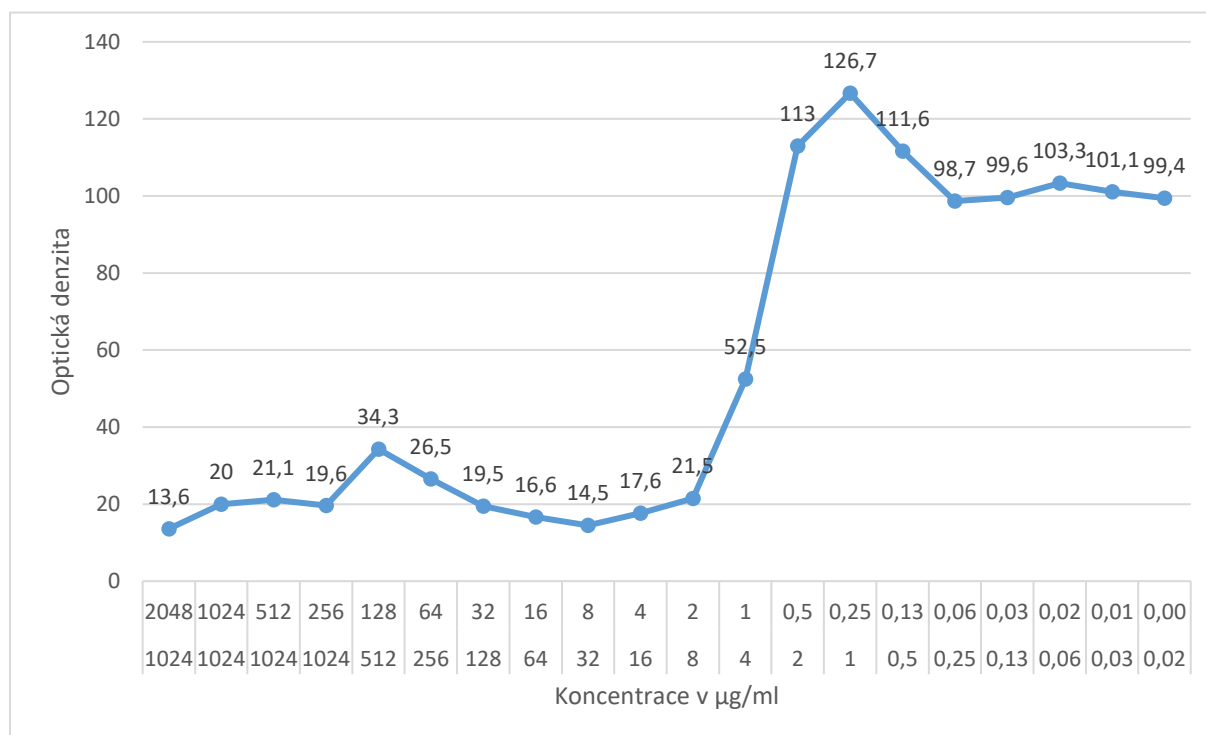
Graf č. 3: Měření hustoty planktonických buněk při působení konopné silice o počáteční koncentraci 1024 $\mu\text{g/ml}$



Graf č. 3 znázorňuje průměrné hodnoty inhibice planktonických buněk *S. aureus* ATCC 43300 působením konopné silice o počáteční koncentraci 1024 $\mu\text{g/ml}$, která byla následně ředěna dvojitým ředěním. Z grafu můžeme vyčíst, že k žádné výrazné inhibici planktonických buněk *S. aureus* ATCC 43300 nedošlo ani u počáteční koncentrace. Můžeme tedy říct, že samostatná konopná silice nepůsobí inhibičně proti planktonickým bakteriím *S. aureus* ATCC 43300.

3.2.3 Hodnota MIC při kombinaci konopné silice a tetracyklinu

Graf č. 4: Měření hustoty planktonických buněk při vzájemném působení tetracyklinu o koncentraci 2048 $\mu\text{g/ml}$ a konopné silice o počáteční koncentraci 1024 $\mu\text{g/ml}$.



Graf č. 4 znázorňuje průměrné hodnoty nárůstu planktonických buněk při vzájemném působení tetracyklinu o počáteční koncentraci 2048 $\mu\text{g/ml}$ a konopné silice o počáteční koncentraci 1024 $\mu\text{g/ml}$. Při porovnání MIC u samostatného tetracyklinu a MIC u tetracyklinu v kombinaci s konopnou silicí můžeme vypočítat nárůst MIC o 1 $\mu\text{g/ml}$. U konopné silice dochází naopak k poměrně velkému snížení MIC, kdy při testování samostatné konopné silice nedocházelo k inhibici ani při koncentraci 1024 $\mu\text{g/ml}$, zatímco při použití silice v kombinaci s tetracyklinem došlo ke snížení MIC až na 8 $\mu\text{g/ml}$. MIC (IC_{50}) byla v kombinaci konopné silice a tetracyklinu stanovena pro tetracyklin o koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$ a pro konopnou silici o koncentraci 8 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.4 Vypočtená hodnota FIC pro hodnoty MIC pro kombinaci konopné silice a tetracyklinu

Tabulka 2 MIC samostatného tetracyklinu a konopné silice a jejich kombinace v $\mu\text{g/ml}$

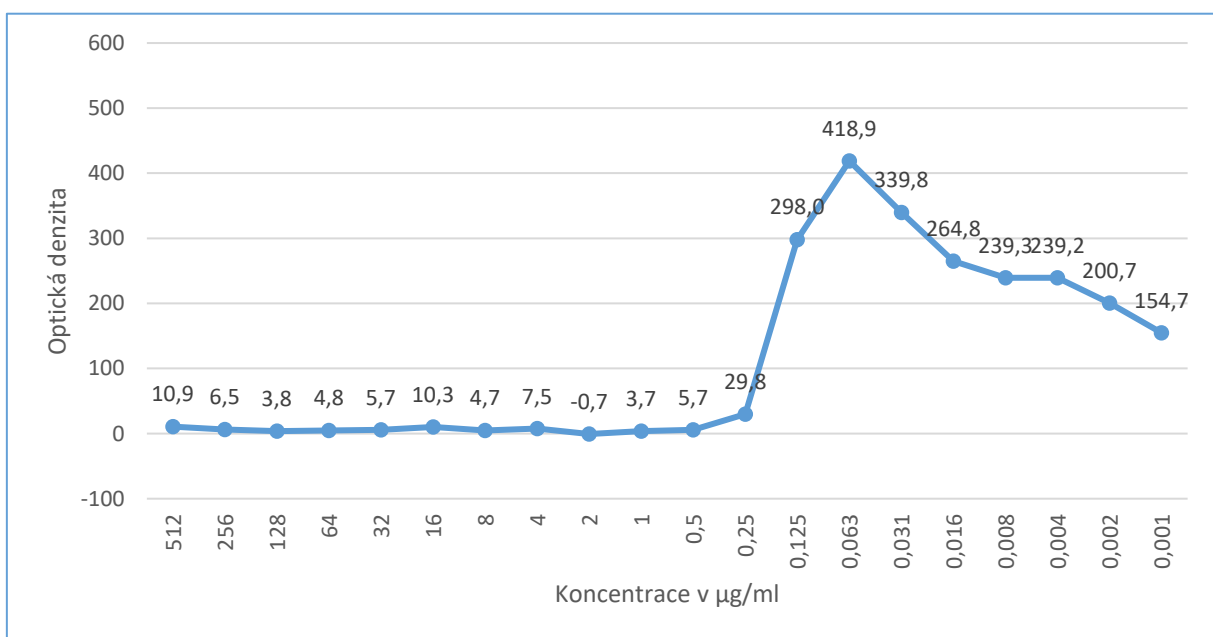
MIC			
Samostatně		Kombinace	
Silice	Tetracyklin	Silice	Tetracyklin
2048	0,5	8	2
FIC		4,004	

Z důvodu nezachycení MIC u konopné silice byla pro výpočet frakční inhibiční koncentrace FIC použita koncentrace dvojnásobně vyšší, z důvodu předpokladu, že existuje poměrně velká pravděpodobnost, že právě v rozmezí koncentrací 1025-2048 $\mu\text{g/ml}$ se bude hodnota MIC u konopné silice vyskytovat. Po dosazení hodnot do vzorce určeného pro výpočet FIC vyšla hodnota 4,004, která odpovídá antagonistickým účinkům u kombinace konopné silice a tetracyklinu.

3.3 BIC tetracyklinu, konopné silice a jejich kombinace

3.3.1 Vyobrazení BIC tetracyklinu na biofilm *S. aureus*

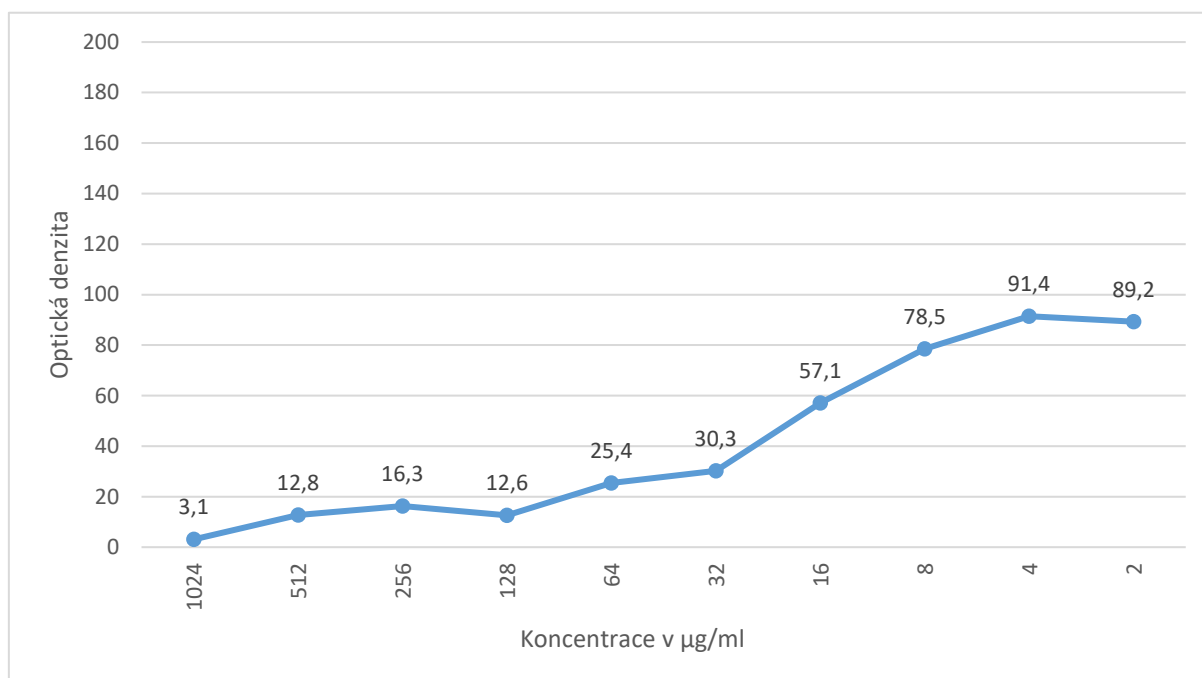
Graf č. 5: Měření inhibice biofilmu při působení tetracyklinu o počáteční koncentraci 512 $\mu\text{g/ml}$



Graf č. 5 vyobrazuje biofilmovou inhibiční koncentraci tetracyklinu na biofilm tvořený *S. aureus* ATCC 43300 o počáteční koncentraci 512 $\mu\text{g/ml}$. Tetracyklin byl ředěn dvojitým ředěním. K inhibici biofilmu tetracyklinem docházelo až do koncentrace 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Od koncentrace 0,125 $\mu\text{g/ml}$ již došlo k prudkému nárůstu bakteriálního biofilmu. Biofilmové inhibiční koncentraci (IC_{50}) byla tedy přiřazena koncentrace 0,25 $\mu\text{g/ml}$, která inhibovala více než 50 % biofilmu.

3.3.2 Vyobrazení BIC konopné silice na biofilm *S. aureus*

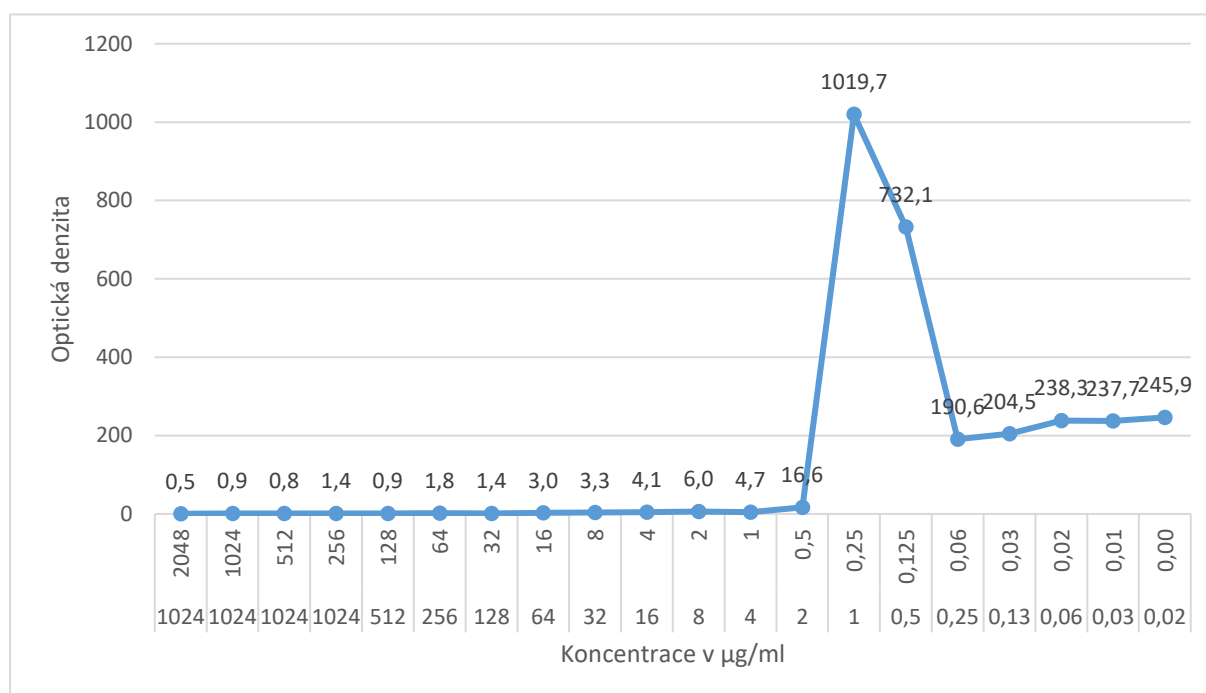
Graf č. 6: Měření inhibice biofilmu při působení konopné silice o počáteční koncentraci 1024 $\mu\text{g/ml}$



Graf č. 6 vyobrazuje průměrné hodnoty biofilmových inhibičních koncentrací konopné silice na biofilm tvořený *S. aureus* ATCC 43300 o počáteční koncentraci 1024 $\mu\text{g/ml}$. Konopná silice byla ředěna dvojitým ředěním. K inhibici biofilmu konopnou silicí docházelo až do koncentrace 32 $\mu\text{g/ml}$. Od koncentrace 16 $\mu\text{g/ml}$ již došlo k pomalému nárůstu bakteriálního biofilmu. Biofilmové inhibiční koncentraci (IC_{50}) byla tedy přiřazena koncentrace 32 $\mu\text{g/ml}$. Při porovnání grafu č. 3 a grafu č. 6 můžeme vypořadovat, že ačkoliv konopná silice na planktonické buňky *S. aureus* inhibičně nepůsobila, k inhibici biofilmu u konopné silice docházelo až do koncentrace 32 $\mu\text{g/ml}$.

3.3.3 Vyobrazení BIC kombinace tetracyklinu a konopné silice na biofilm *S. aureus*

Graf č. 7: Měření inhibice biofilmu *S. aureus* ATCC 43300 při vzájemném působení tetracyklinu o koncentraci 2048 $\mu\text{g/ml}$ a konopné silice o počáteční koncentraci 1024 $\mu\text{g/ml}$.



Graf č. 7 znázorňuje průměrné hodnoty inhibice biofilmu *S. aureus* ATCC 43300 při vzájemném působení tetracyklinu o počáteční koncentraci 2048 $\mu\text{g/ml}$ a konopné silice o počáteční koncentraci 1024 $\mu\text{g/ml}$. Při porovnání BIC (IC_{50}) u samostatného tetracyklinu a u BIC u tetracyklinu v kombinaci s konopnou silicí, můžeme u BIC (IC_{50}) kombinace konopné silice a tetracyklinu vyzorovat dvojnásobný nárůst koncentrace tetracyklinu, kdy koncentrace vzrostla z 0,25 $\mu\text{g/ml}$ na 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Stejně jako u kombinace tetracyklinu a silice u MIC (IC_{50}), došlo i u BIC (IC_{50}) ke snížení koncentrace u konopné silice, která samostatně působila inhibičně na biofilm až do koncentrace 16 $\mu\text{g/ml}$. BIC (IC_{50}) pro konopnou silici v kombinaci s tetracyklinem klesla až na koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$.

3.3.4 Vypočtená hodnota FIC pro hodnoty BIC pro kombinaci konopné silice a tetracyklinu

Tabulka 3 Hodnoty BIC samostatného tetracyklinu a konopné silice a jejich kombinace v $\mu\text{g/ml}$

BIC (IC_{50})			
Samostatně		Kombinace	
Silice	Tetracyklin	Silice	Tetracyklin
16	0,25	2	0,5
FIC		2,125	

Přestože vypočtené průměrné hodnoty BIC (IC_{50}) samostatné silice ukazují v grafu č.6 koncentraci 32 $\mu\text{g/ml}$, při výpočtu frakční inhibiční koncentrace FIC byl použit modus ze tří

proběhlých pokusů, kterému byla přiřazena koncentrace 16 µg/ml. Po dosazení hodnot do vzorce určeného pro výpočet FIC vyšla hodnota 2,125, která odpovídá antagonistickým účinkům u kombinace konopné silice a tetracyklinu.

4 Diskuze

Cílem našeho výzkumu bylo zjistit minimální inhibiční koncentraci a biofilmovou inhibiční koncentraci (IC₅₀) u samostatně působící silice a tetracyklinu, a zda existuje možná synergie při použití kombinace tetracyklinu o čistotě 88 % a konopné silice získané z *Cannabis Nurse Jackie* k inhibici růstu planktonických buněk a biofilmu *S. aureus*.

4.1 Minimální inhibiční koncentrace

Jedním z našich cílů bylo zjistit MIC samostatného tetracyklinu a konopné silice a získané z *Cannabis Nurse Jackie* a jejich vzájemné kombinace na planktonické buňky *S. aureus* ATCC 43300. U samostatně testovaného tetracyklinu byla vyhodnocena MIC (IC₅₀) při koncentraci 1 µg/ml. Vanthida et al. (2010) však uvádí MIC (IC₅₀) tetracyklinu působící na MRSA, mezi které se řadí i kmen *S. aureus* ATCC 43300, o koncentraci 4 µg/ml. Odlišná MIC (IC₅₀) však může být způsobená použitím jiného média, kterým byl Mueller-Hintonův bujón.

U samostatně testované konopné silice se nám nepodařilo nalézt MIC (IC₅₀) ani při nejvyšší použité koncentraci 1024 µg/ml. Stefania et al. 2020 se zabývali MIC silic získaných ze semen *Cannabis sativa L.*, u kterých byla zjištěna MIC při koncentraci 1 mg/ml proti kmenům *S. aureus* ATCC 25923 a ATCC 35556. Tyto antibakteriální účinky přiřazuje Stefania et al. (2020) vysokému obsahu kofeoylryraminu a kanabisinu. Je však dobře známo, že jednotlivé části rostlin, ze kterých se silice získávají, mohou být svým chemickým složením velmi odlišné. Nafis et al. (2019) uvádí ve své publikaci MIC konopné silice získané z nadzemních částí *Cannabis sativa* vypěstované v severním Maroku při koncentraci 4,7 mg/ml. Námí získaná MIC (IC₅₀) konopné silice mohla být ovlivněna skladováním usušeného materiálu získaného z *Cannabis Nurse Jackie*, který byl před provedením extrakce skladován v mrazáku při teplotě -20 °C, tím mohlo dojít ke snížení antibakteriální účinnosti konopných silic. Dále mohlo inhibiční účinky silice ovlivnit také odlišné molekulové složení extrahovaného materiálu. Je známo, že složení bioaktivních látek se významně liší v závislosti na použité extrahované rostlinné části a na agronomických a environmentálních faktorech (Kornpointner et al. 2021).

Při sledování MIC planktonických buněk *S. aureus*, u kterého došlo k použití kombinace tetracyklinu a konopné silice, jsme zjistili, že došlo k prudkému poklesu MIC u konopné silice, kde ani u koncentrace 1024 µg/ml nebyla sledována žádná inhibice. V použití silice v kombinaci s tetracyklinem tato hodnota MIC klesla na koncentraci 8 µg/ml. U tetracyklinu naopak v kombinaci došlo k čtyřnásobnému vzrůstu MIC z 0,5 µg/ml na 2 µg/ml.

Po vypočtení frakční inhibiční koncentrace nám vyšel u kombinace tetracyklinu a konopné silice antagonistický účinek. Inhibice planktonických buněk *S. aureus* v použité kombinaci těchto dvou látek je nejspíše způsobená inhibičními účinky tetracyklinu, které přítomnost konopné silice pouze zesílila.

Možné antagonistické účinky kombinací dvou látek potvrdila také Laloucková et al. (2021), kde byla testována kombinace oxacilinu a kyseliny laurové. Laloucková et al. (2021) také uvádějí, že antagonistické účinky mohou být způsobeny zastavením buněčného dělení způsobeným extrahovanou látkou, tím brání růstu bakteriálních buněk a použité antibiotikum pak není schopné správně vykonávat svou antibakteriální aktivitu. Laloucková et al. (2021) dále

uvádí, že při použití vysokých koncentrací extrahovaných látek může dojít ke zvýšenému namáhání membrány bakteriálních buněk, které může vést ke změně funkce membránového proteinu, a tato změna může negativně ovlivnit antibakteriální aktivitu použitého antibiotika, která působí inhibičně proti syntéze bakteriální buněčné stěny. Z tohoto důvodu se může použité antibiotikum stát neúčinným při inhibici bakteriálních buněk. Dalším důvodem vzniku antagonistických účinků u kombinace dvou látek může být dle Laloucková et al. (2021) i možnost poškození nosičů elektronů membrány, které může způsobit změnu intracelulárního a extracelulárního pH, která může mít za následek srážení proteinů vázající penicilin a způsobit tak ztrátu schopnosti interakce s použitým antibiotikem. Dalším možným důvodem vzniku antagonistických účinků v kombinaci dvou látek pak uvádí Laloucková et. al (2021) i možnost indukce perzistujících buněk *S. aureus* při použití vysokých koncentrací testovaných látek.

Nafis et al. (2019) ve své studii testovali inhibiční účinky dvou kombinací konopné silice, a to kombinace konopná silice a ciprofloxacin a konopná silice a flukonazol. Tyto kombinace byly testovány na *M. luteus*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* a dalších bakterií. Ve studii byl prokázán synergický účinek u interakce konopné silice v kombinaci s ciprofloxacinem. Tato kombinace působila synergicky vůči *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* a *K. pneumoniae*. Kombinace interakce konopné silice a flukonazolu vykazovaly velké synergické účinky proti všem testovaným kvasinkám. Nafis et al. (2019) ve své publikaci dále uvádí, že konopná silice snížila u těchto dvou antibiotik MIC 2 až 64krát v závislosti na testovaném mikroorganismu.

4.2 Biofilmová inhibiční koncentrace

Jedním z našich dalších cílů bylo zjistit BIC samostatného tetracyklinu a konopné silice získané z *Cannabis Nurse Jackie* a jejich kombinace na tvorbu biofilmu tvořeného *S. aureus* ATCC 43300. U samostatně testovaného tetracyklinu byla vyhodnocena BIC (IC₅₀) při koncentraci 0,25 µg/ml. V porovnání se zjištěnou MIC (IC₅₀) samostatného tetracyklinu, které byla přiřazena koncentrace 1 µg/ml, byla hodnota BIC čtyřnásobně nižší.

U samostatně testované konopné silice byla vyhodnocena BIC (IC₅₀) při koncentraci 32 µg/ml. Vzhledem k neprokázané žádné významné inhibici konopné silice ani při nejvyšší testované koncentraci 1024 µg/ml působící na planktonické buňky *S. aureus* ATCC 43300, předpokládáme, že hodnota BIC (IC₅₀) je v porovnání s hodnotou MIC (IC₅₀) 64krát vyšší.

Při sledování BIC biofilmu tvořeného *S. aureus* ATCC 43300, u kterého došlo k použití kombinace tetracyklinu a konopné silice, jsme zjistili, že došlo k poklesu BIC u konopné silice, z koncentrace 32 µg/ml na 2 µg/ml. Koncentrace BIC u kombinace tedy klesla 16krát. U tetracyklinu použitého v kombinaci došlo stejně jako u MIC k nárůstu koncentrace z 0,25 µg/ml na 0,5 µg/ml. Koncentrace tetracyklinu v kombinaci vzrosla dvojnásobně. Stejně jako u inhibice planktonických buněk *S. aureus* můžeme i zde říct, že s největší pravděpodobností působil inhibičně tetracyklin.

Stejně jako u MIC interakce konopné silice a tetracyklinu, tak i u BIC byly zjištěny antagonistické účinky těchto dvou látek.

Existují však studie zabývající se antibiofilmovou aktivitou různých rostlinných silic. Například Cui et al. (2020) uvádí ve své publikaci inhibiční účinky biofilmu tvořeného MRSA kardamovými silicemi již při koncentraci 1 mg/ml. Během výzkumu byl potvrzen inhibiční

účinek na tvorbu biofilmu mechanismem inhibice počáteční adheze planktonických buněk MRSA, kdy došlo při použití kardamových silic ke snížení rychlosti adheze až o 56,14 %. Dalším mechanismem inhibice biofilmu MRSA uvádí Cui et al. (2020) i snížení extracelulárních polysacharidů a proteinů vlivem působení kardamové silice. Uvádí, že při použití této silice došlo ke snížení extracelulárních polysacharidů a proteinů o 60,69 %.

Kang et al. (2019) se zabývali působením mátové silice na planktonické buňky, ale i biofilm *S. aureus*. Během výzkumu byl potvrzen silný antibakteriální účinek proti planktonickým buňkám *S. aureus* způsobený změnou propustnosti buněčné membrány. Zang et al. (2019) uvádí podobné mechanismy účinku na planktonické buňky *S. aureus* také například u skořicové silice. Při studii mátové silice na tvorbu biofilmu *S. aureus* bylo zjištěno, že koncentrace 0,25 mg/ml účinně snížila počet životaschopných buněk v biofilmu. Při koncentraci mátové silice ≥ 4 mg/ml došlo k usmrcení všech bakteriálních buněk *S. aureus* tvořících biofilm. Tyto studie se však zajímaly samostatným působením jednotlivých silic a nebyla u nich zaznamenána žádná kombinace s antibiotiky.

5 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo ověřit účinky konopné silice na stafylokokový biofilm samostatně a v kombinaci s konvenčními antimikrobiálními látkami. V našem výzkumu jsme se zabývali kombinací konopné silice a tetracyklinu.

- Byla zjištěna schopnost konopné silice potlačovat tvorbu biofilmu *S. aureus*, čímž byla potvrzena první hypotéza. Přestože konopná silice nepůsobila inhibičně proti planktonickým buňkám ani při nejvyšší testované koncentraci 1024 $\mu\text{g/ml}$, tvorbu biofilmu u kmene *S. aureus* potlačovala až do koncentrace 32 $\mu\text{g/ml}$, kdy inhibovala přes 50 % stafylokokového biofilmu.
- Druhá hypotéza předpokládá, že bude konopná silice v kombinaci s dalšími konvenčními antimikrobiálními látkami účinná. Tuto hypotézu se nám nepodařilo potvrdit. Při použití kombinace konopné silice a tetracyklinu sice došlo ke snížení biofilmové inhibiční koncentrace silice, ale koncentrace tetracyklinu inhibující biofilm byla v kombinaci dvojnásobně vyšší. Celkově byl kombinační účinek konopné silice s tetracyklinem vyhodnocen antagonisticky.

6 Literatura

- Aiello S, Pagano L, Ceccacci F, Simonis B, Sennato S, Bugli F, Martini C, Torelli R, Sanguinetti M, Ciogli A, Bombelli C, Mancini G. (2021). Mannosyl, glucosyl or galactosyl liposomes to improve resveratrol efficacy against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **617** (e126321). DOI: 10.1016/j.colsurfa.2021.126321.
- Alibi S, Ben Selma W, Ramos-Vivas J, Smach MA, Touati R, Boukadida J, Navas J, Ben Mansour H. 2020. Anti-oxidant, antibacterial, anti-biofilm, and anti-quorum sensing activities of four essential oils against multidrug-resistant bacterial clinical isolates. *Current Research in Translational Medicine*. **68**: 59–66. DOI: 10.1016/j.retram.2020.01.001.
- Alves P, Amara C, Teixeira N, Correia-da-Silva G. 2020. Cannabis sativa: Much more beyond Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Pharmacological Research*. **157** (e104822). DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104822.
- Appendino G, Gibbons S, Giana A, Paganini A, Grassi G, Stavri M, Smith E, Rahman MM. 2008. Antibacterial Cannabinoids from Cannabis sativa: A Structure–Activity Study. *Journal of Natural Products* **71**: 1427-1430.
- Anwar F, Abbas A, Alkharfy KM, Gilani A ul H. 2016. Cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton) oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc. DOI: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00033-X.
- Azeredo J, García P, Drulis-Kawa Z. 2021. Targeting biofilms using phages and their enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*. **68**: 251–261. DOI: 10.1016/j.copbio.2021.02.002.
- Bai M, Li C, Cui H, Lin L. 2021. Preparation of self-assembling *Litsea cubeba* essential oil/diphenylalanine peptide micro/nanotubes with enhanced antibacterial properties against *Staphylococcus aureus* biofilm. *Lwt*. **146** (e111394). DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111394.
- Baldino L, Scognamiglio M, Reverchon E. 2020. Supercritical fluid technologies applied to the extraction of compounds of industrial interest from Cannabis sativa L. and to their pharmaceutical formulations: A review. *Journal of Supercritical Fluids*. **165** (e104960). DOI: 10.1016/j.supflu.2020.104960.
- Bazargani MM, Rohloff J. 2016. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*. **61**: 156–164. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.09.036.
- Beyzi E, Karaman K, Gunes A, Buyukkilic Beyzi S. 2017. Change in some biochemical and bioactive properties and essential oil composition of coriander seed (*Coriandrum sativum*

- L.) varieties from Turkey. *Industrial Crops and Products*. **109**: 74–78. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.08.008.
- Bi Y, Xia G, Shi C, Wan J, Liu L, Chen Y, Wu Y, Zhang W, Zhou M, He H, Liu R. 2021. Therapeutic strategies against bacterial biofilms. *Fundamental Research*. **1**: 193–212. DOI: 10.1016/j.fmre.2021.02.003.
- Bohl LP, Isaac P, Bresler ML, Orellano MS, Correa SG, Tolosa de Talamoni NG, Porporatto C. 2021. Interaction between bovine mammary epithelial cells and planktonic or biofilm *Staphylococcus aureus*: The bacterial lifestyle determines its internalization ability and the pathogen recognition. *Microbial Pathogenesis*. **152** (e104604). DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104604.
- Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, Mastinu A. 2018. *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of Ethnopharmacology*. **227**: 300–315. DOI: 10.1016/j.jep.2018.09.004.
- Borges A, Meireles A, Mergulhão F, Melo L, Simões M. 2020. Chapter 11 - Biofilm control with enzymes. Pages 249-271 in *Recent Trends in Biofilm Science and Technology*. Simões M, Borges A, Simões LC editors. Academic Press.
- Bullington W, Hempstead S, Smyth AR, Drevinek P, Saiman L, Waters VJ, Bell SC, VanDevanter DR, Flume PA, Elborn S, Muhlebach MS. 2020. Antimicrobial resistance: Concerns of healthcare providers and people with CF. *Journal of Cystic Fibrosis*. xxxx. DOI: 10.1016/j.jcf.2020.05.009.
- Campbell M, Cho CY, Ho A, Huang JY, Martin B, Gilbert ES 2020. 4-Ethoxybenzoic acid inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and potentiates biofilm sensitivity to vancomycin. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **56**, (e106086). DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106086.
- Ceballos S, Aspiroz C, Ruiz-Ripa L, Azcona-Gutierrez JM, López-Cerero L, López-Calleja AI, Álvarez L, Gomáriz M, Fernández M, Torres C, Ezpeleta C, Martín C, Arribas J, Navarro C, Arias A, Fortuño B, Pereira J, Milagro A, Torres L, Rezusta A et al. 2019. Multicenter study of clinical non- β -lactam-antibiotic susceptible MRSA strains: Genetic lineages and Panton-Valentine leukocidin (PVL) production. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Ed.)*. **37**: 509–513. DOI: 10.1016/j.eimce.2019.01.006.
- Corni G, Brighenti V, Pellati F, Morlock GE. 2020. Effect-directed analysis of bioactive compounds in *Cannabis sativa* L. by high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1629** (e461511). DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461511.
- Coronado-Álvarez A, Romero-Cordero K, Macías-Triana L, Tatum-Kuri A, Vera-Barrón A, Budde H, Machado S, Yamamoto T, Imperatori C, Murillo-Rodríguez E. 2021. The

- synthetic CB1 cannabinoid receptor selective agonists: Putative medical uses and their legalization. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. **110**. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2021.110301.
- Cui H, Zhang C, Li C, Lin L. 2020. Inhibition mechanism of cardamom essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Lwt*. **122** (e109057). DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109057.
- Cui H, Zhang C, Li C, Lin L. 2019. Antibacterial mechanism of oregano essential oil. *Industrial Crops and Products*. **139** (e111498) DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111498.
- da Silva GOA, Pennafirme S, da Costa Pereira D, Waite CCC, Lopes RT, Lima ICB, Crapez MAC. 2020. Monitoring of bacterial community structure and growth: An alternative tool for biofilm microanalysis. *Biofilm*. **2** (e100034). DOI: 10.1016/j.bioflm.2020.100034.
- EUCAST. 2000. Definitive Document E.Def 1.2, 2000: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **6**: 503–508.
- dos Santos Rodrigues JB, de Carvalho RJ, de Souza NT, de Sousa Oliveira K, Franco O L, Schaffner D, de Souza EL, Magnani M. 2017. Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. *Food Control*. **73**: 1237–1246. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.10.043.
- Duarte A F de S, Ceotto H, Coelho MLV, Brito MAV de P, Bastos M do C de F. 2013. Identification of new staphylococcins with potential application as food biopreservatives. *Food Control*. **32**: 313–321. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.12.008.
- Duarte AF de S, Ceotto-Vigoder H, Barrias E S, Souto-Padrón TCBS, Nes IF, Bastos M. do C. de F. 2018. Hyicin 4244, the first sactibiotic described in staphylococci, exhibits an anti-staphylococcal biofilm activity. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **51** :349–356. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.06.025.
- Egea AL, Galletti P, Lamberghini R, Faccione D, Lucero C, Vindel A, Tosoroni D, Garnerio A, Saka HA, Galas M, Bocco JL, Corso A, Sola C. 2014. New patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina. *International Journal of Medical Microbiology*. **304**: 1086–1099. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.08.002.
- Eld HMS, Nielsen EM, Johnsen PR, Marengo M, Kamper IW, Frederiksen L, Bonomi F, Frees D, Iametti S, Frøkiær H. 2021. Cefoxitin treatment of MRSA leads to a shift in the IL-12/IL-23 production pattern in dendritic cells by a mechanism involving changes in the MAPK signaling. *Molecular Immunology*. **134**: 1–12. DOI: 10.1016/j.molimm.2021.02.025.

- El-Far A, Samir S, El-Gebaly E, Taha N Y, Fahmy EM, Diab TM, El-Shenawy A. 2021. Assessment of eugenol inhibitory effect on biofilm formation and biofilm gene expression in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Egypt. *Infection, Genetics and Evolution*. **89** (e104722). DOI: 10.1016/j.meegid.2021.104722.
- El-Maati MFA, Mahgoub SA, Labib SM, Al-Gaby AMA, Ramadan MF. 2016. Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities. *European Journal of Integrative Medicine*. **8**: 494–504. DOI: 10.1016/j.eujim.2016.02.006.
- Fasihi Y, Kiaei S, Kalantar-Neyestanaki D. 2017. Characterization of SCCmec and spa types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from health-care and community-acquired infections in Kerman, Iran. *Journal of Epidemiology and Global Health*. **7**: 263–267. DOI: 10.1016/j.jegh.2017.08.004.
- Frassinetti S, Gabriele M, Moccia E, Longo V, Di Gioia D. 2020. Antimicrobial and antibiofilm activity of *Cannabis sativa* L. seeds extract against *Staphylococcus aureus* and growth effects on probiotic *Lactobacillus* spp. *Lwt*. **124** (e109149). DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109149.
- Giordani B, Costantini PE, Fedi S, Cappelletti M, Abruzzo A, Parolin C, Foschi C, Frisco G, Calonghi N, Cerchiara T, Bigucci F, Luppi B, Vitali B. 2019. Liposomes containing biosurfactants isolated from *Lactobacillus gasseri* exert antibiofilm activity against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **139**: 246–252. DOI: 10.1016/j.ejpb.2019.04.011.
- Gismondi A, Di Marco G, Redi EL, Ferrucci L, Cantonetti M, Canini A. 2021. The antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil against *Staphylococcus* species in a hospital environment. *Journal of Herbal Medicine*. **26** (e100426). DOI: 10.1016/j.hermed.2021.100426.
- Gutiérrez TJ. 2019. Chapter 19 - Antibiofilm Enzymes as an Emerging Technology for Food Quality and Safety. Pages 321-342 in *Enzymes in Food Biotechnology*. Kuddus M editor. Academic Press.
- Hasan MA, Khan MA, Sharmin T, Hasan Mazumder MH, Chowdhury AS. 2016. Identification of putative drug targets in Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) using computer aided protein data analysis. *Gene*. **575**: 132–143. DOI: 10.1016/j.gene.2015.08.044.
- Heckman TI, Soto E. 2021. *Streptococcus iniae* biofilm formation enhances environmental persistence and resistance to antimicrobials and disinfectants. *Aquaculture*. **540** (e736739). DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.736739.

- Heredia-Guerrero JA, Ceseracciu L, Guzman-Puyol S, Paul UC, Alfaro-Pulido A, Grande C, Vezzulli L, Bandiera T, Bertorelli R, Russo D, Athanassiou A, Bayer IS. 2018. Antimicrobial, antioxidant, and waterproof RTV silicone-ethyl cellulose composites containing clove essential oil. *Carbohydrate Polymers*. **192**: 150–158. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.03.050.
- Higgins EL, Kellner-Rogers JS, Estanislau AM, Esposito A C, Vail NR, Payne SR, Stockwell JG, Ulrich SM. 2021. Design, synthesis, and evaluation of transition-state analogs as inhibitors of the bacterial quorum sensing autoinducer synthase CepI. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **39** (e127873) DOI: 10.1016/j.bmcl.2021.127873.
- Huang V, Cheung CM, Kaatz GW, Rybak MJ. 2010. Evaluation of dalbavancin, tigecycline, minocycline, tetracycline, teicoplanin and vancomycin against community-associated and multidrug-resistant hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **35**: 25–29. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.08.020.
- Chakraborty S, Afaq N, Singh N, Majumdar S. 2018. Antimicrobial activity of *Cannabis sativa*, *Thuja orientalis* and *Psidium guajava* leaf extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Integrative Medicine*. **16**: 350–357. DOI: 10.1016/j.joim.2018.07.005.
- Chang Y, Zheng C, Chinnathambi A, Alahmadi TA, Alharbi SA 2021. Cytotoxicity, anti-acute leukemia, and antioxidant properties of gold nanoparticles green-synthesized using *Cannabis sativa* L leaf aqueous extract. *Arabian Journal of Chemistry*. **14** (e103060). DOI: 10.1016/j.arabjc.2021.103060.
- Chen J, Zhou H, Huang J, Zhang R, Rao X. 2021. Virulence alterations in *Staphylococcus aureus* upon treatment with the sub-inhibitory concentrations of antibiotics. *Journal of Advanced Research*. **xxxx**. DOI: 10.1016/j.jare.2021.01.008.
- Chye Y, Kirkham R, Lorenzetti V, McTavish E, Solowij N, Yücel M. 2020. Cannabis, Cannabinoids, and Brain Morphology: A Review of the Evidence. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*. 1–9. DOI: 10.1016/j.bpsc.2020.07.009.
- Kaneko H, Nakaminami H, Ozawa K, Wajima T, Noguchi N. 2021. In vitro anti-biofilm effect of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (anti-MRSA) agents against the USA300 clone. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. **24**: 63–71. DOI: 10.1016/j.jgar.2020.11.026.
- Kang J, Jin W, Wang J, Sun Y, Wu X, Liu L. 2019. Antibacterial and anti-biofilm activities of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus*. *Lwt*. **101**: 639–645. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.11.093.

- Keivani Nahr F, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, Samadi Kafil H. 2018. Food grade nanostructured lipid carrier for cardamom essential oil: Preparation, characterization and antimicrobial activity. *Journal of Functional Foods*. **40**: 1–8. DOI: 10.1016/j.jff.2017.09.028.
- Kornpointner C, Sainz Martinez A, Marinovic S, Haselmair-Gosch C, Jamnik P, Schröder K, Löffke C, Halbwirth H. 2021. Chemical composition and antioxidant potential of *Cannabis sativa* L. roots. *Industrial Crops and Products*. **165**. DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.113422.
- Kumar P, Dev S, Kumar A, Thakur R, Dhar R. 2021. Impact of indium doping on the anti-biofilm activity of ZnO thin films against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Superlattices and Microstructures*. **150** (e106741). DOI: 10.1016/j.spmi.2020.106741.
- Kwieciński J, Eick S, Wójcik K. 2009. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **33**: 343–347. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.08.028.
- Lalouckova K, Skrivanova E, Rondevaldova J, Frankova A, Soukup J, Kokoska L 2021. In vitro antagonistic inhibitory effects of palm seed crude oils and their main constituent, lauric acid, with oxacillin in *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*. **11**: 1–12. DOI: 10.1038/s41598-020-80481-0.
- Lee, J. Y., Garcia, C. V., Shin, G. H., & Kim, J. T. (2019). Antibacterial and antioxidant properties of hydroxypropyl methylcellulose-based active composite films incorporating oregano essential oil nanoemulsions. *Lwt*, 106(September 2018), 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.061>.
- Li J, Zhao X. 2020. Effects of quorum sensing on the biofilm formation and viable but non-culturable state. *Food Research International*. **137** (e109742). DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109742.
- Li X, Liu Y, Wang Y, Lin Z, Wang D, Sun, H. 2021. Resistance risk induced by quorum sensing inhibitors and their combined use with antibiotics: Mechanism and its relationship with toxicity. *Chemosphere*. **265** (e129153). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.129153.
- Memariani M, Memariani H, Moravvej H. 2021. Inducible clindamycin resistance among clinical *Staphylococcus aureus* strains in Iran: A contemporaneous systematic review and meta-analysis. *Gene Reports*. **23** (e101104). DOI: 10.1016/j.genrep.2021.101104.
- Mirzaei R, Mohammadzadeh R, Sholeh M, Karampoor S, Abdi M, Dogan E, Moghadam MS, Kazemi S, Jalalifar S, Dalir A, Yousefimashouf R, Mirzaei E, Khodavirdipour A, Alikhani MY. 2020. The importance of intracellular bacterial biofilm in infectious diseases. *Microbial Pathogenesis*. **147** (e104393) DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104393.

- Mohammadi A, Hosseini SM, Hashemi M. 2020. Emerging chitosan nanoparticles loading-system boosted the antibacterial activity of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. *Industrial Crops and Products*. **155** (e112824). DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112824.
- Molina RDI, Campos-Silva R, Macedo AJ, Blázquez MA, Alberto MR, Arena ME. 2020. Antibiofilm activity of coriander (*Coriander sativum* L.) grown in Argentina against food contaminants and human pathogenic bacteria. *Industrial Crops and Products*. **151** (e112380). DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112380.
- Molineri AI, Camussone C, Zbrun MV, Suárez Archilla G, Cristiani M, Neder V, Calvinho L, Signorini M. 2021. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis: Systematic review and meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine*. **188**. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2021.105261.
- Monteiro T, Wysocka M, Tellez E, Monteiro O, Spencer L, Veiga E, Monteiro S, de Pina C, Gonçalves D, de Pina S, Ludgero-Correia A, Moreno J, Conceição T, De Sousa M A, de Lencastre H, Gray LJ, Pareek M, Jenkins DR, Beleza S, Araujo II et al. 2020. A five-year retrospective study shows increasing rates of antimicrobial drug resistance in Cabo Verde for both *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. **22**: 483–487. DOI: 10.1016/j.jgar.2020.04.002.
- Motallebi M, Alibolandi Z, Aghmiyuni ZF, van Leeuwen WB, Sharif M R, Moniri R. 2021. Molecular analysis and the toxin, MSCRAMM, and biofilm genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from pemphigus wounds: A study based on SCCmec and dru typing. *Infection, Genetics and Evolution*. **87**. (e104644). DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104644.
- Moussé W, Sina H, Dougnon VT, Azonwadé F, Noumavo PA, Agbodjato NA, Assogba S, Baba-Moussa F, Adjanohoun A, Baba-Moussa L. 2020. Toxin production and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* strains isolated from market gardening products and their irrigation water in cotonou, Benin. *Journal of Agriculture and Food Research*. **2** (e100063) DOI: 10.1016/j.jafr.2020.100063.
- Nafis A, Kasrati A, Jamali CA, Mezrioui N, Setzer W, Abbad A, Hassani L. 2019. Antioxidant activity and evidence for synergism of *Cannabis sativa* (L.) essential oil with antimicrobial standards. *Industrial Crops and Products*. **137**: 396–400. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.05.032.
- Nalli Y, Arora P, Riyaz-Ul-Hassan S, Ali A. 2018. Chemical investigation of *Cannabis sativa* leading to the discovery of a prenylspiroidinone with anti-microbial potential. *Tetrahedron Letters*. **59**: 2470–2472. DOI: 10.1016/j.tetlet.2018.05.051.
- Pacha PA, Munoz MA, González-Rocha G, San Martín I, Quezada-Aguiluz M, Aguayo-Reyes A, Bello-Toledo H, Latorre AA. 2021. Molecular diversity of *Staphylococcus aureus* and

- the role of milking equipment adherences or biofilm as a source for bulk tank milk contamination. *Journal of Dairy Science*. **104**: 3522–3531. DOI: 10.3168/jds.2020-19121.
- Pérez VKC, Costa GM da, Guimarães A S, Heinemann MB, Lage AP, Dorneles EMS. 2020. Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. **22**: 792–802. DOI: 10.1016/j.jgar.2020.06.010.
- Pesavento G, Calónico C, Bilia AR, Barnabei M, Calesini F, Addona R, Mencarelli L, Carmagnini L, Di Martino MC, Lo Nostro A. 2015. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*. **54**: 188–199. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.01.045.
- Poma N, Vivaldi F, Bonin, A, Salvo P, Kirchhain A, Ates Z, Melai B, Bottai D, Tavanti A, Di Francesco F. 2021. Microbial biofilm monitoring by electrochemical transduction methods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. **134** (e116134). DOI: 10.1016/j.trac.2020.116134.
- Pourhajibagher M, Rahimi-esboei B, Ahmadi H, Bahador A. 2021. The anti-biofilm capability of nano-emodin-mediated sonodynamic therapy on multi-species biofilms produced by burn wound bacterial strains. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. **34** (e102288). DOI: 10.1016/j.pdpdt.2021.102288.
- Raafat D, Otto M, Reppschläger K, Iqbal J, Holtfreter S. 2019. Fighting *Staphylococcus aureus* Biofilms with Monoclonal Antibodies. *Trends in Microbiology*. **27**: 303–322. DOI: 10.1016/j.tim.2018.12.009.
- Saki M, Seyed-Mohammadi S, Montazeri E A, Siahpoosh A, Moosavian M, Latifi SM. 2020. In vitro antibacterial properties of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil against clinical extensively drug-resistant bacteria. *European Journal of Integrative Medicine*. **37**. DOI: 10.1016/j.eujim.2020.101146.
- Shalayel MHF, Asaad AM, Qureshi MA, Elhussein AB. 2017. Anti-bacterial activity of peppermint (*Mentha piperita*) extracts against some emerging multi-drug resistant human bacterial pathogens. *Journal of Herbal Medicine*. **7**: 27–30. DOI: 10.1016/j.hermed.2016.08.003.
- Sharabiani H R, Sadeghi J, Pirzade T, Rezaee M A, Ghotaslou R, Laghousi D, Sefidan F Y, Kafil H S, Nikbakht M, Mazraeh F N, Hematyar Y. 2021. Comparison of superantigens and attachment factors genes of *Staphylococcus aureus* in clinical isolates and nasal colonizers in the same patients. *Microbial Pathogenesis*. **154** (e104860). DOI: 10.1016/j.micpath.2021.104860.

- Sharma HB, Panigrahi S, Sarmah AK, Dubey BK. 2019. Journal of Applied Microbiology. Science of the Total Environment. 135907. DOI: 10.1016/j.idairyj.2021.105066.
- Silva GO, Castro R D, Oliveira L G, Sant'Anna F M, Barbosa CD, Sandes SHC, Silva RS, Resende MFS, Lana AMQ, Nunes AC, Cerqueira MMOP, Souza MR. 2020. Viability of *Staphylococcus aureus* and expression of its toxins (SEC and TSST-1) in cheeses using *Lactobacillus rhamnosus* D1 or *Weissella paramesenteroides* GIR16L4 or both as starter cultures. Journal of Dairy Science. **103**: 4100–4108. DOI: 10.3168/jds.2018-16037.
- Subramanian D, Natarajan J. 2021. Integrated meta-analysis and machine learning approach identifies acyl-CoA thioesterase with other novel genes responsible for biofilm development in *Staphylococcus aureus*. Infection, Genetics and Evolution. **88** (e104702). DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104702.
- Sudagidan M, Ozalp VC, Öztürk O, Yurt MNZ, Yavuz O, Tasbasi B B, Ucak S, Mavili Z S, Coban A, Aydin A. 2021. Bacterial surface, biofilm and virulence properties of *Listeria monocytogenes* strains isolated from smoked salmon and fish food contact surfaces. Food Bioscience. **41**. DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101021.
- Tariq S, Wani S, Rasool W, Shafi K, Bhat MA, Prabhakar A, Shalla AH, Rather MA. 2019. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. Microbial Pathogenesis. **134** (e103580). DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103580.
- Thomsen NA, Hammer KA, Riley TV, Van Belkum A, Carson CF. 2013. Effect of habituation to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on the subsequent susceptibility of *Staphylococcus* spp. to antimicrobials, triclosan, tea tree oil, terpinen-4-ol and carvacrol. International Journal of Antimicrobial Agents. **41**: 343–351. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2012.12.011.
- Torabi S, Joharchi K, Kalhori KAM, Sohrabi M, Fekrazad R. 2021. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy on wounds infected by *Staphylococcus aureus* in animal models. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. **33** (e102092). DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.102092.
- Toushik SH, Mizan MFR, Hossain MI, Ha S Do. 2020. Fighting with old foes: The pledge of microbe-derived biological agents to defeat mono- and mixed-bacterial biofilms concerning food industries. Trends in Food Science and Technology, **99**: 413–425. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.03.019.
- Wang Y, Jagers RM, Mar P, Galley JD, Shaffer T, Rajab A, Deshpande S, Mashburn-Warren L, Buzzo JR, Goodman SD, Bailey MT, Besner GE. 2021. *Lactobacillus reuteri* in its biofilm state promotes neurodevelopment after experimental necrotizing enterocolitis in rats. Brain, Behavior, & Immunity – Health. **14** (e100256). DOI: 10.1016/j.bbih.2021.100256.

- Yan J, Yang R, Yu S, Zhao W. 2021. The application of the lytic domain of endolysin from *Staphylococcus aureus* bacteriophage in milk. *Journal of Dairy Science*. **104**: 2641–2653. DOI: 10.3168/jds.2020-19456.
- Yan X, Gu S, Cui X, Shi Y, Wen S, Chen H, Ge J. 2019. Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. *Microbial Pathogenesis*. **127**: 12–20. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.11.039.
- Yu H, Liu Y, Yang F, Xie Y, Guo Y, Cheng Y, Yao W. 2021. Synergistic efficacy of high-intensity ultrasound and chlorine dioxide combination for *Staphylococcus aureus* biofilm control. *Food Control*. **122** (e107822) DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.107822.
- Zhang L, Zhu C, Chen X, Xu X, Wang H. 2021. Resistance of detached-cells of biofilm formed by *Staphylococcus aureus* to ultra high pressure homogenization. *Food Research International*. **139** (e109954). DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109954.
- Zhang Y, Liu X, Wang Y, Jiang P, Quek SY. 2016. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*. **59**: 282–289. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.05.032.
- Zhang, L, Liang E, Cheng Y, Mahmood T, Ge F, Zhou K, Bao M, Lv L, Li L, Yi J, Lu C, Tan Y. 2020. Is combined medication with natural medicine a promising therapy for bacterial biofilm infection? *Biomedicine and Pharmacotherapy*. **128**. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110184.

