

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Mikrobiální biofilmy a vliv přírodních látek

Karolína Hausmannová

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Karolína Hausmannová**  
Osobní číslo: **C14269**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Mikrobiální biofilmy a vliv přírodních látek**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši na zadané téma, v úvodu práce se věnujte shrnutí základních informací o bakteriálních biofilmech.
2. Část textu věnujte přírodním matricím a extraktům z nich získávaných.
3. Uveďte metodiky použitelné pro zjišťování tvorby biofilmu za podmínek vlivu přírodních antimikrobiálně působících látek.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. David Šilha, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce:

**Ing. Lucie Šilhová, Ph.D.**

Dr. Müller Pharma, s.r.o., Hradec Králové

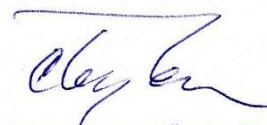
Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

**Souhlasím** s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 23. 6. 2017

Karolína Hausmannová

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu své bakalářské práce Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D. a konzultantce Ing. Lucii Šilhové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, veškerou pomoc, čas a ochotu, kterou mi věnovali při zpracování mé bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat všem, kteří mě v průběhu studia podporovali, zejména své rodině, která mi zajistila podmínky pro studium.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá mikrobiálními biofilmy a přírodními látkami, které mají vliv na tvorbu biofilmu. Práce zahrnuje charakteristiku biofilmu, rozdělení dle typu mikroorganismů, kterými je tvořen a výskyt. Dále jsou uvedeny vybrané přírodní látky, které tvorbu biofilmu ovlivňují. Práce se dále věnuje metodám, pomocí kterých lze sledovat účinky přírodních antimikrobiálních látek na tvorbu biofilmu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

biofilm, přírodní látky, antimikrobiální látky, antibiofilmová aktivita, eliminace biofilmu

## **TITLE**

Microbial biofilms and the effect of natural compounds

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with microbial biofilms and natural substances that influence the formation of biofilm. The work includes characterization of biofilm, distribution according to the type of microorganisms in which it is formed and occurrence. There are also selected natural substances which influence biofilm formation. The thesis also deals the methods by which the effects of natural antimicrobial substances on biofilm formation can be monitored.

## **KEYWORDS**

biofilm, natural compounds, antimicrobial agents, antibiofilm activity, elimination of biofilm

# OBSAH

|  |    |
|--|----|
| SEZNAM OBRÁZKŮ .....   | 9  |
| SEZNAM ZKRATEK .....   | 10 |
| 0 ÚVOD .....   | 11 |
| 1 MIKROBIÁLNÍ BIOFILM .....  | 12 |
| 1.1 Bakteriální biofilm .....  | 12 |
| 1.1.1 Formování biofilmu a jeho struktura .....                            | 13 |
| 1.2 Další druhy biofilmu .....   | 16 |
| 1.2.1 Biofilm kvasinek .....   | 17 |
| 1.2.2 Biofilm plísní .....   | 18 |
| 1.3 Výskyt biofilmů .....  | 19 |
| 2 PŘÍRODNÍ LÁTKY S ANTIMIKROBIÁLNÍM ÚČINKEM .....                          | 21 |
| 2.1 Vybrané antimikrobiální látky a matrice, ve kterých se nacházejí ..... | 21 |
| 2.1.1 Berberin .....   | 22 |
| 2.1.2 Sanguinarin .....  | 23 |
| 2.1.3 Thymol .....   | 23 |
| 2.1.4 Karvakrol .....  | 24 |
| 2.1.5 Eugenol .....  | 25 |
| 2.1.6 Antokyany .....  | 25 |
| 2.1.7 Rutin .....  | 26 |
| 2.1.8 Kvercetin .....  | 27 |
| 2.1.9 Morin .....  | 28 |
| 2.1.10 Linalol .....   | 28 |
| 2.1.11 Farnesol .....  | 30 |
| 2.1.12 Mentol .....  | 30 |
| 2.1.13 Kafr .....  | 31 |
| 2.1.14 Artemisinin .....   | 32 |
| 2.1.15 Esenciální oleje .....  | 32 |
| 2.1.16 Allicin .....   | 33 |
| 2.1.17 Cinnamaldehyd .....   | 33 |
| 2.1.18 Vanilin .....   | 34 |
| 3 TESTOVÁNÍ VLIVU PŘÍRODNÍCH LÁTEK NA TVORBU BIOFILMU .....                | 35 |

|   |    |
|---|----|
| 3.1 Metodiky pro sledování tvorby biofilmu v přítomnosti antimikrobiálních látek..... | 35 |
| 3.1.1 Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách .....                        | 35 |
| 3.1.2 Christensenova metoda ve zkumavkách.....  | 37 |
| 3.1.3 Kultivace na agaru s kongo-červení .....  | 37 |
| 3.1.4 Mikroskopické metody .....  | 39 |
| 3.2 Vliv přírodních látek na tvorbu biofilmu .....                                    | 40 |
| 3.2.1 Berberin .....  | 40 |
| 3.2.2 Sanguinarin.....  | 40 |
| 3.2.3 Karvakrol, thymol a eugenol .....   | 41 |
| 3.2.4 Rutin, kvercetin a morin .....  | 41 |
| 3.2.5 Farnesol .....  | 42 |
| 3.2.6 Mentol.....   | 42 |
| 3.2.7 Esenciální oleje.....   | 42 |
| 3.2.8 Ostatní přírodní látky.....   | 43 |
| 4 ZÁVĚR .....   | 45 |
| 5 LITERÁRNÍ ZDROJE .....  | 46 |



## SEZNAM OBRÁZKŮ

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Obrázek 1</b>  | Vývojová stádia tvorby biofilmu (Van Houdt a Michiels, 2005).....   | 15 |
| <b>Obrázek 2</b>  | Chemická struktura N-acyl-homoserin laktonu (vlastní nákres) .....  | 16 |
| <b>Obrázek 3</b>  | Biofilm kvasinky <i>Candida albicans</i> , elektronová mikroskopie (měřítko 10 µm) (upraveno Ramage a kol., 2005).....                  | 18 |
| <b>Obrázek 4</b>  | Biofilm plísně <i>Aspergillus oryzae</i> vytvořený okolo Ca alginátu, elektronová mikroskopie (měřítko 10 µm) (Ghaed a kol., 2015)..... | 19 |
| <b>Obrázek 5</b>  | Chemická struktura berberinu (Chatuphonprasert a kol., 2013).....   | 22 |
| <b>Obrázek 6</b>  | Chemická struktura sanguinarinu (www.medchemexpress.com).....   | 23 |
| <b>Obrázek 7</b>  | Chemická struktura thymolu (Hajmehdipoor a kol., 2010).....   | 24 |
| <b>Obrázek 8</b>  | Chemická struktura karvakrolu (Hajmehdipoor a kol., 2010).....  | 25 |
| <b>Obrázek 9</b>  | Chemická struktura antokyanů (Jing a kol., 2014).....   | 26 |
| <b>Obrázek 10</b> | Chemická struktura rutinu (Macikova a kol., 2012).....  | 27 |
| <b>Obrázek 11</b> | Chemická struktura kvercetinu (Leela a Saraswathy, 2013).....   | 28 |
| <b>Obrázek 12</b> | Chemická struktura morinu (www.intechopen.com).....   | 28 |
| <b>Obrázek 13</b> | Chemická struktura linalolu (chemistry.about.com).....  | 29 |
| <b>Obrázek 14</b> | Chemická struktura farnesolu (upraveno Nickerson a kol., 2006).....   | 30 |
| <b>Obrázek 15</b> | Chemická struktura mentolu (www.jpbonline.org).....   | 31 |
| <b>Obrázek 16</b> | Chemická struktura kafru (www.tnjchem.com).....   | 31 |
| <b>Obrázek 17</b> | Chemická struktura artemisininu (en.pharmacodia.com).....   | 32 |
| <b>Obrázek 18</b> | Chemická struktura allicinu (pharmaxchange.info).....   | 33 |
| <b>Obrázek 19</b> | Chemická struktura cinnamaldehydu (thescienceofacne.com).....   | 34 |
| <b>Obrázek 20</b> | Chemická struktura vanilinu (Hamd a kol., 2013).....  | 34 |
| <b>Obrázek 21</b> | Antimikrobiální efekt mátového esenciálního oleje vůči bakterii <i>Escherichia coli</i> (Bitencourt a kol., 2014).....                  | 43 |

## SEZNAM ZKRATEK

|           |   |
|-----------|---|
| A.        | <i>Aspergillus</i>                                  |
| AB médium | minimální růstové médium pro bakteriální kultury    |
| BHI       | mozkosrdcová infúze                                 |
| CLSM      | konfokální laserová skenovací mikroskopie           |
| DNA       | deoxyribonukleová kyselina                          |
| EPS       | extracelulární polymerní látky                      |
| LB        | lysogenní vývar                                     |
| MBC       | minimální baktericidní koncentrace                  |
| MIC       | minimální inhibiční koncentrace                     |
| MRSA      | methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> |
| NAHL      | N-acyl-homoserin lakton                             |
| QS        | <i>quorum sensing</i>                               |
| TSB       | tryptonosojový bujón                                |

## 0 ÚVOD

Mikrobiální společenstva, zvané biofilmy jsou neodmyslitelnou součástí našeho života. Ačkoliv nemusí být na první pohled viditelné, při větším zkoumání a bádání se s nimi můžeme setkat prakticky kdekoliv. Díky této formě života, jsou velice odolné a mnohdy je těžké je eliminovat. V poslední době se studie zabývají přírodními látkami, které mají antimikrobiální účinky a mohly by tvorbu biofilmu ovlivňovat.

Jak je známo, přírodní léčivé látky, které jsou obsaženy zejména v rostlinách, jsou vyhledávaným předmětem dodnes. Současnost si vzala do své moci chemie, která na nás útočí ze všech stran. Díky vědě a výzkumu se stále objevují nové a nové látky, ze kterých se vyrábí léky, které nám mají pomoci při různých zdravotních obtížích. Ne každý chce však svůj organismus zatěžovat těmito syntetickými látkami, pokud to není nevyhnutelné a mnoho lidí se obrací právě k léčivým rostlinám, ve kterých vidí naději a větší úspěšnost při prevenci nebo léčbě různých onemocnění.

Cílem této práce bylo seznámení se s termínem biofilm, jeho formováním a strukturou. Dále pak vybrání konkrétních přírodních látek s antimikrobiálním účinkem a jejich vlivem na tvorbu biofilmu. V neposlední řadě také zmínění vybraných metodik pro sledování tvorby biofilmu a také testování vlivu přírodních látek na něj.

# 1 MIKROBIÁLNÍ BIOFILM

## 1.1 Bakteriální biofilm

Bakterie jsou všude kolem nás a tvoří tak svůj vlastní rozsáhlý svět. Mohou se vyskytovat v planktonní formě nebo v podobě biofilmu. Biofilm je tvořen větším množstvím mikrobiálních buněk, které přisedají k různým povrchům, ale i k sobě navzájem (Davey a O'Toole, 2000). Toto společenstvo přináší mikroorganismům mnoho výhod. Dokáží spolu komunikovat, vytváří mezi sebou pevné vazby, čímž se zvyšuje účinnost celého biofilmu a odolnost vůči vnějším vlivům (Holá, 2012). Životu v tomto seskupení tak dává přednost většina mikroorganismů vyskytujících se v přírodě (Davey a O'Toole, 2000).

Ačkoliv se to nemusí zdát, každý z nás se s biofilmem jistě setkal, a to v podobě slizkých povlaků, vytvořených na různých předmětech. Biofilmové vrstvy mohou být silné natolik, že je můžeme vidět pouhým okem. Díky tomu patřily biofilmy mezi první předměty zkoumání v začátcích rozvoje mikrobiologie. Prvním, kdo pozoroval schopnost mikroorganismů přichytit se k povrchu a jejich následný růst do podoby biofilmu, byl nizozemský přírodovědec a průkopník mikroskopie Anthony van Leeuwenhoek. Ten ke svému pozorování využil mikroorganismy ze zubního plaku, díky čemuž se stal zubní plak jednou z nejprostudovanějších forem biofilmu (Donlan, 2002).

Biofilm může být tvořen jak přirozenou mikroflórou, která může být prospěšná pro člověka, tak i patogenními bakteriemi (Aparna a kol., 2009). Důsledkem jsou potom onemocnění nejen u lidí, ale i zvířat či rostlin (Holá, 2012). Právě tato onemocnění není možné léčit jen běžným podáváním léků, jelikož patogenní bakterie v biofilmu vykazují oproti planktonní formě vyšší toleranci vůči antibiotikům a antimikrobiálním látkám. V dnešní době jsou známy dvě strategie v boji s biofilmy. První možností je, že se předejde vzniku biofilmu, což spočívá v zabránění přichycení mikrobů na daný povrch či materiál. Druhou je eradikace, tedy úplné odstranění již existujícího biofilmu (Kvasničková a kol., 2016).

Soužití bakterií v biofilmu pro ně představuje významnou ochranu před mnoha nežádoucími podmínkami prostředí, jako jsou například UV záření, dehydratace, salinita, přítomnost toxických kovů, velmi nízké pH, nebezpečí fagocytózy, ale i před některými antibakteriálními prostředky a antibiotiky (Hall-Stooley a kol., 2004).

Jako typické zástupce této skupiny můžeme zmínit stafylokoky (například *Staphylococcus aureus*), dále streptokoky (například *Streptococcus gallolyticus* subsp. *Gallolyticus*), v neposlední řadě také enterokoky, anaerobní bakterie a gramnegativní tyčinky, jejichž zástupcem je například *Escherichia coli* nebo *Pseudomonas aeruginosa* a další (Davey a O'Toole, 2000).

### **1.1.1 Formování biofilmu a jeho struktura**

Stavba biofilmu může být velmi složitá. Na jeho vzniku se nemusí podílet jen jeden druh mikroorganismu. Často je tvořen desítkami druhů mikrobů. Celá struktura závisí jak na biologických, tak i na fyzikálních faktorech. Neustále prochází změnami, na které mají vliv vnější i vnitřní procesy. Nemění se však jen celková struktura biofilmu, ale dochází také ke změnám uvnitř mikrokolonií. Je to způsobeno migrací buněk uvnitř kolonií, ale i z kolonií do okolního prostředí (Donlan, 2002).

Biofilmy nejsou jen slizovité povlaky mikroorganismů, ale tvoří komplexní, strukturované a optimálně pracující systémy s vysokou úrovní organizace. To, jak bude daný biofilm vypadat, je ovlivněno bakteriemi, které danou strukturu tvoří. Mezi některými druhy dochází ke vzájemné podpoře, čímž dojde k vytvoření mohutnějších a mnohvrstevných biofilmů (Donlan, 2002). Tím, že spolu buňky uvnitř biofilmu vzájemně komunikují, dochází k vyššímu stupni genetické výměny. Genetická informace se vyměňuje především konjugací a přenosem plazmidů, které kódují geny rezistence k antibiotikům (Mulcahy a kol., 2008).

Základní stavební jednotkou biofilmu jsou tedy samostatné bakteriální buňky schopné tvorby mikrokolonií a mezibuněčná hmota (matrix), která vyplňuje prostor mezi buňkami. Jednotlivé mikrokolonie se skládají z mikrobiálních buněk, které jsou od ostatních mikrokolonií odděleny pomocí vodních kanálků. Ty mají v biofilmu důležitou funkci, jelikož zprostředkovávají tok kapaliny. Tím umožňují difúzi živin a kyslíku do buněk v biofilmu. Dále umožňují sekreci extracelulárních nebo odpadních produktů do okolního prostředí (Tolker-Nielsen a Molin, 2000).

Jak již bylo zmíněno, buňky uvnitř biofilmu obklopuje tzv. matrix, což je směs extracelulárních polymerních substancí (EPS). Matrix tvoří převážnou část biofilmu a buňky si ji vytváří samy. Je zodpovědná za udržování celé struktury a má vliv na aktuální podmínky v biofilmu. V závislosti na druhu biofilmu se liší chemickými a fyzikálními vlastnostmi (Davey a O'Toole, 2000). Záleží například na tom, jakým druhem mikroorganismů je biofilm tvořen, jak starý

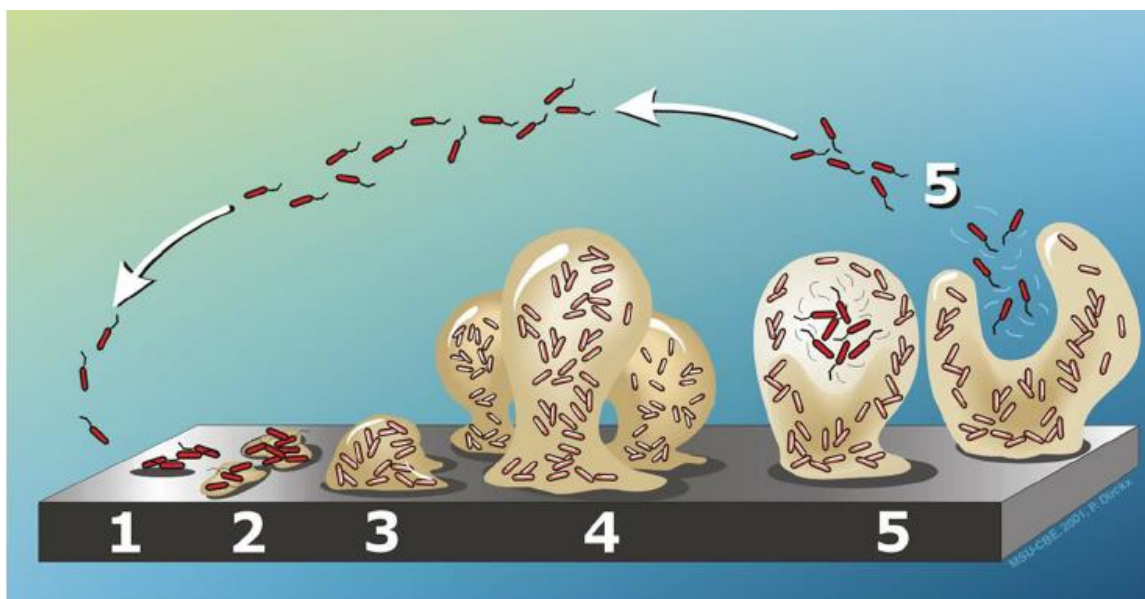
je daný biofilm a také na podmínkách okolního prostředí (například teplota, pH, dostupnost živin, rychlost vysychání, koncentrace kyslíku a dusíku) (Abdallah a kol., 2014). EPS dále chrání buňky před vlivy okolního prostředí a mají význam při adhezi buněk (Ahimou a kol., 2007). Jsou to vysokomolekulární látky, jejichž nejvýznamnější a nejpočetnější složkou jsou polysacharidy. U gramnegativních bakterií se jedná právě o polysacharidy, u grampozitivních bakterií se složení liší. Matrix obsahuje kromě polysacharidů i proteiny, glykoproteiny, glykolipidy a extracelulární DNA (deoxyribonukleová kyselina) (Donlan, 2002; Flemming a kol., 2007).

To, jak bude struktura biofilmu vypadat, záleží zejména na okolním prostředí, ve kterém se biofilm vytváří. Pokud se bakterie uchytí v prostředí bohatém na živiny, vytvoří tak komplexní biofilm s kanálkovitým systémem. V opačném případě, kdy se bude jednat o prostředí chudé na živiny, dojde k vytvoření biofilmu v podobě jedné nepravidelné vrstvy buněk (Jones a kol., 2007).

Významný faktor, který ovlivňuje strukturu biofilmu, je rychlost proudění kapaliny okolního prostředí. Biofilmy, které rostou v prostředí s velmi rychlým prouděním kapaliny, jsou hustší a hladší. V prostředí, ve kterém kapalina proudí pomaleji, jsou biofilmy pórovitější (Choi a kol., 2013).

Jak již bylo zmíněno, povrch biofilmu může být hladký či drsný. Je tedy nerovnoměrný a různorodý. Buňky na okrajích biofilmu rostou rychleji, protože získávají živiny z okolního prostředí, přičemž mají vliv na dosažitelnost živin pro buňky žijící uvnitř biofilmu. To, jakou rychlostí probíhá difúze živin a jakou rychlostí dojde k jejich zpracování má vliv na tloušťku celého biofilmu. Biofilm je silnější, pokud okolní prostředí obsahuje dostatek živin (Nadell a kol., 2009).

Proces formování biofilmu má obecně pět vývojových fází. V počáteční fázi dochází k adhezi bakterií k nějakému povrchu, kdy se začne buňka po přilnutí množit a následuje tvorba mikrokolonií. Během tohoto procesu jsou produkovány látky, které se podílí na tvorbě mezibuněčné hmoty. Dále dochází k maturaci biofilmu (zrání biofilmu). V poslední fázi cyklu dochází k disperzi (uvolňování) buněk z biofilmu do okolního prostředí. Tyto buňky si následně opět hledají vhodné místo k adhezi, čímž mohou zahájit nový cyklus tvorby biofilmu (Abdallah a kol., 2014). Vše je přehledně znázorněno na **obrázku 1**.



**Obrázek 1** Vývojová stádia tvorby biofilmu (Van Houdt a Michiels, 2005)

1 - reverzibilní adheze, 2 - ireverzibilní adheze, 3 - mikrokolonie, 4 - zrání biofilmu, 5 - disperze

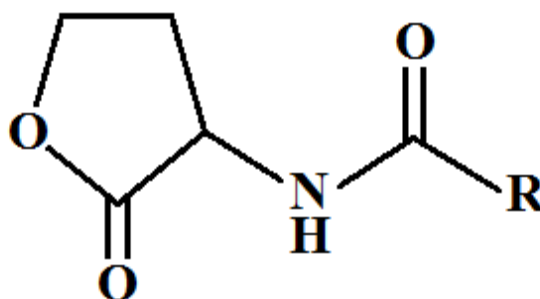
Nejdříve tedy planktonní buňky hledají vhodné místo k adhezi. Jakmile se buňka dostatečně přiblíží k danému povrchu, začnou na ní působit různé fyzikální síly (například van der Waalsovy síly, elektrostatické či hydrofobní interakce, Lewisovy acidobazické síly), které umožňují buňce reverzibilní (vratnou) adhezi k povrchu, během které ještě mohou jednotlivé buňky daný povrch opustit a zůstat tak v planktonní formě. Když však buňky na povrchu zůstanou přichyceny, začne mezi nimi a povrchem docházet k interakcím. Tato adheze je ireverzibilní (nevratná) díky adhezínům (proteinům), které mikroorganismy samy vyprodukovaly (Choi a kol., 2013).

#### 1.1.1.1 *Quorum sensing*

*Quorum sensing* (QS) je proces, který umožňuje buňkám reagovat na různé podněty, čímž se dokáží včas chránit před nepříznivými podmínkami (De Kievit, 2009). QS je tedy mechanismus, který umožňuje mezibuněčnou komunikaci, kontrolu chování v populaci a přizpůsobivost podmínkám okolního prostředí. QS zabezpečuje koordinovanou regulaci exprese genu (Conway a Cohen, 2015). První zmínka týkající se QS byla zaznamenána během studia luminiscentní mořské bakterie *Vibrio fischeri* (Miller a Bassler, 2001).

QS reguluje pomocí signálních molekul (autoinduktorů) bakteriální aktivitu například při formování biofilmu, sporulaci, rezistenci vůči antibiotikům, bioluminiscenci či při bakteriální virulenci, aj. (Turan a kol., 2017). Se zvyšujícím se počtem buněk v populaci se zvyšuje i koncentrace autoinduktorů až do bodu, kdy může interagovat s transkripčními regulátory uvnitř buňky, což vede ke změně genové exprese (Conway a Cohen, 2015).

Mezi autoinduktory se řadí borové deriváty ribózy, dále peptidy, které jsou charakteristické pro grampozitivní bakterie, mezi které se řadí například *Streptococcus pneumoniae* a také laktony, například N-acyl-homoserin lakton (NAHL) (chemická struktura znázorněna na **obrázku 2**) typický pro gramnegativní bakterie, jako je například *Pseudomonas aeruginosa* (Williams a kol., 2000).



**Obrázek 2** Chemická struktura N-acyl-homoserin laktonu (vlastní nákres)

### 1.1.1.2 Faktory ovlivňující tvorbu biofilmu

Schopnost adheze mikroba závisí na vlastnostech daného povrchu. Ten může být buď hydrofobní (různé plasty, teflon, silikon nebo například latex), anebo hydrofilní (sklo a různé kovy). Velmi důležitou vlastností povrchových materiálů je také drsnost. Některé povrchy jsou hladké, například silikon, kdežto jiné jsou mnohem drsnější, například vodovodní potrubí (Donlan, 2002). Ideálním místem pro tvorbu biofilmu jsou různé nerovnosti, zlomy, trhliny, rohy a zákruty na daných površích, neboť jsou v průběhu čištění špatně přístupné (Chmielewski a Frank, 2003).

## 1.2 Další druhy biofilmu

V tomto rozsáhlém mikrobiálním světě existuje doposud nejvíce informací týkajících se bakteriálního biofilmu. Další, tedy méně probádanou oblastí jsou biofilmy kvasinek. Nejméně



informací je pak v oblasti výzkumu biofilmů plísní. Všechny tyto tři skupiny biofilmů spolu však mohou vytvářet smíšená společenstva (Kalan a kol., 2016).

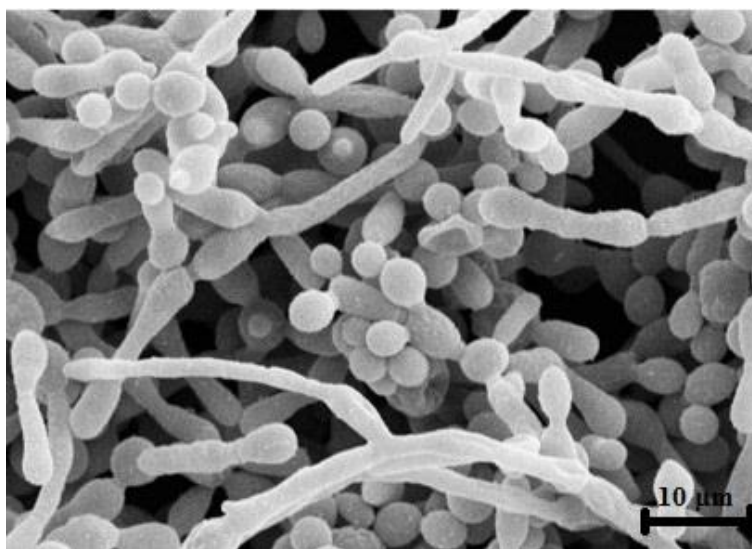
### 1.2.1 Biofilm kvasinek

Jak již bylo zmíněno výše, o biofilmu kvasinek existuje menší množství informací, než je tomu v případě bakteriálních biofilmů. V posledních desetiletích však zájem o studium v této oblasti, zejména biofilmu tvořeném kvasinkami rodu *Candida*, vzrůstá. Kvasinkový biofilm může zodpovídat za nozokomiální infekce. Tvorba biofilmu je faktorem virulence, jenž kvasinkám umožňuje kolonizovat „živé“ i umělé povrchy. Patří sem zejména různé implantáty, podobně jako u bakteriálních biofilmů. O tom, zda kvasinka adhezuje k danému povrchu opět rozhodují vlastnosti daného povrchu, ale i kvasinky samotné. Stejně tak jako bakterie, jsou i kvasinky rostoucí v podobě biofilmu vysoce rezistentní k antimikrobiálním látkám. Právě proto je pro léčbu infekcí nejlepší odstranit celý napadený implantát (Douglas, 2003). Nejlepší prevencí, jak předcházet infekcím způsobených biofilmy je správné ošetřování implantátů a dodržování aseptických podmínek při manipulaci s nimi. Toto platí i v případě bakteriálních biofilmů a biofilmů plísní (Holá a kol., 2007).

Velký význam pro tvorbu kvasinkového biofilmu má tvorba hyf a pseudohyf (vláknité útvary připomínající hyfu). Vznikají zřetěžením jednotlivých buněk, takže následně vypadají jako řetízky. Tyto kvasinkové buňky tvořící biofilm produkují na rozdíl od bakterií jen malé množství extracelulární hmoty. Mezi zástupce, které tvoří biofilm patří například *Candida parapsilosis* a dobře známá *Candida albicans* (Holá a kol., 2007).

Biofilmy kvasinky *Candida albicans* tvořené na povrchu například katetru se skládají z mikrokolonií kvasinek a hyf uzavřených v matrix, které jsou uspořádané do dvouvrstvé struktury. Dle dostupné literatury jsou tyto biofilmy odolné vůči řadě antifungálních látek, včetně amfotericinu B a flukonazolu (Douglas, 2003). Ze studie, která byla zaměřena na tvorbu biofilmu klinických izolátů rodu *Candida* způsobujících infekce krevního řečiště vyplynulo, že vznik infekce způsobené biofilmem *Candida non-albicans* je oproti *Candida albicans* více pravděpodobný. *Candida albicans* je původcem onemocnění, která vznikají převážně jiným způsobem, než přenosem z vytvořeného biofilmu (Pannanusorn a kol., 2013).

Biofilm kvasinky *Candida albicans* na plastovém krycím sklíčku je zobrazen na **obrázku 3**.



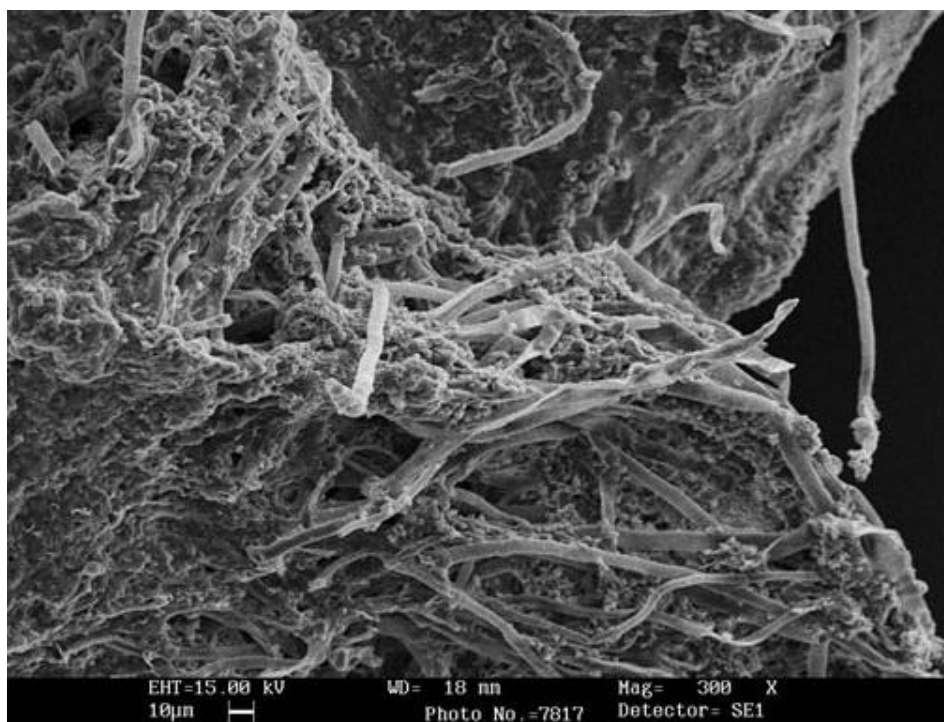
**Obrázek 3** Biofilm kvasinky *Candida albicans*, elektronová mikroskopie (měřítko 10  $\mu\text{m}$ ) (upraveno Ramage a kol., 2005)

### 1.2.2 Biofilm plísní

Jak již bylo zmíněno, nejméně pozornosti bylo věnováno oblasti biofilmu vláknitých hub (plísní). Plísně jsou zvláště přizpůsobivé růstu na různých površích. Nejvhodnějším prostředím pro růst takového biofilmu je vysoká vlhkost se vzdušným rozhraním (Villena a kol., 2010). I tato skupina má své zástupce jako je například *Aspergillus* spp. (například *A. fumigatus* aj.) (Kaur a Singh, 2013). *Aspergillus fumigatus* je všudypřítomná plíseň, která se ve vysokých koncentracích vyskytuje v prostředí bohatém na tlející vegetaci (Borkovich a Ebole, 2010).

*Aspergillus fumigatus* je hlavním původcem invazivní aspergilózy a je tak příčinou úmrtnosti pacientů s oslabeným imunitním systémem, u kterých byla tato nemoc diagnostikována. V důsledku nárůstu počtu imunokomprimovaných jedinců se výskyt invazivní aspergilózy v posledních dvou desetiletích neustále zvyšuje. Nedostatečně účinná léčba však stále přetrvává (Vargas-Muniz a kol., 2017).

Na **obrázku 4** je zobrazen biofilm vytvořený plísní *Aspergillus oryzae*.



**Obrázek 4** Biofilm plísně *Aspergillus oryzae* vytvořený okolo Ca alginátu, elektronová mikroskopie (měřítko 10 µm) (Ghaed a kol., 2015)

### 1.3 Výskyt biofilmů

Biofilmy nalezneme všude tam, kde se vyskytují mikroby. Vytváří se na různých fázových rozhraních. Většinou jde o kombinaci fáze pevné a tekuté nebo pevné a vzdušné (Davey a O'Toole, 2000). Biofilmy jsou takřka všudypřítomné, vyskytují se v půdách, sedimentech, odpadech, v ústech, tlustém střevě či na implantovaných zdravotnických přístrojích, aj. (Dautle a kol., 2003).

Schopnost bakterií tvořit biofilm má negativní důsledky hlavně v oblasti medicíny, kde kolonizují například poškozené tkáně, chirurgické stehy či kontaktní čočky, ale také adherují například na implantované chirurgické náhrady, plastové pomůcky, srdeční chlopně, kloubní protézy, katetry nebo endotracheální trubice, čímž mohou způsobit řadu chronických infekcí (Abdallah a kol., 2014; Percival a kol., 2014).

Biofilm můžeme nalézt i v dutině ústní, kde se podílí na vzniku zubního plaku. Zubní plak je tvořen primárně ústními streptokoky přichycenými na inertní zubní sklovinu. Následně se může tvořit i zubní kaz, který vzniká především reakcí kyseliny mléčné a jiných kyselých metabolitů se zubní sklovinou. Kromě toho, že jsou tedy biofilmy příčinou zubního kazu, mohou

způsobovat i zánět dásní či prostaty, infekce středního ucha nebo i plicní infekce u pacientů s cystickou fibrózou (Holá, 2012).

S biofilmem se však nesetkáváme jen v oblasti medicíny a u člověka samotného, ale i na různých místech v přírodě. Zejména ve vodě nebo na místech s vodou spojených. Může se jednat o různé trubky a potrubí, vodovodní kohoutky, anebo například kámen, který je na dně pod vodou aj. (Rulík, 2012).

Ačkoli se to nezdá, biofilmová společenstva mikroorganismů se běžně vyskytují i v domácnostech či potravinářství, kde mohou způsobit kontaminaci potravin. Nejvíce nebezpečné jsou pro člověka ty potraviny, které konzumujeme nedostatečně tepelně upravené. Nejčastěji je to ovoce a zelenina. Biofilmy mohou mít ale i prospěšný význam, a to například při degradaci toxických látek či čištění odpadních vod aj. (Branda a kol., 2005).

## 2 PŘÍRODNÍ LÁTKY S ANTIMIKROBIÁLNÍM ÚČINKEM

Přírodní látky, které mají antimikrobiální účinky, v našem světě hrají velice významnou roli. Léčivé rostliny a přírodní léky bychom mohli obecně považovat za tzv. přírodní antibiotika. Mohou mít protizánětlivé, podpůrné či tlumící účinky, například dokáží snížit horečku (Wenzel, 2014). V dnešní době se zájem o přírodní antibakteriální látky po celém světě neustále zvyšuje (Olowosulu a Ibrahim, 2006). Za součást alternativní medicíny je považována i tradiční čínská medicína, která využívá především rostlinné materiály důležité pro léčbu a prevenci různých nemocí (Zuo, 2012).

Jak již bylo zmíněno, léčivé rostliny mají antibakteriální, antimykotické a antivirové účinky. Základem pro to, aby rostlina tyto účinky měla, je obsah biologicky aktivních látek. Tyto látky vznikají nebo se mohou ukládat v celém těle rostliny, ale i v jejích jednotlivých částech (například v kořenech, stoncích, listech, květech aj.) (Wenzel, 2014).

Bylo provedeno několik studií, které prokázaly, že existuje silná vazba mezi stravou bohatou na ovoce, zeleninu a obilí a poklesem výskytu některých onemocnění, jako je rakovina, kardiovaskulární příhody a akutní i chronické onemocnění kůže, mezi které patří poruchy fotosenzitivity či rakovina kůže (Roleira a kol., 2015). Phytochemické látky tedy hrají velmi důležitou roli v prevenci chronických onemocnění (Idehen a kol., 2016). V současné době jsou phytochemické látky úzce spojeny s funkčními potravinami a potravinovými doplňky (Roleira a kol., 2015).

### 2.1 Vybrané antimikrobiální látky a matrice, ve kterých se nacházejí

Nejvýznamnějšími látkami vyskytujícími se v říši rostlin jsou alkaloidy, fenoly, terpeny, glykosidy a silice. Jsou to sekundární metabolity rostlin, se kterými se však můžeme setkat i u živočichů, v houbách či mikroorganismech. Živočichové však své sekundární metabolity produkují pouze z nutnosti, anebo je ukládají v orgánech. Mikroorganismy je naopak vylučují do životního prostředí. Nejjednodušším způsobem, jak tyto látky získat, je tedy právě izolace z rostlin (Appendino a kol., 2010).

Rostlinné antimikrobiální látky zahrnují esenciální oleje a rostlinné extrakty, dále i fenolové sloučeniny či těkavé terpenoidy aj. Esenciální oleje a rostlinné extrakty byly značně prozkoumány a velké množství studií poukazuje na jejich potenciál ke snižování obsahu

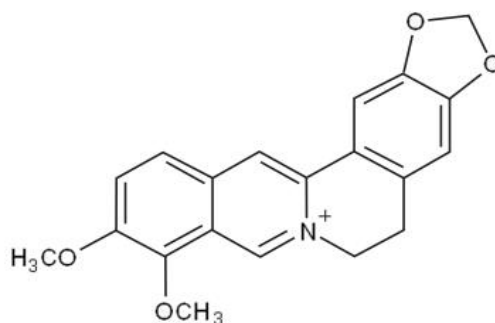
patogenů přenášených potravinami. Všechny rostlinné zdroje potravin obsahují fytochemické látky. Mezi tyto zdroje patří zejména ovoce, zelenina, ale i třeba obilí (Sung a kol., 2013).

Následující podkapitoly jsou věnovány vybraným přírodním látkám, které mají antimikrobiální účinky a vliv na tvorbu biofilmu.

### 2.1.1 Berberin

Berberin je alkaloid vyskytující se v několika rostlinách, včetně koptisů (*Coptis* sp.) a dřívěšálů (*Berberis* sp.) (Imenshahidi a Hosseinzadeh, 2016). Alkaloidy jsou obecně významné chemické sloučeniny sloužící jako bohatý zdroj léčiv. Jedná se o složité organické molekuly obsahující heterocyklický kruh s atomem dusíku, které jsou hojně využívány pro své různorodé farmakologické vlastnosti. Vyskytují se v mnoha organismech, včetně mikrobusů a zvířat. Velmi rozmanité spektrum těchto sloučenin ovšem obsahují zejména vyšší rostliny (Murphy, 2016). Tyto látky mají mnoho účinků, mezi které patří například účinky antibakteriální či antivirulentní (Barbieri a kol., 2016). Některé alkaloidy jsou prospěšné v oblasti medicíny, zatímco jiné jsou pro člověka toxické či potenciálně nebezpečné. Největší úsilí současnosti spočívá v nalezení nových druhů rostlin a mikrobusů, které jsou schopny produkovat vysoké hladiny užitečných alkaloidů vhodných pro lékařské účely a za nízké náklady (Murphy, 2016).

Berberin je příkladem alkaloidů, které jsou izolovány z rostlin za účelem používání jako přírodní konzervační látky (Hintz a kol., 2015). Berberin je dále izolovaný z mnoha léčivých čínských bylin jako je Mahonie Bealeova (*Mahonia bealei*), z kůry Korkovníku amurského (*Cortex phellodendri*) a z oddenku koptisu (*Rhizoma coptidis*). Byl široce používán jako protizánětlivý a antibakteriální prostředek k léčbě mnoha nemocí již po celá staletí (Wang a kol., 2017c). Chemická struktura berberinu je znázorněna na **obrázku 5**.

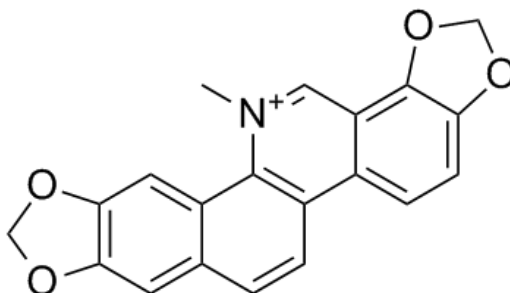


**Obrázek 5** Chemická struktura berberinu (Chatuphonprasert a kol., 2013)

Bylo zveřejněno mnoho studií, které se zabývaly vlastnostmi a klinickým využitím berberinu pro léčbu nádorů, cukrovky, kardiovaskulárních onemocnění, hyperlipidémie, zánětů, virových a bakteriálních infekcí, duševních chorob, Alzheimerovy choroby, osteoporózy a mnoha dalších (Imenshahidy a Hosseinzadeh, 2016). Tato látka se také široce používá při léčení mikrobiálních infekcí. Ukázalo se, že je berberin silnou potencující látkou pro antibiotika. Synergické reakce mezi berberinem a běžně používanými antimikrobiálními látkami poukazují na terapeutické využití proti širokému spektru patogenních mikroorganismů, včetně methicillin-rezistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Chu a kol., 2016).

### 2.1.2 Sanguinarin

Sanguinarin je alkaloid získaný z oddenků Krvavěnky kanadské (*Sanguinaria canadensis*), který má širokou antimikrobiální aktivitu a protizánětlivé vlastnosti (Barbieri a kol., 2016). Sanguinarin je obsažen také například v oleji ze semen rostliny Máku mexického (*Argemone mexicana*) (Motarjemi a Ewen, 2014). Chemická struktura sanguinarinu je znázorněna na **obrázku 6**.

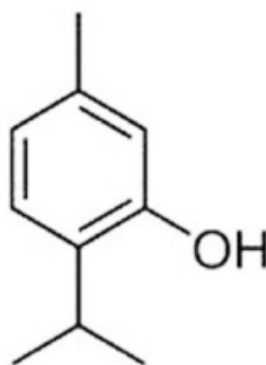


**Obrázek 6** Chemická struktura sanguinarinu (www.medchemexpress.com)

### 2.1.3 Thymol

Thymol je fenol. Tato látka účinně inhibuje celou řadu bakterií (Wang a kol., 2017b). Skupina fenolů a fenolických éterů je další významnou skupinou přírodních látek s antimikrobiálními účinky a vlivem na mikrobiální biofilm. Jedná se o látky, které jsou hojně zastoupeny v potravinách přírodního původu, ovoci, zelenině a rostlinách. Představují látky, které vykazují antimikrobiální aktivitu nabízející alternativu ke stávajícím antimikrobiálním látkám (Shahzad a kol., 2014; www.celostnimediceina.cz). Mezi hlavní zdroje potravinových fenolů pro člověka můžeme zařadit potraviny jako je čokoláda, víno, čaj, jahody či další čerstvé ovoce (Núñez a kol., 2015).

Již v roce 1994 byla provedena studie, jejíž výsledky naznačily, že thymol má užitečné antioxidační vlastnosti, a proto se mohl stát důležitou látkou pro hledání přírodních náhražek za syntetické antioxidanty (Aeschbach a kol., 1994). Další studie ukázala, že má thymol schopnost velmi rychle inhibovat bakterii *Actinobacillus pleuropneumoniae in vitro*. Narušuje integritu bakteriální membrány, což vede k jejímu rozpadu a následné smrti buněk (Wang a kol., 2017). Thymol je obsažen například v silici z tymiánu (*Thymus vulgaris*), Dobromysli obecné (*Origanum vulgare*) či Mateřídoušky obecné (*Thymus serpyllum*) (Shahzad a kol., 2014; www.celostnimediceina.cz). Thymol je také používán v oblasti hygieny dutiny ústní proti patogenům souvisejícím se zubním kazem (Peixoto-Neves a kol., 2010). Chemická struktura thymolu je zobrazena na **obrázku 7**.

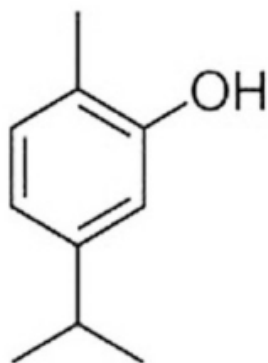


**Obrázek 7** Chemická struktura thymolu (Hajmehdipoor a kol., 2010)

#### 2.1.4 Karvakrol

Karvakrol, stejně jako thymol patří do skupiny fenolů a působí jako antioxidant. Obě tyto látky patří k nejaktivnějším antioxidantům nalezených v éterických olejích a mají mnoho biologických vlastností, jako jsou protizánětlivé, antibakteriální, antifungální, antikarcinogenní, antiagregační a další rozmanité účinky. Karvakrol i thymol jsou hlavními složkami esenciálních olejů z různých aromatických rostlin jako je například Tymián obecný (*Thymus vulgaris*), Dobromysl obecná (oregáno, *Origanium compactum*), *Acalypha phleoides* a *Lippia sidoides*, které jsou rozšířené v lidové medicíně a aromaterapii. *Lippia sidoides* se v tradiční medicíně používá pro léčbu různých lidských nemocí bakteriálního a mykotického původu. Dále se karvakrol i thymol běžně používají v potravinářství a kosmetice jako konzervační látky a antioxidanty (Peixoto-Neves a kol., 2010). Chemická struktura karvakrolu je uvedena na **obrázku 8**.





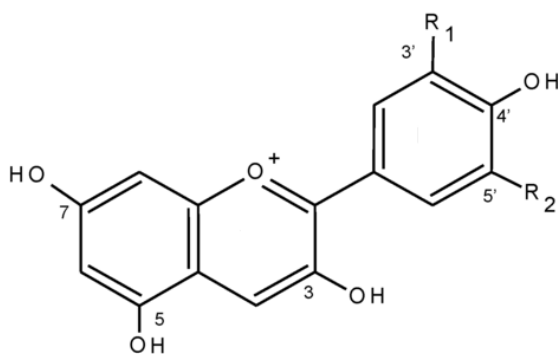
**Obrázek 8** Chemická struktura karvakrolu (Hajmehdipoor a kol., 2010)

### 2.1.5 Eugenol

Další látkou spadající do skupiny fenolů a fenolických éterů je eugenol. Je to olejovitá kapalina vyskytující se v medu, muškátovém oříšku, bobkovém listu, hřebíčku či květu Šácholánu lékařského (*Magnoliae flos*), aj. Je využíván pro lékařské účely. Eugenol má významný antiproliferativní účinek proti buňkám rakoviny tlustého střeva. Další studie poukázala na fakt, že je tato látka schopna inhibice širokého spektra patogenních a potravinových mikroorganismů (Jaganathan a kol., 2011; Sanla-Ead a kol., 2012; [www.celostnimedicina.cz](http://www.celostnimedicina.cz)).

### 2.1.6 Antokyany

V posledních letech stoupá zájem o polyfenoly, které se používají jako antimikrobiální látky. Velice významnou skupinou polyfenolových sloučenin jsou antokyany (Coccia a kol., 2012). Antokyany jsou barviva, která se nacházejí ve vakuolách mnoha rostlin a jsou zodpovědné za červenou, fialovou a modrou barvu okvětních lístků, zeleniny, hroznů, fíků, bobulí a mnoha dalších různých druhů ovoce. Jednotlivé antokyany mají různé chemické struktury (antokyanidin, aglykon), které se mění v počtu hydroxylových skupin připojených k hornímu kruhu a jejich stupni metylace (**obrázek 9**). Nejčastěji se vyskytuje 6 aglykonů - kyanidin, pelargonidin, malvidin, peonidin, delphinidin a petunidin (Krüger a kol., 2013).



| Anthocyanidins | Substitutes      |                  |
|----------------|------------------|------------------|
|                | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>   |
| Pelargonidin   | H                | H                |
| Cyanidin       | OH               | H                |
| Delphinidin    | OH               | OH               |
| Peonidin       | OCH <sub>3</sub> | H                |
| Petunidin      | OCH <sub>3</sub> | OH               |
| Malvidin       | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> |

**Obrázek 9** Chemická struktura antokyanů (Jing a kol., 2014)

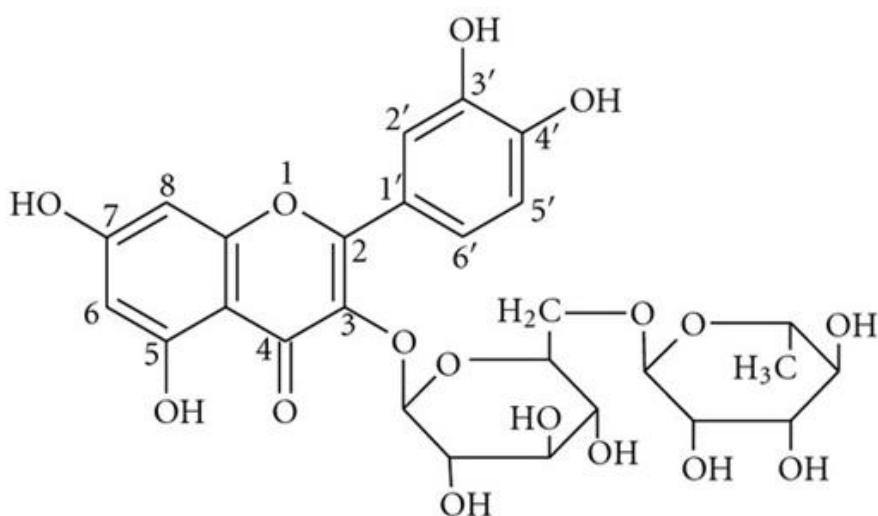
Antokyaniny, které byly extrahovány z třešní, byly označeny za látky, jež mají silnou protizánětlivou a antioxidační aktivitu. Také jsou schopny inhibovat růst buněčných linií karcinomu tlustého střeva (Coccia a kol., 2012). Nejlépe prokázaná bioaktivita souvisí s jejich schopností inhibovat adhezi patogenních bakterií k buňkám močového traktu, čímž se zabrání bakteriální kolonizaci a progresi infekce močových cest. Také jim byla prokázána antibakteriální účinnost proti patogenům zažívacího traktu (Núñez a kol., 2015).

Polyfenoly rostlinného původu jsou tedy zapojeny do mnoha funkčních rolí, které zahrnují odolnost rostliny proti mikrobiálním patogenům a býložravcům, dále například ochranu před slunečním zářením. Rostlinné polyfenoly jsou již dlouho považovány za zdroj bioaktivních přírodních látek s možnými přínosy pro lidské zdraví. Byliny, rostlinné výtažky a koření s vysokým obsahem polyfenolických sloučenin jsou používány v orientální tradiční medicíně po tisíce let (Quideau a kol., 2011).

### 2.1.7 Rutin

Rutin se řadí mezi flavonoidy. Flavonoidy jsou nejrozšířenější polyfenoly obsažené v rostlinách a ovoci. Lze je nalézt v Pohance obecné, aronii, Jeřábu černém, chřestu, kůře citrusů, kiwi aj. Flavonoidy jsou bioaktivní molekuly, které mají v rostlinných buňkách důležité funkce a jsou neodmyslitelnou součástí lidské stravy (Ribeiro a kol., 2015; [www.celostnimediceina.cz](http://www.celostnimediceina.cz)). Jedná se o fenolické sloučeniny, které se skládají ze dvou benzenových jader v kombinaci s heterocyklickým kruhem benzopyranu, jenž obsahuje kyslík (Manner a kol., 2013).

Rutin je běžný dietní flavonoid využívaný tradiční a lidovou medicínou po celém světě. Je široce konzumován v podobě rostlinných nápojů a potravin. Vykazuje významné farmakologické účinky, včetně účinků antioxidačních, protizánětlivých, antidiabetických, neuroprotektivních a hormonálních. Jeho silnou antioxidační aktivitu dokazují různé *in vitro* antioxidační testy. Více než 130 registrovaných terapeutických léčivých přípravků obsahuje právě rutin. Struktura rutinu se skládá z aglykonu kvercetin a disacharidové rutinózy vázané na kvercetin (Chua, 2013). Tuto strukturu můžeme vidět na **obrázku 10**.

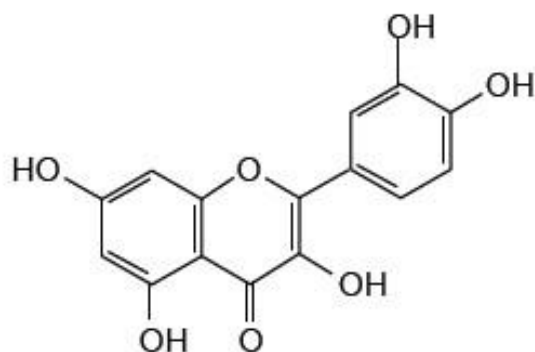


**Obrázek 10** Chemická struktura rutinu (Macikova a kol., 2012)

### 2.1.8 Kvercetin

Kvercetin je vysoce bohatý polyfenolový flavonoid, který se nachází v mnoha tkáních rostlin, včetně kůry dubu. Kvercetin tvoří fenolové sloučeniny, které jsou strukturně odvozeny od matečných látek flavonů. Tato přírodní látka se běžně vyskytuje ve významných potravinových zdrojích, které zahrnují ovoce (například jablka, červené víno a borůvky), zeleninu (například kapusta, cibule či brokolice) a čaje (zelený a černý čaj). Některé studie naznačují, že je kvercetin silný antioxidant a pohlcovač reaktivních forem kyslíku a dusíku. Je schopen vázat a sekvestrovat přechodné kovové ionty. Kvercetin se stal oblíbeným doplňkem stravy dostupným v obchodech se zdravou výživou, a to díky hlášení příznivých účinků této látky proti různým chorobám (Leela a Saraswathy, 2013; Zhang a kol., 2017; www.celostnimedicina.cz).

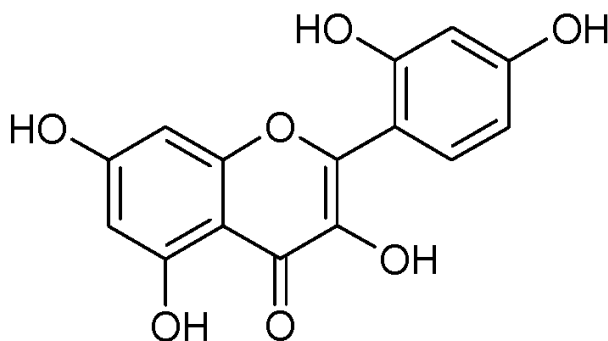
Struktura kvercetinu je znázorněna na **obrázku 11**.



**Obrázek 11** Chemická struktura kvercetinu (Leela a Saraswathy, 2013)

### 2.1.9 Morin

Morin je přirozený bioflavonoid izolovaný z čínských bylin z čeledi Morušovníkovité (*Moraceae*), který vykazuje řadu biologických účinků, včetně antioxidačních, protizánětlivých, antidiabetických a antikarcinogenních účinků (Ke a kol., 2016). Dále je široce rozšířen v zelenině a ovoci. Bylo zjištěno, že má morin vynikající farmakologické účinky, mezi které patří inhibice proliferace nádorů (nádorového bujení), prevence koronárních onemocnění, ochrana lidských erytrocytů a inhibice některých rakovinových nádorů (Sasikumar a kol., 2017). Zjistilo se, že morin inhibuje růst a invazi vysoce metastatických buněk rakoviny prsu (Ke a kol., 2016). Chemická struktura morinu je zobrazena na **obrázku 12**.



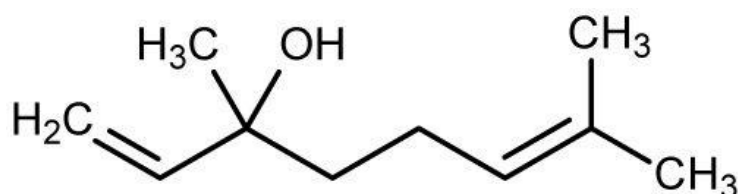
**Obrázek 12** Chemická struktura morinu (www.intechopen.com)

### 2.1.10 Linalol

Linalol patří do rozsáhlé skupiny terpenů a terpenoidů. Terpenoidy jsou nejpočetnější skupinou přírodních látek s rozmanitou strukturou nacházející se v mnoha rostlinách (například Meduňka lékařská, Trnovník akát bílý či Smil písečný), dále také v houbách, plísních a mořských živočiších (Ludwiczuk a kol., 2017; www.celostnimedicina.cz). Bylo identifikováno více než

20 000 terpenoidů a další jsou stále objevovány (Keeling a Bohlmann, 2007). Tyto sloučeniny jsou sekundární metabolity přítomné ve většině organismů, zejména v rostlinách. Bylo zjištěno, že terpenoidy mají široké spektrum účinků, jako je například snížení oxidačního stresu, potlačení zánětu, regulace buněčného cyklu, indukce apoptózy, inhibice proliferace buněk, aj. (Nevzorova a kol., 2017).

Linalol je acyklický alkohol, který patří mezi hlavní květinové vůně v přírodě. Asi 70 % terpenoidů květinových vůní představuje právě linalol. Vyskytuje se v éterických olejích více než 200 druhů rostlin. Zejména mnoho rostlin čeledi Hluchavkovité (*Lamiaceae*), Vávřínovité (*Lauraceae*) a Routovité (*Rutaceae*). Také některé skupiny hub produkují tento monoterpenový alkohol (Aprotosoaiie a kol., 2014). Chemická struktura linalolu je uvedena na **obrázku 13**.



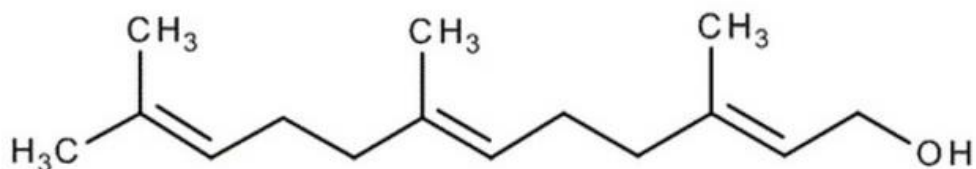
**Obrázek 13** Chemická struktura linalolu (chemistry.about.com)

Vzhledem k chirálním vlastnostem hydroxylovaného třetího uhlíku se v rostlinách vyskytují dva linalové enantiomery, a to coriandrol a licareol. Tyto enantiomery mají různé vonné profily. Coriandrol je vnímán jako sladký, květinový, bylinný a podobný citrusovým a ovocným tónům, zatímco licareol má vůni podobnou levanduli. Díky tomu se používá v parfumerii, přidává se do detergentů pro domácnost, a také se používá jako insekticid pro kontrolu ektoparazitů zvířat. V některých rostlinných produktech (například meruňkách) se linalol nachází jako racemát, ten je také produktem fermentačních procesů, které se vyskytují při výrobě potravin (Aprotosoaiie a kol., 2014).

Terpenoidy jsou zahrnuty ve všech formách interakcí rostlin s jinými organismy, včetně jejich reprodukce, obrany a signalizace. Jsou nejvíce různorodou skupinou chemických látek rostlinného původu a lidmi jsou po staletí používány v tradičních i moderních průmyslových aplikacích (Keeling a Bohlmann, 2007).

### 2.1.11 Farnesol

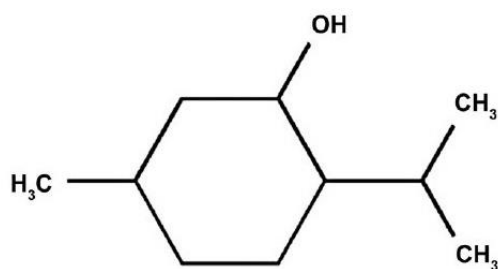
Farnesol je alkohol vyskytující se v kvasinkových buňkách. Jedná se o molekulu potřebnou k průběhu *QS* u kvasinky *Candida albicans*. Farnesol je hojně zastoupen v éterických olejích a má obecně širokou škálu biologických účinků. Může například inhibovat růst mnoha mikroorganismů, potlačit přechod některých dimorfních hub z kvasinek do vláknité formy a zvýšit mikrobiální citlivost na antibiotika. Prokazuje důležitou roli v odolnosti vůči oxidativnímu stresu a má cytotoxický účinek na kvasinku *Candida albicans* a další mikroorganismy, a to vyvoláním apoptózy v určitých koncentracích a za specifických podmínek prostředí (Wang a kol., 2017a). Mimo jiné má farnesol potenciál zmírňovat masivní zánět a poškození plic (Ku a Lin, 2016). Farnesol také funguje jako chemopreventativní a protinádorové činidlo *in vivo* (Joo a Jetten, 2010). Chemická struktura farnesolu je zobrazena na **obrázku 14**.



**Obrázek 14** Chemická struktura farnesolu (upraveno Nickerson a kol., 2006)

### 2.1.12 Mentol

Mentol je alkohol přirozeně se vyskytující v různých mátových olejích. Je hlavní složkou éterických olejů divoké Máty americké (*Mentha canadensis* L.) a Máty peprné (*Mentha piperita*) (Turcheniuk a kol., 2015). Vzhledem k poměrně jedinečné aromatické vůni a chladícím vlastnostem je mentol široce používán v různých spotřebních výrobcích, a to včetně léčiv, kosmetiky a tabáku, cukrovinek, žvýkaček, likérů, zubních past, šampónů a například mýdel (Han a kol., 2016). Pro léčebné účely byl používán již od starověku. Několik studií ukázalo, že vedle vlivu na sensorické parametry má i antibakteriální a antifungicidní účinky (Turcheniuk a kol., 2015). Chemickou strukturu mentolu zobrazuje **obrázek 15**.

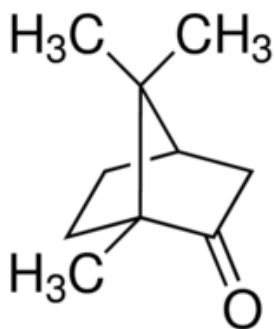


**Obrázek 15** Chemická struktura mentolu (www.jpbsonline.org)

### 2.1.13 Kafr

Kafr je terpenoid získaný z kastrového stromu, který pochází z Číny a je součástí třídy bioaktivních sloučenin syntetizovaných rostlinami (Santos a kol., 2017). Konkrétně kafr pochází z kůry Kafrovníku lékařského (Skořicovník kafrovník; *Cinnamomum camora*) a je hlavním esenciálním olejem v mnoha aromatických rostlinách jako je řecká šalvěj (*Salvia fruticosa*), Šalvěj levandulová (*Salvia levandulifolia*), svatolína (*Santolina insularis*) a Pelyněk roční (*Artemisia annua*) (Sokolova a kol., 2017).

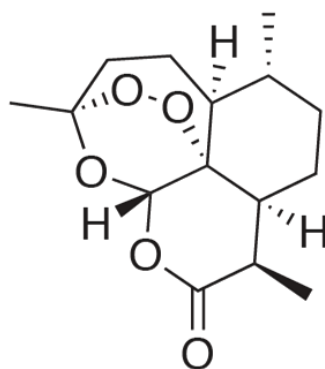
Kafr je medicínsky používán od starověku v Číně a od středověku v Evropě. V současné době se používá především kvůli antimikrobiálním, antivirovým a analgetickým účinkům, stejně tak je využíván jako insekticid. Kafr se také nachází v mnoha kosmetických přípravcích, osvěžovačích vzduchu a potravinářských výrobcích. Také deriváty kafru vykazují různé biologické účinky, například 1,3-thiazoly na bázi kafru mají významné antibakteriální a fungicidní účinky (Sokolova a kol., 2017). Dnes se kafr používá jako aktivní složka mnoha mastí a inhalantů, které se používají zejména k léčbě chladové bolesti a muskuloskeletální bolesti (Vatanparast a Andalib-Lari, 2017). Chemická struktura kafru je uvedena na **obrázku 16**.



**Obrázek 16** Chemická struktura kafru (www.tnjchem.com)

### 2.1.14 Artemisinin

Artemisinin je izolován z Pelyňku ročního (*Artemisia annua*) (Zhao a kol., 2017). Biologická aktivita artemisininů je silně spojována s přítomností endoperoxidového můstku, který se podílí na tvorbě reaktivních forem kyslíku a volných radikálů peroxidu indukujících oxidační stres, poškození DNA, alkylaci cílových proteinů a apoptózu (Letis a kol., 2017). Artemisinin a jeho analogy byly používány k léčbě malárie. Také bylo zjištěno, že artemisinin má silné protinádorové (*in vitro* a *in vivo*) a protizánětlivé účinky, zmírňuje chronické poškození jater vyvolané konzumací alkoholu, a také vykazuje ochranný účinek proti chronické otravě alkoholem (Zhao a kol., 2017). Artemisinové sloučeniny také prokázaly cytotoxické účinky vůči buněčným liniím leukemie, tlustého střeva, melanomu prsu, vaječníku, prostaty, centrálního nervového systému a rakoviny ledvin (Letis a kol., 2017). Chemická struktura je znázorněna na **obrázku 17**.



**Obrázek 17** Chemická struktura artemisininu (en.pharmacodia.com)

### 2.1.15 Esenciální oleje

Esenciální oleje jsou těkavé kapaliny, které se získávají z různých aromatických rostlinných materiálů, jako jsou květy, semena, listy, pupeny, větvičky, kůra, kořeny, byliny, dřevo či ovoce (Guerra-Rosas a kol., 2017). Již mnoho let je známo, že vykazují antimikrobiální a fungicidní účinky a jsou používány proti široké škále bakterií a hub (Filoche a kol., 2005; Sharma a kol., 2017).

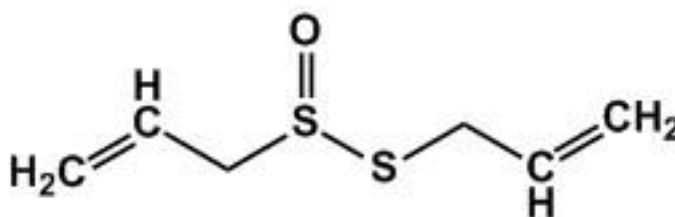
Aktivita esenciálních olejů je spojena s příslušným složením, konstrukčním uspořádáním prvků těkavých olejů a jejich funkčních skupin a možnými synergickými interakcemi mezi složkami. Některé studie uvádí, že komponenty s fenolickou strukturou jako je thymol a eugenol, což jsou hlavní účinné složky éterických olejů, mají některé antimikrobiální účinky



(baktericidní a bakteriostatické účinky) vůči grampozitivním a gramnegativním bakteriím, ale i vůči kvasinkám (Marqués-Calvo a kol., 2017).

### 2.1.16 Allicin

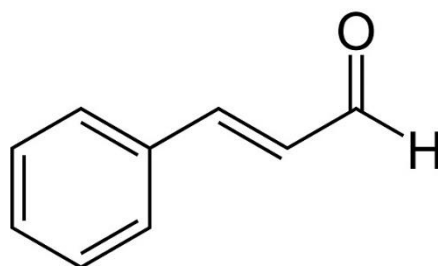
Allicin je přírodní látka obsahující síru, která je obsažena v zelenině z čeledi Česnekovité (česnek a cibule). Má široké spektrum antimikrobiálních účinků proti prokaryotickým a eukaryotickým buňkám. Je to molekula, která dává česneku charakteristický zápach. Jediný česnek může produkovat až 5 mg allicinu. Allicin má ochrannou funkci vůči bakteriím, houbám a hmyzu. Dále také vykazuje širokou škálu fyziologických účinků s dopadem na člověka. Patří sem zejména účinky na metabolismus lipidů a krevní tlak. Dále se ukázalo, že je allicin silným induktorem apoptózy v různých rakovinných buněčných liniích (Gruhlke a kol., 2017). Chemická struktura allicinu je uvedena na **obrázku 18**.



**Obrázek 18** Chemická struktura allicinu (pharmaxchange.info)

### 2.1.17 Cinnamaldehyd

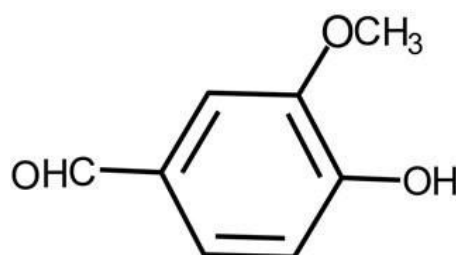
Cinnamaldehyd (skořicový aldehyd) je hlavní složka skořicového oleje, která působí jako velmi účinné antimikrobiální činidlo proti mnoha potravinovým bakteriím, včetně *Escherichia coli*. Je to tedy přírodní antimikrobiální sloučenina, která poškozuje cytoplazmatickou membránu, inhibuje vývoj přepážky a způsobuje prodloužení buněk. Stejně tak vyvolává oxidační stres v *Escherichia coli* (Visvalingam a kol., 2017). Cinnamaldehyd má široký rozsah protizánětlivých účinků, což může být výhodné při léčbě cerebrální ischemie (Zhao a kol., 2015). Chemická struktura je znázorněna na **obrázku 19**.



**Obrázek 19** Chemická struktura cinnamaldehydu (thescienceofacne.com)

### 2.1.18 Vanilin

Vanilin se hromadí v luscích Vanilovníku plocholistého (*Vanilla planifolia*), kde je ukládán ve formě glukovanilinu. Vanilin je pravděpodobně nejoblíbenější chuťová látka na světě a slabé antimikrobiální činidlo (Yang a kol., 2017). Je to klíčová přísada do potravinářských výrobků, parfumerie, dále se používá jako meziprodukt ve farmaceutickém průmyslu. Lusky vanilky stále zůstávají jediným zdrojem přirozeného vanilinu, který přispívá pouze 1 % světové produkce. Proces extrakce vanilinu je nákladný a poptávka po této univerzálně oblíbené aromatické směsi nemůže být uspokojena samotnými vanilkovými boby. Syntetický vanilin je podobný tomu, který je obsažen ve vanilových luscích, ale jeho vůně a chuť se od přírodního liší. Důvodem je to, že různé sloučeniny, které dávají asociativní účinek v přírodním extraktu nejsou přítomné v tom syntetizovaném (Harshvardhan a kol., 2017). Chemická struktura vanilinu je zobrazena na **obrázku 20**.



**Obrázek 20** Chemická struktura vanilinu (Hamd a kol., 2013)

## **3 TESTOVÁNÍ VLIVU PŘÍRODNÍCH LÁTK NA TVORBU BIOFILMU**

### **3.1 Metodiky pro sledování tvorby biofilmu v přítomnosti antimikrobiálních látek**

Mikroorganismy rostoucí v podobě biofilmu jsou spojovány s chronickými a rekurentními lidskými infekcemi a jsou vysoce odolné proti antimikrobiálním látkám. K dispozici jsou různé metody pro zjišťování produkce biofilmu, a to metoda v mikrotitračních destičkách či ve zkumavkách, známé jako Christensenovy metody, dále kultivace na agaru s kongo-červení, bioluminescenční test a fluorescenční mikroskopické vyšetření. Byla uskutečněna studie, která porovnávala účinnost tří metod, metodu v mikrotitračních destičkách, ve zkumavkách a kultivaci na agaru s kongočervení. Zjistilo se, že metoda v mikrotitračních destičkách je metoda vhodná ke kvantitativnímu hodnocení, je spolehlivější a reprodukovatelnější než ostatní zmiňované metody. Pro detekci mikroorganismů tvořících biofilm je tedy vhodnější (Hassan a kol., 2011).

#### **3.1.1 Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách**

Tento kvantitativní test popsáný Christensenem a kol. (1995) je považován za standardní metodu pro detekci biofilmu (Hassan a kol., 2011). Principem této metody je zaočkování mikroorganismů do jamek s kultivačním médiem. Destička se nechá inkubovat při vhodné teplotě. Po kultivaci jsou jamky destičky promyty pufrem, aby došlo k odstranění planktonních buněk. Adherované buňky se zafixují a vzniklý biofilm se následně obarví například pomocí krystalové či genciánové violeti, aj. Na závěr se měří absorbance nárůstu biofilmu, který vznikl na stěnách jamek, při odpovídající vlnové délce. Na základě získaných hodnot absorbancí lze mikroorganismy rozdělit do skupin na silně biofilmopozitivní, slabě biofilmopozitivní a biofilmnegativní (Christensen a kol., 1985).

Kim a Park (2013) využili tuto metodu ke sledování tvorby biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* v přítomnosti 6-gingerolu. Kultura *Pseudomonas aeruginosa* v AB médiu (minimální růstové médium používané pro bakteriální kultury) byla zředěna čerstvým AB médiem (1 : 20) obsahujícím příslušnou koncentraci zázvoru (1 - 10 %). Vzniklá suspenze byla rozpipetována do 96-jamkové polystyrenové mikrotitrační destičky a inkubována při 37 °C po dobu 24 hodin bez míchání. Po kultivaci byla změřena optická denzita při 595 nm. Suspenze byla následně

z destičky vyklepnuta a destička byla promyta fosfátovým pufrům. Biofilm byl obarven 1% krystalovou violetí po dobu 30 minut. Poté bylo barvivo vyklepnuto. Krystalová violet' navázaná na biofilm byla eluována za použití 100% ethanolu a kvantifikována měřením optické denzity při 545 nm. Výsledky metody v mikrotitračních destičkách ukázaly účinnost zázvorového extraktu na tvorbu biofilmu. Tvorba biofilmu za přítomnosti extraktu byla o 39 - 56 % nižší než u kontrolního vzorku bez extraktu.

Kim a Park (2013) dále využili stejnou metodu, jako v případě *Pseudomonas aeruginosa*, ke sledování tvorby biofilmu kmenů *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus megaterium*. V tomto případě použili lyzogenní bujón (LB) jako růstové médium. Výtažek zázvoru opět inhiboval růst těchto bakterií.

Quave a kol. (2012) využili metodu v mikrotitračních destičkách, jejichž jamky byly pokryty lidskými plazmatickými proteiny, ke sledování tvorby biofilmu *Staphylococcus aureus* v přítomnosti kyseliny elagové. Jamky byly potahovány po dobu 24 hodin při 4 °C 20% lidskou plazmou zředěnou v karbonátovém pufru (pH = 9,6). Po naočkování a přidání vhodného média byly destičky inkubovány bez třepání při 37 °C po dobu 24 hodin. Následně byl použit fosfátový pufr, ethanol pro fixaci přilnavých buněk a 0,41% krystalová violet' ve 12% ethanolu. Kvantitativní posouzení tvorby biofilmu bylo dosaženo přidáním 100 ml ethanolu a inkubací při pokojové teplotě po dobu 10 minut. 50 ml eluátu bylo poté převedeno na sterilní mikrotitrační polystyrenovou destičku a byla změřena absorbance. Výsledky ukázaly, že přírodní produkty bohaté na kyselinu elagovou inhibují tvorbu biofilmu *Staphylococcus aureus*.

Dos Santos Rodrigues a kol. (2017) využili tuto metodu ke sledování tvorby biofilmu *Staphylococcus aureus*, v přítomnosti oregánového esenciálního oleje a karvakrolu. Do každé z šesti jamek mikrotitrační polystyrenové destičky obsahující 180  $\mu$ l TSB (tryptonsojový bujón) doplněného glukózou, bylo napipetováno 20  $\mu$ l alikvótní části bakteriální suspenze. Destička byla inkubována aerobně za statických podmínek po dobu 18 hodin při teplotě 35 °C. Na promytí jamek byl použit sterilní roztok NaCl, na fixaci methanol a na obarvení krystalová violet'. Za použití mikrodestičkového spektrofotometru byla změřena absorpce při 492 nm. Pro kvantifikaci intenzity tvorby biofilmu byla průměrná optická denzita každého izolátu porovnána s optickou denzitou negativního kontrolního kmene. V této studii bylo 97,2 % izolátů považováno za producenty biofilmů.

### 3.1.2 Christensenova metoda ve zkumavkách

Metoda je podobná jako Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách. Kultivace však probíhá ve zkumavkách. Principem této metody je tedy kultivace testovaného mikroorganismu ve zkumavce a následné obarvení (například trypanovou modří nebo safraninem) vzniklého biofilmu. Pro kultivaci se nejčastěji používá TSB nebo mozkosrdcová infúze (BHI) (Nyenje a kol., 2013). Pozitivním výsledkem této metody je přítomnost obarvené vrstvy na vnitřní straně zkumavky (vzniklý biofilm) (Oliveira a Cunha, 2010). Jedna ze studií potvrzuje vhodnost BHI a TSB média pro kultivaci biofilmů bakterie *Enterobacter cloacae*. Zásadní vliv však na tvorbu biofilmu má zvolená kultivační teplota a čas, které významně ovlivňují tvorbu biofilmu této bakterie (Nyenje a kol., 2013).

Mohsenipour a Hassanshahian (2015) sledovali účinky výtažků Česneku kuchyňského (*Allium sativum*) na tvorbu biofilmu u šesti patogenních bakterií. Výsledky této studie poukazují na to, že by česnekové extrakty mohly snížit tvorbu biofilmu u bakterií až o 62,72 %. Mathur a kol. (2013) zjistili, že esenciální oleje z *Allium sativum* mohou snížit tvorbu bakterie *Klebsiella pneumoniae*, a to až o 47,5 %.

Sadekuzzaman a kol. (2017) použili Christensenovu zkumavkovou metodu ke sledování účinnosti fágové směsi jako biokontrolního činidla proti biofilmům *Listeria monocytogenes* tvořených na kuponech z pryže a nerezové oceli. Biofilmy byly kultivovány při 30 °C (10 °C) po dobu 72 h (144 h) v TSB. Výsledky této studie ukázaly, že směs fágů, která byla použita pro *Listeria monocytogenes*, by mohla účinně snížit počet buněk tvořících biofilm v potravinářství nebo na površích, které přichází do kontaktu s potravinami.

### 3.1.3 Kultivace na agaru s kongo-červení

Tato metoda je založena na kultivaci sledovaného mikroorganismu na BHI agaru obsahujícím sacharózu a barvivo kongo-červení. Studie prokázaly, že tato metoda není moc přesná, ale je snadno proveditelná. Není však tak finančně náročná. Hodnocení je založeno na vizuální analýze barvy kolonií, které na agaru narostou (Kaiser a kol., 2013).

Podle autorů Freeman a kol. (1989) tvoří producenti biofilmů na agaru s kongo-červení černé kolonie a neproducenti červené. Byla použita pětibarevná referenční stupnice pro přesné určení všech barevných variací, které kolonie vykazovaly. Izoláty představující dva odstíny černé, jasně černé a suché neprůsvitné černé, byly klasifikovány jako producenti biofilmu, zatímco

červené, růžové a bordó kolonie byly klasifikovány jako biofilm negativní. V některých případech se uprostřed černé kolonie po 48 hodinách kultivace objevily červené a bordó subkolony. Tyto kolonie byly odstraněny a subkultivovány 24 hodin na agaru s kongo-červení, aby byly získány čisté izoláty produkujících a neprodukujících variant (Oliveira a Cunha, 2010).

Přidáním nebo substitucí některých látek nebo změnou některých parametrů se může zvýšit přesnost této metody. Cílem jedné studie bylo změnit složení média agaru s kongo-červení a inkubační parametry, kvůli zlepšení přesnosti detekce biofilmu produkovaného různými kmeny *Staphylococcus epidermidis*. Kmeny *Staphylococcus epidermidis* byly kultivovány na BHI s 0,08 % kongo-červeně doplněné 5 % sacharózy. Kmeny byly inokulovány metodou čárkování a inkubovány při teplotě 35 °C za aerobních podmínek po dobu 24 a 48 hodin. Kmeny stafylokoků produkující biofilm tvořily černé kolonie, zatímco kmeny neprodukující biofilm tvořily červené kolonie. Kmeny byly také inkubovány při 35 °C za mikroaerofilních podmínek a byly hodnoceny po 24 a 48 hodinách. Při aerobní inkubaci při teplotě 35 °C po dobu 24 hodin 39 kmenů produkovalo biofilm a vykazovalo kolonie s barvami od hnědé po černou. Po 48 hodinách inkubace počet izolátů, které produkovaly biofilm za 24 hodin, klesl na 20. Za mikroaerofilních podmínek produkovalo 11 kmenů biofilm po 24 hodinách kultivace a 4 kmeny po 48 hodinách (Kaiser a kol., 2013). Rachid a kol. (2000) testovali vliv různé koncentrace NaCl a glukózy v růstovém médiu na kmeny *Staphylococcus epidermidis*. Jejich výsledky ukázaly, že vyšší koncentrace NaCl (4 % a 5 %) a 1,5 % a 2 % glukózy byly nejlepšími induktory pro tvorbu biofilmu (Kaiser a kol., 2013).

Lee a kol. (2016) použili tuto metodu ke sledování tvorby biofilmu u 47 kmenů *Staphylococcus* sp., a to včetně 36 kmenů *Staphylococcus aureus*. Kultivace probíhala na agaru s kongo-červení, kterým byl tryptonsojový agar nebo BHI agar s 3,6 % sacharózy a 0,08 % kongo-červeně.

Dos Santos Rodrigues a kol. (2017) využili tuto metodu kultivace ke sledování tvorby biofilmu *Staphylococcus aureus* v přítomnosti oregánového esenciálního oleje a karvakrolu. Izoláty byly čárkovány na povrch agaru s kongo-červení, inkubovány při teplotě 35 °C po dobu 24 hodin a dále ponechány při pokojové teplotě dalších 48 hodin. Barva kolonie byla určena podle čtyřbarevné stupnice od červené po černou. 88,9 % izolátů vykazovalo schopnost tvorby biofilmu.

### 3.1.4 Mikroskopické metody

V současné době se používají různé metody pro detekci tvorby biofilmu, včetně vizuálního posouzení pomocí elektronové mikroskopie s použitím různých typů mikroskopů. Nejuniverzálnějším a nejúčinnějším nedestruktivním přístupem pro studium biofilmů je konfokální laserová skenovací mikroskopie (CLSM). Bridier a kol. (2010) navrhli CLSM v kombinaci s použitím 96-jamkových mikrotitračních destiček pro studium tvorby struktury biofilmu. Autoři uvedli, že kombinace použití mikrotitračních destiček a konfokálního zobrazení se ukázalo být jako dobrá alternativa k jiným vysoce výkonným a běžně používaným metodám, jelikož umožňuje *in situ* kvalitativní a kvantitativní hodnocení biofilmové struktury (Oliveira a Cunha, 2010).

Yang a kol. (2016) sledovali efekt „LongZhang gargle“ z čínských bylin na tvorbu biofilmu *Streptococcus mutans in vitro*. Morfologickou změnu *Streptococcus mutans* pozorovali pomocí elektronové mikroskopie. Sledovali tlustý a relativně silný biofilm v kontrolní zóně. Integrita biofilmu byla narušena při použití různých koncentrací „LongZhang gargle“. Při koncentraci 8 % byly pozorovány pouze rozptýlené bakterie. Výsledky CLSM naznačují, že syntéza extracelulárních polysacharidů by mohla být inhibována „LongZhang gargle“ již při poměrně nízké koncentraci. Tato zjištění svědčí o tom, že „LongZhang gargle“ může být slibným přírodním antikariogenním činidlem, jelikož potlačuje planktonní růst, produkci kyselin a tvorbu biofilmů *Streptococcus mutans*.

Quave a kol. (2012) použili tyto techniky pro sledování inhibice tvorby biofilmu *Staphylococcus aureus* vlivem derivátů kyseliny elagové z Ostružiníku jilmolistého (*Rubus ulmifolius*). Dva kmeny *Staphylococcus aureus* a jejich izogenní mutanti byly kultivovány v mikrotitračních destičkách s 96 jamkami. Po 20 hodinách byl obsah jamek odsán a jamky byly promyty 0,85% roztokem NaCl. Vytvořený biofilm byl poté barven LIVE/DEAD barvením ve tmě při pokojové teplotě po dobu 18 minut. Jamky byly následně jemně promyty 0,85% roztokem NaCl před pozorováním CLSM. Fluorescence byla sledována při 488 nm. Výsledky ukázaly, že extrakt z kořene *Rubus ulmifolius* inhibuje tvorbu biofilmu *Staphylococcus aureus*.

Namasivayam a Roy (2013) využili elektronové mikroskopie při sledování antibiofilmových účinků léčivých rostlinných extraktů proti biofilmu klinického izolátu *Escherichia coli*. Biofilmy byly vyšetřovány po zpracování vzorků metodou sušení mrazem. Biofilmy byly fixovány glutaraldehydem, jemně promyty v destilované vodě a poté ponořeny do kapalné

směsi propan/isopentan při 2196 °C před lyofilizací ve vakuu. Vzorky byly nakonec potaženy zlatem a paladiem a pozorovány pod skenovacím elektronovým mikroskopem. Výsledky této studie ukázaly úspěšný inhibiční vliv na tvorbu biofilmu *Escherichia coli*.

### **3.2 Vliv přírodních látek na tvorbu biofilmu**

V posledních třech desetiletích bylo po celém světě provedeno několik studií, zejména v Latinské Americe. V těchto studiích byly u celé řady fytochemických látek zjištěny antimikrobiální účinky. Kvůli jejich vyšší minimální inhibiční koncentraci (MIC), která představuje 100 - 5000 g/ml, je ve srovnání s antibiotiky nelze využít v monoterapii, protože antibiotka mají hodnotu MIC 0,031 - 512 g/ml. Další studie se zaměřily na účinky kombinace antibiotik a fytochemických látek. Výsledky ukázaly, že fytochemické látky modulují nebo upravují mechanismy rezistence u bakterií, což naznačuje, že mohou být používány v kombinaci s antibiotiky ke zvýšení účinnosti, a tedy ke snížení dávky antibiotik (Touani a kol., 2014; Santiago a kol., 2015).

#### **3.2.1 Berberin**

Wang a kol. (2017c) provedli studii, ve které byl zkoumán účinek berberinu vůči adhezi a tvorbě biofilmu *Staphylococcus epidermidis* na discích z titanové slitiny. Výsledky tohoto výzkumu ukázaly schopnost berberinu inhibovat adhezi *Staphylococcus epidermidis* na titanových površích, z čehož plyne i jeho schopnost inhibice celé tvorby biofilmu.

#### **3.2.2 Sanguinarin**

Pokud jde o antibakteriální účinky alkaloidů, řada studií prokázala, že mnoho z těchto sloučenin by mohlo hrát roli v léčbě několika infekčních onemocnění. Jedním z těchto alkaloidů s antibakteriálními účinky je sanguinarin. Dle dřívějších studií je prokázáno, že je sanguinarin schopen inhibovat bakteriální přilnavost k povrchu zubů. Některé alkaloidy také inhibují formování bakteriálního biofilmu. Štiplavý olej čerstvého zázvoru (6-gingerol) snižuje tvorbu biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* a potlačuje produkci faktorů virulence (Barbieri a kol., 2016).



Cílem studie Zhong a kol. (2017) bylo vyhodnotit aktivitu sanguinarinu vůči biofilmům kvasinky *Candida albicans*. Výsledky této studie ukazují, že sanguinarin vykazuje silné inhibiční účinky vůči testovaným kvasinkovým biofilmům.

### 3.2.3 Karvakrol, thymol a eugenol

Látky karvakrol, thymol a eugenol, souhrně fenoly a fenolické étery, jsou hlavní složky oregánového extraktu a mají silnou antimikrobiální aktivitu vůči širokému spektru patogenů, včetně *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. U těchto látek bylo zjištěno, že jsou účinné nejen na planktonní buňky, ale také na biofilmy tvořené *Candida albicans*, které jsou rezistentní vůči mnoha antifungálním látkám. Karvakrol prokázal nejsilnější antifungální účinky vůči biofilmu *Candida albicans* s minimální inhibiční koncentrací nižší než 0,03 %. Dále bylo prokázáno, že je účinný bez ohledu na zralost biofilmu (Rao a kol., 2010).

Konkrétně thymol výrazně snižuje tvorbu biofilmu bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *In vitro* reguluje expresi virulence (Wang a kol., 2017b). V jedné ze studií zaměřených na sledování vlivu karvakrolu se zjistilo, že dokázal inhibovat tvorbu bakteriálního biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*. Antibiofilmový potenciál karvakrolu může souviset s přerušením *QS*. Karvakrol by mohl být používán v potravinářství jako látka účinná vůči tvorbě biofilmu. Závěr této studie tedy naznačuje, že by mohl být využíván k vývoji nových a bezpečných širokospektrálních antibiofilmových a anti-*QS* sloučenin (Tapia-Rodriguez a kol., 2017).

### 3.2.4 Rutin, kvercetin a morin

Skupina přírodních látek, které spadají do skupiny flavonoidů, jako jsou již dříve zmíněné látky rutin, kvercetin či morin, je široce studována. Mnoho studií se zaměřuje na antibakteriální účinky vůči adherovaným buňkám. Vědci se také zabývají sledováním vlivu těchto látek, kdy sledují vliv na mikrobiální společenstva, tedy biofilmy. Prokázalo se, že flavonoidy mají antibiofilmovou aktivitu (Manner a kol., 2013).

Rutin byl zkoumán pro inhibiční účinky vůči biofilmu při minimálních inhibičních koncentracích, a to vůči potravinovým patogenům *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Byla to první studie, která popsala účinek rutinu na smíšené biofilmy *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Závěry této studie ukázaly potenciální aplikaci rutinu při prevenci vůči tvorbě biofilmu na průmyslových zařízeních a na povrchích, které jsou v kontaktu

s potravinami, tedy schopnost rutinu předcházet kontaminaci potravin a jejich znehodnocení (Al-Shabib a kol., 2017).

### **3.2.5 Farnesol**

Několik studií potvrdilo inhibiční účinek farnesolu na růst některých bakterií. Také se zjistilo, že farnesol je schopný blokovat růst biofilmu (Wang a kol., 2017a). Cílem jedné ze studií byla analýza *in vitro* aktivity samotného farnesolu a kombinace s antibakteriálními léčivými látkami jako jsou amoxicilin, doxycyklin, ceftazidim a sulfamethoxazol-trimetoprim, a to vůči biofilmům vytvořených bakterií *Burkholderia pseudomallei*. Výsledek této studie prokázal účinnost farnesolu proti biofilmům *Burkholderia pseudomallei* a jeho potencující účinek na aktivitu antibakteriálních léčiv (Castelo-Branco a kol., 2016).

### **3.2.6 Mentol**

Další studie se zabývala *in vitro* aktivitou terpenů (včetně mentolu) vůči biofilmům vytvořených kvasinkami rodu *Candida*. Ukázalo se, že nanodiamantové částice modifikované mentolem mírně ovlivňovaly růst *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Dále se zjistilo, že tyto částice inhibovaly růst biofilmu *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* (Turcheniuk a kol., 2015).

### **3.2.7 Esenciální oleje**

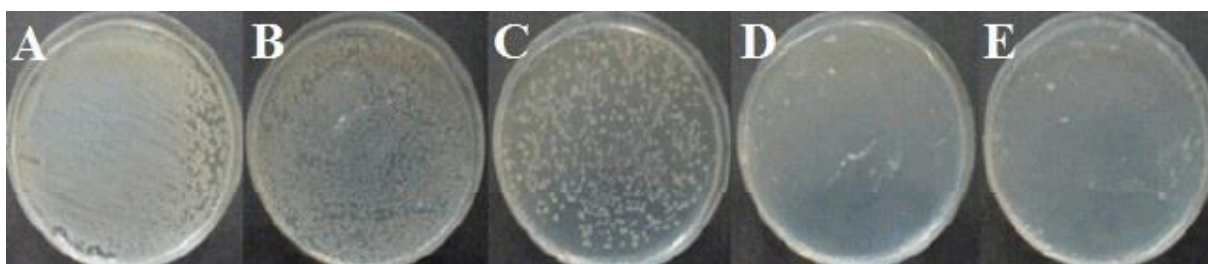
Antimikrobiální aktivitu esenciálních olejů nelze vysvětlit pouze jediným specifickým mechanismem, ale spíše kombinovaným účinkem různých látek. Bylo provedeno mnoho studií za použití bakterií, virů a hub. Tyto látky jsou obecně účinnější proti gram pozitivním bakteriím oproti bakteriím gram negativním. Antibakteriální účinek spočívá v hydrofobním charakteru olejů, které mohou oddělovat lipidy bakteriálních buněčných membrán. Esenciální oleje mohou také inhibovat produkci bakteriálních esenciálních enzymů nebo ovlivnit bakteriální genetický materiál (Han, 2014).

Esenciální oleje bohaté na monoterpenoidy a aromatické deriváty jsou široce používány jako antimikrobiální inhibitory růstu biofilmu, antioxidanty a podporující činidla pro potravinové technologie. Získávají se několika extrakčními metodami, jako je například extrakce

organickým rozpouštědlem, hydro-destilace, mikrovlnná hydro-difuze nebo také gravitace (Grumezescu a kol., 2017).

Esenciální oleje jsou také účinnými antibakteriálními látkami vůči širokému spektru bakterií, a to včetně *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* a *Salmonella typhimurium* (Guerra-Rosas a kol., 2017).

Byla provedena studie, která se zabývala zkoumáním účinku mátového esenciálního oleje. Tento olej vykazoval *in vitro* antimikrobiální účinnost, neboť snižoval nebo inhiboval růst *Escherichia coli* a *Salmonella enteritidis*. Inhibiční účinek se se zvyšující se koncentrací mátového esenciálního oleje zlepšoval (Bitencourt a kol., 2014). Na **obrázku 21** je zobrazen antimikrobiální vliv mátového esenciálního oleje vůči *Escherichia coli*.



**Obrázek 21** Antimikrobiální efekt mátového esenciálního oleje vůči bakterii *Escherichia coli* (Bitencourt a kol., 2014)

A - žádný nárůst; B - nárůst bez přítomnosti esenciálního oleje; C - nárůst s 0,5 % esenciálního oleje; D - nárůst s 1,0 % esenciálního oleje; E - nárůst s 1,5 % esenciálního oleje

Dále byly také testovány antimikrobiální účinky nanoemulzí, které obsahovaly různé esenciální oleje vůči *Escherichia coli* a *Listeria innocua*. Vyšší antimikrobiální účinky, bez ohledu na typ esenciálního oleje, byl zaznamenán vůči *Escherichia coli* v porovnání s *Listeria innocua*. Snímky transmisní elektronové mikroskopie zobrazovaly značně poškozené buňky *Escherichia coli*, a to jak v cytoplazmě, tak i v cytoplazmatické membráně, což následně vedlo k buněčné smrti (Guerra-Rosas a kol., 2017).

### 3.2.8 Ostatní přírodní látky

Infekce související s biofilmem kvasinky *Candida albicans* a dalšími rezistentními mikroorganismy, jsou vážným problémem pro osoby s oslabenou imunitou. Jsou tedy zapotřebí látky, které mohou biofilmům zabránit v růstu nebo je celé odstranit. Ve studii, která se zabývala antimikrobiálními účinky terpenoidů, bylo analyzováno 28 terpenoidů rostlinného

původu. Tyto látky byly testovány pro svou účinnost vůči růstu, virulencím atributům a biofilmům kvasinky *Candida albicans*. Osmnáct látek vykazovalo minimální inhibiční koncentraci pod 2 mg/ml pro buňky v planktonní formě. Léčba dalšími čtrnácti terpenoidy měla za následek významnou inhibici tvorby biofilmu, přičemž několik z nich bylo označeno za inhibitory zralých biofilmů (Raut a kol., 2013).

Celkově byla provedena celá řada studií zaměřených na sledování účinků polyfenolů na bakterie a biofilmy. Byl prokázán antifungální účinek proti adhezi a růstu biofilmu *Candida albicans* (Shahzad a kol., 2014). Japonští vědci například potvrdili účinky čajových polyfenolů proti zubnímu kazu (Xie a kol., 2008). Dále například listí a olej z oliv jako zdroj polyfenolů si vysloužili pozornost díky své široké škále biologických účinků, včetně schopnosti inhibovat nebo zpomalit růst řady bakterií a plísni (Carraro a kol., 2014).

Dále byla provedena studie, která také přinesla příznivé výsledky při sledování antibiofilmových účinků vůči bakteriálním biofilmům. Baicalein, významný zástupce flavonoidů získávaný z kořenů rostliny *Scutellaria baicalensis* (Šišák bajkalský), inhiboval tvorbu bakteriálního biofilmu *Staphylococcus aureus*. Dále redukoval produkci stafylokokového enterotoxinu A a  $\alpha$ -hemolyzinu a inhiboval *QS* systém. Díky těmto výsledkům by mohl baicalein přinést novou strategii účinné léčby při infekcích spojených s biofilmy tvořenými *Staphylococcus aureus* (Helmerick a kol., 2014; Chen a kol., 2016).

## 4 ZÁVĚR

Tato práce shrnuje poznatky a informace o mikrobiálních biofilmech. Dále jsou zmíněny konkrétní přírodní látky s antimikrobiálními účinky, které mají vliv na tvorbu biofilmu. Život v biofilmu je pro mikroorganismy z mnoha důvodů výhodnější a ve většině případů také základním způsobem jejich přirozené existence. Jelikož, jak z textu bakalářské práce vyplývá, má biofilm především negativní účinky na lidské zdraví, je třeba mu věnovat značnou pozornost a stále pátrat po dalších možnostech, které by přinesly pozitivní výsledky ohledně inhibice tvorby biofilmu.

Informace uvedené v předložené práci také poukazují na to, že ne vždy je nutné použití „chemie“. Stačí se jen porozhlédnout kolem sebe. Vždyť ani původní obyvatelé neměli žádné jiné možnosti než si poradit pouze s živou přírodou, která je obklopovala. Vzhledem k tomu, že nebyli obklopeni žádnou civilizací ani pokrokem vědy, příroda je naučila, jak si jí vážit a jak z ní vytěžit to potřebné, pro kvalitnější a delší život. Doba, ve které žili, byla plná odhodlání pro jejich vlastní kreativitu, kdy dokázali vytvářet z nemožného možné. Rostliny a živočichové byli pro ně v podstatě jediným zdrojem potravy, šatů, zbraní, ale i způsobem, jak si pomoci při zraněních nebo nemocech.

Vypracováním této práce jsem se dozvěděla mnoho nových a zajímavých informací ať už o biofilmu jako takovém, nebo o jednotlivých antimikrobiálních látkách, které jsou mezi lidmi mnohdy známé pouze svým názvem.

## 5 LITERÁRNÍ ZDROJE

**Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P. and Chihib, N. E.** Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of Microbiology*, 2014, 196 (7), 453-472.

**Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B.C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B. and Aruoma, O. I.** Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 1994, 32 (1), 31-36.

**Ahimou, F., Semmens, M. J., Haugstad, G. and Novak, P. J.** Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73, 2905-2910.

**Al-Shabib, N. A., Husain, F. M., Ahmad, I., Khan, M. S., Khan, R. A. and Khan, J. M.** Rutin inhibits mono and multi-species biofilm formation by foodborne drug resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 2017, 79, 325-332.

**Aparna, M., Sharma, Pt. B. D. and Yadav, S.** Biofilms: Microbes and disease. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2009, 12, 526-530.

**Appendino, G., Fontana, G. and Pollastro, F.** Natural products drug discovery. *Comprehensive Natural Products II*. Elsevier, 2010, 205.

**Aprotosoai A. C., Hăncianu, M., Costache, I.-I. and Miron, A.** Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour and Fragrance Journal*, 2014, 29, 193-219.

**Barbieri, R., Marchese, A., Coppo, E., Dagliac, M., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi, S. F. and Nabavi, S. M.** Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological Research*, 2016, 44-68.

**Bitencourt, R. G., Possas, A. M. M., Camilloto, G. P., Cruz, R. S., Otoni, C. G. and Soares, N. F. F.** Antimicrobial and aromatic edible coating on fresh-cut pineapple preservation. *Ciência Rural*, 2014, 44 (6), 1119-1125.

**Borkovich, K. A. and Ebole, D. J.** Cellular and molecular biology of filamentous fungi - *Aspergillus fumigatus*. American Society for Microbiology (ASM), 2010.

- Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L. and Kolter, R.** Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 2005, 13 (1), 20-26.
- Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V. and Briandet, R.** The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 82, 64-70.
- Carraro, L., Fasolato, L., Montemurro, F., Martino, M. E., Balzan, S., Servili, M., Novelli, E. and Cardazzo, B.** Polyphenols from olive mill waste affect biofilm formation and motility in *Escherichia coli* K-12. *Microbial Biotechnology*, 2014, 7 (3), 265-275.
- Castelo-Branco, D. S. C. M., Riello, G. B., Vasconcelos, D. C., Guedes, G. M. M., Serpa, R., Bandeira, T. J. P. G., Monteiro, A. J., Cordeiro, R. A., Rocha, M. F. G., Sidrim, J. J. C. and Brilhante, R. S. N.** Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 120 (3), 600-606.
- Coccia, A., Carraturo, A., Mosca, L., Masci, A., Bellini, A., Campagnaro, M. and Lendaro, E.** Effects of methanolic extract of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) on microbial growth. *International Journal of Food Science & Technology*, 2012, 47 (8), 1620-1629.
- Conway, P. and Cohen, T.** Metabolism and bacterial pathogenesis - *Quorum sensing*. American Society for Microbiology (ASM), 2015.
- Davey, M. E. and O'Toole, G. A.** Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64 (4), 847-867.
- Dautle, M. P., Wilkinson, T. R. and Gauderer, M. W.** Isolation and identification of biofilm microorganisms from silicone gastrostomy devices. *Journal of pediatric surgery*, 2003, 38 (2), 216-220.
- De Kievit, T. R.** *Quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 2009, 11 (2), 279-288.
- Donlan, R. M.** Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, 8, 881-889.
- Dos Santos Rodrigues, J. B., de Carvalho, R. J., De Souza, N. T., De Sousa Oliveira, K., Franco, O. L., Schaffner, D., De Souza, E. L. and Magnani, M.** Effects of oregano essential

oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. Food Control, 2017, 73, 1237-1246.

**Douglas, L. J.** *Candida* biofilms and their role in infection. Trends in Microbiology, 2003, 11(1), 30-36.

**Filoche, S. K., Soma, K. and Sissons, C. H.** Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. Oral Microbiology and Immunology, 2005, 20, 221-225.

**Flemming, H.-C., Neu, T. R. and Wozniak, D. J.** The EPS matrix: „House of biofilm cells“. Journal of Bacteriology, 2007, 189, 7945-7947.

**Freemen, D. J., Falkner, F. R. and Keane, C. T.** New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. Journal of Clinical Pathology, 1989, 42, 872-874.

**Ghaed, S., Marandi, R. and Mazhar, F.** Removal of BOD5 and COD from saline wastewater using fixed bed column of *Aspergillus oryzae* and *Halobacillus dabanensis*. Current World Environment, 2015, 10 (3), 830-838.

**Gibson, G. R.** Food science and technology bulletin - Functional foods, 5 - Bacterial biofilms. International Food Information Service (IFIS Publishing), 2009.

**Gruhlke, M. C. H., Schlembach, I., Leontiev, R., Uebachs, A., Gollwitzer, P. U., Weiss, A., Delaunay, A., Toledano, M. and Slusarenko, A.** Yap1p, the central regulator of the *S. cerevisiae* oxidative stress response, is activated by allicin, a natural oxidant and defence substance of garlic. Free Radical Biology and Medicine, 2017, 108, 793-802.

**Grumezescu, A. M., Mogosanu, G. D., Bejenaru, C., Bejenaru, L. E.** Food preservation-nanotechnology in the agri-food industry, 6 - Terpenoids: Essential oils. Elsevier, 2017.

**Guerra-Rosas, M. I., Morales-Castro, J., Cubero-Márquez, M. A., Salvia-Trujillo, L. and Martín-Belloso, O.** Antimicrobial activity of nanoemulsions containing essential oils and high methoxyl pectin during long-term storage. Food Control, 2017, 77, 131-138.

**Hajmehdipoor, H., Shekarchi, M., Khanavi, M., Abid, N. and Amri, M.** A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. Pharmacogn Mag, 2010, 6 (23), 154-158.



**Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. and Stoodley, P.** "Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases." *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2 (2), 95- 108.

**Hamd, M. A. E., Derayea, S. M., Abdelmageed, O. H. and Askal, H. F.** A novel spectrophotometric method for determination of five 1,4-dihydropyridine drugs in their tablets and capsules using vanillin reagent. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 4 (3), 148-157.

**Han, J. H.** *Innovations in food packaging (2nd Edition) - Essential Oils*. Elsevier, 2014.

**Han, X., Huang, X. and Zhang, B.** Morphological studies of menthol as a temporary consolidant for urgent conservation in archaeological field. *Journal of Cultural Heritage*, 2016, 18, 271-278.

**Harshvardhan, K., Suri, M., Goswami, A. and Goswami, T.** Biological approach for the production of vanillin from lignocellulosic biomass (*Bambusa tulda*). *Journal of Cleaner Production*, 2017, 149, 485-490.

**Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., et al.** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal Infectious Diseases*, 2011, 15 (4), 305-311.

**Helmerick, E. C., Loftus, J. P. and Wakshlag, J. J.** The effects of baicalein on canine osteosarcoma cell proliferation and death. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2014, 12 (4), 299-309.

**Hintz, T., Matthews, K. K. and Di, R.** The use of plant antimicrobial compounds for food preservation. *Biomed Research International.*, 2015, 1-13.

**Holá, V., Růžička, F. and Votava, M.** Kvasinkový biofilm v humánní medicíně. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, Praha: TRIOS s.r.o. Praha, 2007, 13 (4), 145-149.

**Holá, V.** Mikrobiální biofilmy: 3. Biofilmová společenstva lidského těla a biofilmové infekce, 2012, 271-275. Dostupné z: <http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/mikrobalni-biofilmy-3-biofilmova-spolecenstva-lid.pdf>. [cit. 2017-02-15].

**Chatuphonprasert, W., Lao-Ong, T. and Jarukamjorn, K.** Improvement of superoxide dismutase and catalase in streptozotocin–nicotinamide-induced type 2-diabetes in mice by berberine and glibenclamide. *Pharmaceutical Biology*, 2013, 52 (4), 419-427.

- Chen, Y., Liu, T., Wang, K., Hou, C., Cai, S., Huang, Y., et al.** Baicalein inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and the *quorum sensing* system *in vitro*. PLoS ONE, 2016, 11 (4), e0153468.
- Chmielewski, R. A. N. and Frank, J. F.** “Biofilm formation and control in food processing facilities.” Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2013, 2 (1), 22-32.
- Choi, N.-Y., Kim, B.-R., Bae, Y.-M. and Lee, S.-Y.** Biofilm formation, attachment, and cell hydrophobicity of foodborne pathogens under varied environmental conditions. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2013, 56 (2), 207-220.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M. and Beachey, E. H.** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. Journal of Clinical Microbiology, 1985, 22 (6), 996–1006.
- Chu, M., Zhang, M., Liu, Y., Kang, J., Chu, Z., Yin, K., Ding, L., Ding, R., Xiao, R., Yin, Y., Liu, X. and Wang, Y.** Role of berberine in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Scientific Reports, 2016, 6 (1).
- Chua, L. S.** A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 150 (3), 805-817.
- Idehen, E., Sang, S. and Tang, Y.** Bioactive phytochemicals in barley, 2016. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2016.08.002>. [cit. 2017-03-12].
- Imenshahidi, M. and Hosseinzadeh, H.** *Berberis vulgaris* and berberine: An update review. Phytotherapy research, 2016, 30 (11), 1745-1764.
- Jaganathan, S. K., Mazumdar, A., Mondhe, D. and Mandal, M.** Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines. Cell Biology International, 2011, 35 (6), 607-615.
- Jing, P., Song, L.-H., Shen, S.-Q., Zhao, S.-J., Pang, J. and Qian, B.-J.** Characterization of phytochemicals and antioxidant activities of red radish brines during lactic acid fermentation. Molecules, 2014, 19 (7), 9675-9688.
- Jones, S. M., Yerly, J., Hu, Y., Ceri, H. and Martinuzzi, R.** Structure of *Proteus mirabilis* biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media. FEMS Microbiology Letters, 2007, 268, 16-21.

- Joo, J. H. and Jetten, A. M.** Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer Letters*, 2010, 287 (2), 123-135.
- Kaiser, T. D. L., Pereira, E. M., Dos Santos, K. R. N., Maciel, E. L. N., Schuenck, R. P. and Nunes, A. P. F.** Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2013, 75 (3), 235-239.
- Kalan, L., Loesche, M., Hodkinson, B. P., Heilmann, K., Ruthel, G., Gardner, S. E and Grice, E. A.** Redefining the chronic-wound microbiome: fungal communities are prevalent, dynamic, and associated with delayed healing, 2016. Dostupné z: <http://mbio.asm.org/content/7/5/e01058-16.full>. [cit. 2017-02-16].
- Kaur, S. and Singh, S.** Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology*, 2013, 1-8.
- Ke, Y., Liu, C., Hao, J., Lu, L., Lu, N., Wu, Z., Zhu, S. and Chen, X.** Morin inhibits cell proliferation and fibronectin accumulation in rat glomerular mesangial cells cultured under high glucose condition. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 84, 622-627.
- Keeling, C. I. and Bohlmann, J.** Plant terpenoids. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons. 2007.
- Kim, H.-S. and Park, H.-D.** Ginger extract inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *PloS one*, 2013, 8 (9), e76106.
- Krüger, S., Urmann, O. and Morlock, G. E.** Development of a planar chromatographic method for quantitation of anthocyanes in pomace, feed, juice and wine. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1289, 105-118.
- Ku, C.-M. and Lin, J.-Y.** Farnesol, a sesquiterpene alcohol in essential oils, ameliorates serum allergic antibody titres and lipid profiles in ovalbumin-challenged mice. *Allergologia et Immunopathologia*, 2016, 44 (2), 149-159.
- Kvasničková, E., Maťátková, O., Masák, J. and Paldrychová, M.** Medicinální aspekty mikrobiálních biofilmů. *Chemické Listy*, 2016, 110, 485–490. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2016\\_07\\_485-490.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2016_07_485-490.pdf). [cit. 2017-02-15].

- Lee, J.-S., Bae, A.-M., Han, A. and Lee, S.-J.** Development of Congo red broth method for the detection of biofilm-forming or slime-producing *Staphylococcus* sp. LWT-Food Science and Technology, 2016, 73, 707-714.
- Leela, V. and Saraswathy, A.** Quantification of pharmacologically active markers gallic acid, quercetin and lupeol from *Acacia leucophloea* wild flowers by HPTLC method. Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques, 2013, 4, 160.
- Letis, A. S., Seo, E.-J., Nikolaropoulos, S. S., Efferth, T., Giannis, A. and Fousteris, M. A.** Synthesis and cytotoxic activity of new artemisinin hybrid molecules against human leukemia cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2017, 25 (13), 3357-3367.
- Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K. and Georgiev, M. I.** Terpenoids. Pharmacognosy. Elsevier, 2017, 233.
- Macikova, P., Halouzka, V., Hrbac, J., Bartak, P. and Skopalova, J.** Electrochemical behavior and determination of rutin on modified carbon paste electrodes. The Scientific World Journal, 2012, 1-9.
- Manner, S., Skogman, M., Goeres, D., Vuorela, P. and Fallarero, A.** Systematic exploration of natural and synthetic flavonoids for the inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilms. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14 (10), 19434-19451.
- Marqués-Calvo, M. S., Codony, F., Agustí, G. and Lahera, C.** Visible light enhances the antimicrobial effect of some essential oils. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2017, 17, 180-184.
- Mathur, S., Gutte, M., Paul, D. and Udgire, M.** Study the effect of essential oils on microbial biofilm formation by *Klebsiella pneumonia*. Scholars Academic Journal of Biosciences, 2013, 1, 76-9.
- Miller, M. B. and Bassler, B. L.** *Quorum sensing* in bacteria. Annual Review of Microbiology, 2001, 55 (1), 165-199.
- Mohsenipour, Z. and Hassanshahian, M.** The effects of *Allium sativum* extracts on biofilm formation and activities of six pathogenic bacteria. Jundishapur journal of microbiology, 2015, 8 (8), e18971.

- Motarjemi, Y. M. and Ewen, G. T.** Encyclopedia of food safety - Argemone alkaloids. Elsevier. 2014.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L. and Lewenza, S.** Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. PLoS Pathogens, 2008, 4 (11), e1000213.
- Murphy, D. J.** Encyclopedia of applied plant sciences (Second Edition): Alkaloids. 2017, 118-124. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00221-5>. [cit. 2017-03-13].
- Nadell, C. D., Xavier, J. B. and Foster, K. R.** The sociobiology of biofilms. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33, 206-224.
- Namasivayam, S. K. R. and Roy, E. A.** Anti biofilm effect of medicinal plant extracts against clinical isolate of biofilm of *Escherichia coli*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2013, 5 (2), 486-489.
- Nevzorova, Y. A., Grossmann, J. and Trautwein, Ch.** Anti-tumorigenic and anti-angiogenic effects of natural conifer *Abies sibirica* terpenoids in vivo and in vitro. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 89, 386-395.
- Nickerson, K. W., Atkin, A. L. and Hornby, J. M.** *Quorum sensing* in dimorphic fungi: Farnesol and beyond, 2006. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/72/6/3805/F3.expansion.html>. [cit. 2017-05-08].
- Núñez, O. G.-A., Martins, H. and Paolo, C. L.** Fast liquid chromatography-mass spectrometry methods in food and environmental analysis - Polyphenols. World Scientific, 2015.
- Nyenje, M. E., Green, E. and Ndip, R. N.** Evaluation of the effect of different growth media and temperature on the suitability of biofilm formation by *Enterobacter cloacae* strains isolated from food samples in South Africa. Molecules, 2013, 18 (8), 9582-9593.
- Oliveira, A. and Cunha, M. de L. R. S.** Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. BMC Research Notes, 2010, 3 (1), 260.
- Olowosulu, A. K. and Ibrahim, Y. K. E.** Studies on the antimicrobial screening of aqueous extracts of five plants used in Folk medicine in Nigeria. West African Journal of Biology Science, 2006, 3 (5), 21-26.

- Pannanusorn, S., Fernandez, V. and Römling, U.** Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses*, 2013, 56 (3), 264–272.
- Peixoto-Neves, D., Silva-Alves, K. S., Gomes, M. D., Lima, F. C., Lahlou, S., Magalhaes, P. J., Ceccatto, V. M., Coelho-de-Souza, A. N. and Leal-Cardoso, J. H.** Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2010, 24 (3), 341-350.
- Percival, S. L., Williams, D. W., Randle, J. and Cooper, T.** Biofilms in infection prevention and control. *A healthcare handbook*, 2014.
- Quave, C. L., Compadre, C. M., Hobby, G., et al.** Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. *PloS one*, 2012, 7 (1), e28737.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. and Pouységou, L.** Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50 (3), 586-621.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J. and Ziebuhr, W.** Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44, 3357-3363.
- Ramage, G., Saville, S. P., Thomas, D. P. and Lopez-Ribot, J. L.** *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4 (4), 633-638.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S. and Rao, R.** Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54 (12), 5062-5069.
- Raut, J. S., Shinde, R. B., Chauhan, N. M. and Mohan Karuppaiyl, S.** Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. *Biofouling*, 2013, 29 (1), 87-96.
- Ribeiro, D., Freitas, M., Lima, J. L. F. C. and Fernandes, E.** Proinflammatory pathways: The modulation by flavonoids. *Medicinal Research Reviews*, 2015, 35 (5), 877-936.
- Roleira, F. M., Tavares-da-Silva, E. J., Varela, C. L., Costa, S. C., Silva, T., Garrido, J. and Borges, F.** Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. *Food Chemistry*, 2015, 183, 235-258.

**Rulík, M.** Mikrobiální biofilmy 2. Vodní prostředí, 2012. Dostupné z: <http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/mikrobialni-biofilmy-2-vodni-prostredi.pdf>. [cit. 2017-02-15].

**Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M. F. R., Kim, K.-S. and Ha, S. D.** Effectiveness of a phage cocktail as a biocontrol agent against *L. monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 2017, 78, 256-263.

**Sanla-Ead, N., Jangchud, A., Chonhenchob, V. and Suppakul, P.** antimicrobial activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose-based packaging films. *Packaging Technology and Science*, 2012, 25 (1), 7-17.

**Santiago, C., Pang, E. L., Lim, K. H., Loh, H. S. and Ting, K. N.** Inhibition of penicillin-binding protein 2a (PBP2a) in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by combination of ampicillin and a bioactive fraction from *Duabanga grandiflora*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 15 (1), 1.

**Santos, T. B., Vieira, A. A., Paula, L. O., et al.** Flexible camphor diamond-like carbon coating on polyurethane to prevent *Candida albicans* biofilm growth. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2017, 68, 239-246.

**Sasikumar, R., Govindasamy, M., Chen, S.-M., Chieh-Liu, Y., Ranganathan, P. and Rwei, S.-P.** Electrochemical determination of morin in kiwi and strawberry fruit samples using vanadium pentoxide nano-flakes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2017.

**Shahzad, M., Sherry, L., Rajendran, R., Edwards, Ch. A., Combet, E. and Ramage, G.** Utilising polyphenols for the clinical management of *Candida albicans* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2014, 44 (3), 269-273.

**Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S. and Kundo, B.** Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 123 (3), 308-313.

**Sokolova, A. S., Yarovaya, O. I., Baev, D. S., Shernyukov, A. V., Shtro, A. A., Zarubaev, V. V. and Salakhutdinov, N. F.** Aliphatic and alicyclic camphor imines as effective inhibitors of influenza virus H1N1. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 127, 661-670.

**Sung, S.-Y., Sin, L. T., Tee, T.-T., Bee, S.-T., Rahmat, A. R., Rahman, W. A., Tan, A.-C. and Vikhraman, M.** Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends Food Science and Technology*, 2013, 33, 110-123.

**Tapia-Rodriguez, M. R., Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Martinez-Tellez, M. A., Martins, C. M. and Ayala-Zavala, J. F.** Carvacrol as potential *quorum sensing* inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and biofilm production on stainless steel surfaces. *Food Control*, 2017, 75, 255-261.

**Tolker-Nielsen, T. and Molin, S.** Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial Ecology*, 2000, 40, 75-84.

**Touani, F. K., Seukep, A. J., Djeussi, D. E., Fankam, A. G., Noumedem, J. A. and Kuete, V.** Antibiotic-potential activities of four Cameroonian dietary plants against multidrug-resistant Gram-negative bacteria expressing efflux pumps. *BMC Complement. Alternative Medicine*, 2014, 14 (1), 1.

**Turan, N. B., Chormey, D. S., Büyükpınar, C., Engin, G. O. and Bakirdere, S.** *Quorum Sensing*: Little talks for an effective bacterial coordination. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2017.

**Turcheniuk, V., Raks, V., Issa, R., et al.** Antimicrobial activity of menthol modified nanodiamond particles. *Diamond and Related Materials*, 2015, 57, 2-8.

**Van Houdt, R. and Michiels, Ch. V.** Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 2005, 156 (5-6), 626-633.

**Vargas-Muniz, J. M., Renshaw, H., Waitt, G., Soderblom, E. J., Moseley, M. A., Palmer, J. M., Juvvadi, P. R., Keller, N. P. and Steinbach, W. J.** Caspofungin exposure alters the core septin AspB interactome of *Aspergillus fumigatus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 485 (2), 221-226.

**Vatanparast, J. and Andalib-Lari, F.** Camphor elicits epileptiform discharges in snail neurons: The role of ion channels modulation. *NeuroToxicology*, 2017, 60, 299-307.

**Villena, G. K., Fujikawa, T., Tsuyumu, S. and Gutiérrez-Correa, M.** Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy. *Bioresource Technology*, 2010, 101 (6), 1920-1926.



- Visvalingam, J., Palaniappan, K. and Holley, R. A.** In vitro enhancement of antibiotic susceptibility of drug resistant *Escherichia coli* by cinnamaldehyde. *Food Control*, 2017, 79, 288-291.
- Wang, F., Liu, Z., Zhang, D. and Niu, X.** In vitro activity of farnesol against vaginal *Lactobacillus* spp. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2017a, 212, 25-29.
- Wang, L., Zhao, X., Zhu, C., Xia, X., Qin, W., Li, M., Wang, T., Chen, S., Xu, Y., Hang, B., Sun, Y., Jiang, J. and Richard, L. P.** Thymol kills bacteria, reduces biofilm formation, and protects mice against a fatal infection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain L20. *Veterinary Microbiology*, 2017b, 203, 202-210.
- Wang, X., He, X., Zhang, Ch.-F., Guo, Ch.-R., Wang, Ch.-Z. and Yuan, Ch.-S.** Anti-arthritic effect of berberine on adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017c, 89, 887-893.
- Wenzel, M.** Léčivé rostliny: nejlepší využití pro zdraví celé rodiny. 1. vyd. Praha: Grada, 2014.
- Williams, P., Camara, M., Hardman, A., Swift, S., Milton, D., Hope, V. J., Winzer, K., Middleton, B., Pritchard, D. I. and Bycroft, B. W.** Quorum sensing and the populationdependent control of virulence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 2000, 355, 667-680.
- Xie, Q., Li, J. and Zhou, X.** Anticaries effect of compounds extracted from *Galla Chinensis* in a multispecies biofilm model. *Oral Microbiology and Immunology*, 2008, 23, 459-465.
- Yang, H., Barros-Rios, J., Kourteva, G., et al.** A re-evaluation of the final step of vanillin biosynthesis in the orchid *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry*, 2017, 139, 33-46.
- Yang, Y., Liu, S., He, Y., Chen, Z. and Li, M.** Effect of LongZhang Gargle on biofilm formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* in vitro. *BioMed Research International*, 2016, 1-9.
- Zhang, J.-L., Laurence Souders, C., Denslow, N. D. and Martyniuk, C. J.** Quercetin, a natural product supplement, impairs mitochondrial bioenergetics and locomotor behavior in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2017, 327, 30-38.
- Zhao, J., Zhang, X., Dong, L., Wen, Y., Zheng, X., Zhan, C., Chen, R., Zhang, Y., Li, Y., He, T., Zhu, X. and Li, L.** Cinnamaldehyde inhibits inflammation and brain damage in a mouse

model of permanent cerebral ischaemia. *British Journal of Pharmacology*, 2015, 172 (20), 5009-5023.

**Zhao, X., Wang, L., Zhang, H., Zhang, D., Zhang, Z. and Zhang, J.** Protective effect of artemisinin on chronic alcohol induced-liver damage in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2017, 52, 221-226.

**Zhong, H., Bi, S., Su, J., Bi, S., Zhang, Z.-E., Wang, Z., Zhang, R.-L., Xu, Z., Jianq, Y.-Y. and Wang, Y.** Activity of sanguinarine against *Candida albicans* biofilms, 2017, 61 (5), e02259-16.

**Zuo, G.-Y., Zhang, X.-J., Yang, C.-X., Han, J., Wang, G.-C. and Bian, Z.-Q.** Evaluation of traditional Chinese medicinal plants for anti-MRSA activity with reference to the treatment record of infectious diseases. *Molecules*, 2012, 17 (3), 2955-2967.

## **Internetové zdroje**

### **en.pharmacodia.com**

Dostupné z: [http://en.pharmacodia.com/web/drug/1\\_10816.html](http://en.pharmacodia.com/web/drug/1_10816.html) [cit. 2017-06-02].

### **chemistry.about.com**

Dostupné z: <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---L/Linalool.htm> [cit. 2017-06-02].

### **pharmaxchange.info**

Dostupné z: <http://pharmaxchange.info/press/2014/01/pharmacognosy-and-health-benefits-of-garlic/> [cit. 2017-06-03].

### **thescienceofacne.com**

Dostupné z: <http://thescienceofacne.com/cinnamon/cinnamaldehyde-chemical-structure/> [cit. 2017-06-03].

### **www.celostnimedica.cz**

Dostupné z: <https://www.celostnimedica.cz/rutin.htm> [cit. 2017-06-05].

Dostupné z: <https://www.celostnimedica.cz/tymian.htm> [cit. 2017-06-05].

Dostupné z: <https://www.celostnimedica.cz/dobromysl-obecna-originamu-vulgare.htm> [cit. 2017-06-05].

Dostupné z: <https://www.celostnimedica.cz/kvercetin.htm> [cit. 2017-06-05].

Dostupné z: <https://www.celostnimedica.cz/smil-pisecky-helichrysum-arenarium.htm> [cit. 2017-06-05].

Dostupné z: <https://www.celostnimedica.cz/trnovnik-akat-bily.htm> [cit. 2017-06-05].

Dostupné z: <https://www.celostnimedica.cz/medunka-lekarska-melissa-officinalis.htm> [cit. 2017-06-05].

**www.intechopen.com**

Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/biodegradation-life-of-science/phenolic-extractives-and-natural-resistance-of-wood> [cit. 2017-06-02].

**www.jpbonline.org**

Dostupné z: [http://www.jpbonline.org/viewimage.asp?img=JPharmBioallSci\\_2010\\_2\\_4\\_360\\_72141\\_f6.jpg](http://www.jpbonline.org/viewimage.asp?img=JPharmBioallSci_2010_2_4_360_72141_f6.jpg) [cit. 2017-06-03].

**www.medchemexpress.com**

Dostupné z: <http://www.medchemexpress.com/Sanguinarine.html> [cit. 2017-05-28].

**www.tnjchem.com**

Dostupné z: [http://www.tnjchem.com/camphor-cas-76-22-2\\_p82.html](http://www.tnjchem.com/camphor-cas-76-22-2_p82.html) [cit. 2017-06-02].