

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Biofilm tvořený mikroorganismy z chronických ran

Bc. Hana Bartošová

Diplomová práce

2019

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Hana Bartošová**  
Osobní číslo: **C17427**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Biofilm tvořený mikroorganismy z chronických ran**  
Zadávající 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 :

Teoretická část:

1. Zpracujte literární rešerši na dané téma.
2. Zaměřte se na mikroorganismy vyskytující se v chronických ranách, na jejich vzájemné vztahy a popište i možnosti směsných biofilmů v ranách.

Experimentální část:

1. Otestujte tvorbu biofilmu jak u sbírkových kmenů, tak u kmenů klinických, získaných ze stěrů z chronických ran.
2. Porovnejte tvorbu biofilmu u bakterií izolovaných z chronických ran a u sbírkových kmenů bakterií.
3. Pokuste se pomocí spektrofotometrické metody stanovit i polymikrobiální biofilm.
4. Získané výsledky zhodnoťte, vyvoďte závěry a porovnejte s publikovanými pracemi.
5. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 ve znění dodatku č. 1 „Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu”.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Petra Mořková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Ing. Iveta Brožková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání diplomové práce: **30. listopadu 2018**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

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 směrnici Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně

V Pardubicích dne 2. 5. 2019

Bc. Hana Bartošová

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce Ing. Petře Motřkové, Ph.D. a konzultantce Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při zpracování této práce.

Své rodině děkuji za podporu během studia.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce se zabývá tvorbou biofilmu u klinických kmenů bakterií, získaných z chronických ran, a sbírkových kmenů. Teoretická část diplomové práce je zaměřena na charakterizaci monomikrobiálního a polymikrobiálního biofilmu, včetně popisu mikroorganismů které se zde nejčastěji nachází. Dále tato diplomová práce zmiňuje informace o biofilmu a mikroorganismech v chronických ranách.

Praktická část diplomové práce je zaměřena na detekci tvorby monomikrobiálního a polymikrobiálního biofilmu pomocí Christensenovy metody v mikrotitračních destičkách. Tvorba biofilmu u bakterií izolovaných z chronických ran byla porovnána s tvorbou biofilmu sbírkových kmenů bakterií.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

biofilm, Christensenova metoda, detekce, monomikrobiální, polymikrobiální

## **TITLE**

Biofilm formed by microorganisms from chronic wounds

## **ANNOTATION**

This thesis deals with the formation of biofilm by bacteria isolated from chronic wound. The theoretical part of the thesis is focused on characterization of monomicrobial and polymicrobial biofilm, including the description of microorganisms that occur there. Moreover this thesis includes information about biofilm and microorganisms in chronic wounds.

The practical part of the thesis is focused on the detection of monomicrobial and polymicrobial biofilm by Christensen's method in microtiter plates. Biofilm formation by bacteria isolated from chronic wounds was compared with biofilm formation by culture strains.

## **KEYWORDS**

biofilm, Christensen's method, detection, monomicrobial, polymicrobial

# Obsah

<b>Úvod</b> .....	14
<b>1 Teoretická část</b> .....	15
<b>1.1 Charakterizace biofilmu</b> .....	15
1.1.1 Složení biofilmu .....	15
1.1.2 Výskyt biofilmu .....	16
1.1.3 Tvorba biofilmu .....	17
1.1.4 Quorum sensing .....	18
1.1.5 Mikroorganismy tvořící biofilm.....	19
<b>1.2 Směsný biofilm</b> .....	27
1.2.1 Synergismus ve směsném biofilmu.....	27
1.2.2 Antagonismus ve směsném biofilmu .....	32
<b>1.3 Chronické rány</b> .....	35
1.3.1 Mikroorganismy v chronických ranách .....	35
1.3.2 Biofilm v chronických ranách.....	38
<b>2 Cíle diplomové práce</b> .....	40
<b>3 Experimentální část</b> .....	41
<b>3.1 Použité kmeny mikroorganismů</b> .....	41
3.1.1 Bakteriální kmeny izolované z chronických ran.....	41
3.1.2 Sbírkové bakteriální kmeny .....	41
<b>3.2 Použité přístroje, pomůcky, živná média a pracovní roztoky</b> .....	43
3.2.1 Přístroje .....	43
3.2.2 Pomůcky.....	43
3.2.3 Živná média a pracovní roztoky.....	43

3.3	Příprava bakteriální suspenze a ověření denzity buněk.....	47
3.4	Detekce mikrobiálního biofilmu Christensenovou metodou v mikrotitračních destičkách .....	48
3.4.1	Detekce monomikrobiálního biofilmu .....	48
3.4.2	Detekce polymikrobiálního biofilmu .....	49
3.4.3	Hodnocení výsledků.....	49
4	Výsledky a diskuze .....	51
4.1.1	Optimalizace metody .....	53
4.2	Tvorba monomikrobiálního a polymikrobiálního biofilmu v jednotlivých kultivačních médiích.....	56
4.2.1	Tvorba biofilmu v BHI po 1 denní a 2 denní kultivaci.....	56
4.2.2	Tvorba biofilmu v BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy po 1 denní kultivaci.....	59
4.2.3	Tvorba biofilmu v TSB po 1 denní kultivaci .....	63
4.2.4	Tvorba biofilmu v TSB s 1 % glukózy po 1 denní kultivaci .....	66
4.3	Tvorba biofilmu testovaných mikrobiálních kmenů.....	69
4.3.1	<i>Proteus</i> spp.....	69
4.3.2	<i>Pseudomonas</i> spp. ....	71
4.3.3	<i>Serratia marcescens</i> .....	73
4.3.4	<i>Staphylococcus</i> spp. ....	74
4.3.5	<i>Moraxella osloensis</i> .....	76
5	Závěr.....	78
6	Zdroje.....	79
7	Přílohy.....	89



## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Cyklus vývoje biofilmu. ....	17
<b>Obrázek 2:</b> <i>Staphylococcus aureus</i> 94A na KA .....	19
<b>Obrázek 3:</b> Cyklus vývoje biofilmu <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
<b>Obrázek 4:</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 87A na MPA .....	22
<b>Obrázek 5:</b> <i>Serratia marcescens</i> CCM 303 na MPA .....	25
<b>Obrázek 6:</b> <i>Proteus</i> spp. 75 na MPA .....	26
<b>Obrázek 7:</b> Zobrazení <i>S. aureus</i> a <i>Ps. aeruginosa</i> v biofilmu chronické rány .....	30
<b>Obrázek 8:</b> Chronický diabetický vřed dolní končetiny .....	35

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Chemické složení biofilmu.....	16
<b>Tabulka 2:</b> Přehled bakteriálních kmenů izolovaných z chronických ran kulturační a molekulární metodou.....	37
<b>Tabulka 3:</b> Přehled testovaných klinických kmenů.....	42
<b>Tabulka 4:</b> Stanovení tvorby biofilmu dle optické denzity .....	50
<b>Tabulka 5:</b> Rozdělení testovaných bakterií do skupin dle schopnosti tvořit monomikrobiální biofilm ve všech testovacích médiích .....	52
<b>Tabulka 6:</b> Rozdělení testovaných bakterií do skupin dle schopnosti tvořit polymikrobiální biofilm ve všech testovacích médiích .....	53

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1:</b> Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů v BHI po 1 denní kultivaci při 37° C.....	57
<b>Graf 2:</b> Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů v BHI po 2 denní kultivaci při 37° C .....	59
<b>Graf 3:</b> Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů v BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy po 1 denní kultivaci při 37° C .....	61
<b>Graf 4:</b> Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů v BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy po 2 denní kultivaci při 37° C .....	62
<b>Graf 5:</b> Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů v TSB po 1 denní kultivaci při 37° C.....	64
<b>Graf 6:</b> Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů v TSB po 2 denní kultivaci při 37° C.....	65
<b>Graf 7:</b> Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů v TSB s 1 % glukózy po 1 denní kultivaci při 37° C .....	67
<b>Graf 8:</b> Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů v TSB s 1 % glukózy po 2 denní kultivaci při 37° C .....	68
<b>Graf 9:</b> Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů bakterie <i>Proteus</i> spp. ve vybraných kultivačních médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37° C .....	70
<b>Graf 10:</b> Tvorba biofilmu testovaných kmenů <i>Ps. aeruginosa</i> a <i>Ps. monteilii</i> ve vybraných kultivačních médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37° C .....	71
<b>Graf 11:</b> Tvorba biofilmu testovaných kmenů <i>Ps. putida</i> ve vybraných kultivačních médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37° C .....	73
<b>Graf 12:</b> Tvorba biofilmu testovaných kmenů <i>Ser. marcescens</i> ve vybraných kultivačních médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37° C .....	74
<b>Graf 13:</b> Tvorba biofilmu testovaných kmenů <i>Staphylococcus</i> spp. ve vybraných kultivačních médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37° C.....	75
<b>Graf 14:</b> Tvorba biofilmu testovaného kmene <i>Moraxella osloensis</i> ve vybraných kultivačních médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37° C .....	77

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

A <sub>595</sub>	absorbance při 595 nm
AI-2	autoinduktor-2
ATB	antibiotika
BHI	mozko-srdcový bujón
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CF	cystická fibróza
CFU	kolonie tvořící jednotky
CLSM	konfokální laserová rastovací mikroskopie
CNS	centrální nervová soustava
DM	diabetes mellitus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPD	4,5-dihydroxy-2,3-pentandion
eDNA	extracelulární DNA
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EPS	exopolysacharidy
G+	grampozitivní
GIT	gastrointestinální trakt
G-	gramnegativní
HAI	infekce spojené se zdravotnickou péčí
KA	krevní agar
<i>M. catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
MHB	Mueller-Hinton bujón
<i>M. osloensis</i>	<i>Moraxella osloensis</i>
MPA	masopeptonový agar
MRSA	methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NHI	celostátní institut zdraví
OD <sub>c</sub>	optická denzita negativní kontroly
OD	optická denzita
3-oxo-C <sub>12</sub> HSL	N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserin lakton
Pel	polysacharid kódovaný operonem Pel

<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
PNA-FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace s využitím peptidových nukleových kyselin jako sond
<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Psl	polysacharid kódovaný operonem Psl
<i>Ps. monteilii</i>	<i>Pseudomonas monteilii</i>
<i>Ps. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
Pta	proteusový toxin aglutinin
<i>P. vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
QS	quorum sensing
RNA	ribonukleová kyselina
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Ser. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>S. piscifermentans</i>	<i>Staphylococcus piscifermentans</i>
spp.	blíže neurčené druhy příslušného rodu (species)
TSB	trypton-sójový bujón

## ÚVOD

Biofilm představuje mikrobiální sdružení buněk, které je vázané k určitému povrchu a je obklopené extracelulární polymerní matricí, kterou buňky samy vylučují. Toto uspořádání poskytuje mikrobiálním buňkám v biofilmu značné výhody, jako je např. ochrana proti antibiotikům nebo imunitnímu systému.

Biofilm zajišťuje organismu fyziologickou a prospěšnou funkci, stejně tak je tvorba biofilmu často důvodem vzniku chronických infekcí, které jsou ve většině případů rezistentní k léčbě a představují tak významný terapeutický problém. Ve zdravotnictví se biofilm nachází nejčastěji na zavedených zdravotnických pomůckách, ale také přímo na živých tkáních.

Biofilm se může skládat pouze z jednoho druhu mikroorganismu, kdy hovoříme o biofilmu monomikrobiálním. Dále mohou být biofilmy polymikrobiální, které se skládají z více druhů mikroorganismů. U polymikrobiálních biofilmů dochází k vzájemným polymikrobiálním interakcím a toto soužití mnohdy zlepšuje životaschopnost mikrobiálních buněk a přináší další výhody, jako je např. metabolická spolupráce či širší genofond. Čím větší je různorodost biofilmu, tím je biofilm odolnější. Polymikrobiální forma biofilmu dominuje nad monomikrobiální nejen v přírodě, ale také v lidském organismu, kde mezi typické polymikrobiální infekce patří chronické infekce, včetně chronických ran.

Tato diplomová práce se zabývá popisem monomikrobiálního biofilmu, chronickými ranami a typickými mikroorganismy, které se v nich vyskytují. Dále je práce zaměřena na polymikrobiální biofilm, včetně vzájemných interakcí mezi mikroorganismy, jako je antagonismus a synergismus uvnitř biofilmu.

Cílem praktické části diplomové práce bylo otestovat a porovnat tvorbu monomikrobiálního biofilmu sbírkových kmenů a kmenů klinických, získaných z chronických ran, pomocí Christensenovy metody v mikrotitračních destičkách. Dalším cílem bylo pokusit se pomocí spektrofotometrické metody stanovit i polymikrobiální biofilm.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 CHARAKTERIZACE BIOFILMU

Biofilm je tvořen mikrobiálním sdružením buněk, které jsou adherovány na živých nebo neživých površích a jsou obklopené extracelulární polymerní maticí, kterou buňky samy produkují. Biofilm se skládá z mikrokolonií, tvořící trojrozměrnou strukturu (Jamal *et al.*, 2015).

Biofilmové uspořádání poskytuje buňkám značné výhody a zajišťuje buňkám ochranu proti imunitnímu systému a antibiotikům (Jamal *et al.*, 2015). Biofilm je schopen degradovat antibiotické látky bakteriálními enzymy, které jsou nahromaděné v biofilmovém mikroprostředí. Dochází zde k vyšší proliferaci buněk díky zásobě živin v biofilmu, je zde snižena exprese porinů a naopak zvýšená aktivita efluxních čerpadel (Mandsberg *et al.*, 2007). Navíc se velké množství terapeutických prostředků místo na bakterie, na které je prostředek cílený, naváže na matici biofilmu a účinek prostředků je inaktivován (Jacob, 2006). Bylo například zjištěno, že pro léčbu infekcí, způsobených bakteriemi, které tvoří biofilm, je potřeba 10x až 100x vyšší dávky antibiotik (Otto, 2013; Nett, 2014). Bakterie v biofilmu jsou schopné aktivovat geny, které aktivují expresi stresových genů a následně přechází na rezistentní fenotypy (Fux *et al.*, 2005).

Všechny výhodné vlastnosti biofilmu způsobují, že je biofilm často důvodem vzniku chronických infekcí, které jsou těžko léčitelné (Bjarnsholt, 2013). Celostátní institut zdraví (NHI) uvádí, že asi 80 % chronických infekcí a 65 % všech mikrobiálních infekcí je spojeno s biofilmy (Jamal *et al.*, 2015).

### 1.1.1 Složení biofilmu

Biofilm se skládá ze dvou hlavních složek. První složka jsou vodní kanálky a druhá složka zahrnuje oblasti s hustě zabalenými buňkami, které neobsahují žádné význačné póry. Biofilm tvoří skupina jednoho nebo více druhů mikroorganismů, které produkují extracelulární látky, jako jsou proteiny, deoxyribonukleová kyselina (DNA), ribonukleová kyselina (RNA), polysacharidy a voda. Voda je hlavní částí biofilmu a je odpovědná za tok živin v rámci biofilmové matrice (Lear and Lewis, 2012). Procentový podíl složek biofilmu je uvedený

v **tabulce 1**. Biofilmová matrice může také obsahovat různé minerální krystaly, prachové a jílové částice nebo krevní složky, v závislosti na prostředí kde se biofilm nachází (Donlan, 2002).

**Tabulka 1** - Chemické složení biofilmu (upraveno dle Lu and Collins, 2007)

Složky biofilmu	Procentový podíl biofilmové matrice
Mikrobiální buňky	2-5 %
DNA a RNA	< 1-2 %
Polysacharidy	1-2 %
Proteiny (včetně enzymů)	< 1-2 %
Voda	Až 97 %

### 1.1.2 Výskyt biofilmu

Až 99,9 % bakterií je schopno tvořit biofilm na různém spektru povrchů (Sekhar *et al.*, 2009). Fyziologickou a prospěšnou funkci zajišťují v lidském organismu biofilmy specifických druhů bakterií např. na povrchu epitelů nebo hlenových vrstev gastrointestinálního traktu (GIT), kde vytváří účinnou bariéru proti nežádoucí invazi patogenních mikroorganismů do střevní sliznice (Willey *et al.*, 2008). GIT a dutina ústní jsou místa s vysokou mikrobiální rozmanitostí. Tyto sliznice přechodně nebo trvale kolonizuje šest set až tisíc jedinečných bakteriálních druhů (Peters *et al.*, 2012a). Ve zdravotnictví se často vyskytuje biofilm tvořený patogenními organismy, který způsobuje závažné infekce a představuje tak významný terapeutický problém.

Ve zdravotnictví se biofilm velice často vyskytuje na zavedených zdravotnických pomůckách, jako jsou katetry, umělé srdeční chlopně nebo ortopedické pomůcky a jiné implantáty, ale také přímo na živých tkáních (Donlan, 2002). Přestože sterilizace a aseptické prostředí výrazně redukuje počet patogenních bakterií přítomných v nemocničním prostředí, stále se až na 90 % implantátů nachází patogenní mikroorganismy a až 95 % infekcí souvisejících s implantáty způsobují mikroorganismy žijící v biofilmu (Nablo *et al.*, 2005; Von Eiff *et al.*, 2005).

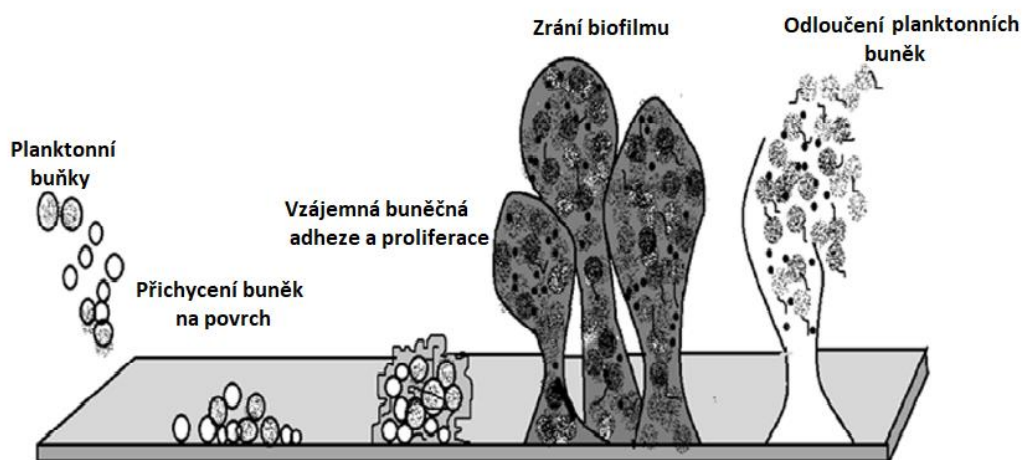


### 1.1.3 Tvorba biofilmu

Vznik biofilmu začíná adhezí planktonních buněk na povrch (Percival *et al.*, 2015). Bakteriální buňky se ireverzibilně spojí s povrchem nebo již s jinou bakterií na tomto povrchu. Systém rozhraní pevných a kapalných látek, jako je voda nebo krev, utváří ideální prostředí pro připojení a následný růst bakterií (Costerton *et al.*, 1999; Donlan, 2002). U polymikrobiálních biofilmů poskytuje značné výhody pro přichycení přítomnost fimbrií nebo flagel bakteriálních buněk (Donlan and Costerton, 2002).

V důsledku chemických signálů dochází k násobení bakteriálního biofilmu. Po překročení určitého prahového signálu dochází k expresi genů, které mají za následek aktivaci produkce exopolysacharidů (EPS) tvořící biofilmovou matici (Costerton *et al.*, 1999). Následuje tvorba vodních kanálků, které jsou nezbytné pro transport živin uvnitř biofilmu a odstraňují odpadní materiál produkovaný mikrokoloniemi biofilmu (Parsek and Singh, 2003). Během tvorby biofilmu je mnoho druhů mikroorganismů schopno navzájem komunikovat pomocí specifického mechanismu nazvaného quorum sensing (QS).

Po dozrání biofilmu často dochází k odloučení bakterií od biofilmu. Ve většině případů bakterie zastaví produkci exopolysacharidů a jsou následně uvolněny z biofilmu do okolí jako planktonní bakteriální buňky. Někdy k uvolnění může dojít i v důsledku mechanického stresu. Uvolněné bakteriální buňky si zachovávají určité vlastnosti biofilmu, například rezistenci na antibiotika (ATB) (Baselga *et al.*, 1994). Stádia vývoje biofilmu znázorňuje **obrázek 1**.



**Obrázek 1** – Cyklus vývoje biofilmu (upraveno dle Costerton *et al.*, 1999).

Bakterie s biofilmovým fenotypem využívají molekulární patologické mechanismy, díky kterým dochází k připojení bakterií k hostitelským buňkám a k vnesení malých efektorových proteinů, které následně vedou k reorganizaci hostitelského buněčného cytoskeletu, zabraňují mitóze a hlavně inhibují apoptózu (Wolcott *et al.*, 2013).

Bakterie v biofilmu potřebují genovou expresi, která umožní připojení bakterií k hostitelské tkáni, uvedení hostitelských buněk do buněčné senescence, zabránění jejich vylučování a způsobí lokální zánět, který následně vede k vytvoření plasmového exsudátu pro trvalou výživu bakterií (Wolcott *et al.*, 2008). Pro splnění těchto požadavků mohou bakterie v biofilmu kombinovat svoji genetickou výbavu a jednotliví členové nemusí mít všechny potřebné geny. Takovéto zjištění vedlo k návrhu funkčně ekvivalentních patoskupin, které často obsahují opakující se skupiny mikroorganismů u biofilmových infekcích (Dowd *et al.*, 2008). Sdílení genů, umožňuje každému členu vynaložit méně energie pro udržení svého podílu na celkovém genofondu (Hogg *et al.*, 2007).

#### **1.1.4 Quorum sensing**

Bakterie využívají komunikační systém QS pro koordinaci buněčného chování v závislosti na hustotě populace buněk v biofilmu. QS reaguje na vylučované nebo difundované signální molekuly, které se mohou podstatně lišit v závislosti na druhu bakterií (Abisado *et al.*, 2018). Bakterie jsou schopny reagovat na signální hormonální molekuly tzv. autoinduktory. Pokud koncentrace autoinduktoru dosáhne kritického bodu, bakterie jsou schopny detekovat tuto změnu a reagovat na ní změnou genové exprese (Reading and Sperandio, 2005).

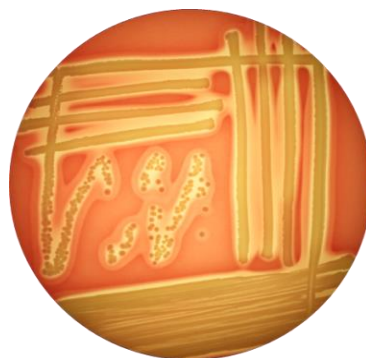
Produkty nově exprimovaných genů jsou prospěšné pro populaci buněk jako celku (Brookfield, 1998). Regulované geny jsou často klíčové pro kolonizaci hostitele a vznik infekce (Parsek and Greenberg, 2000), dále pro samotnou tvorbu biofilmu, faktorů antibiotické rezistence a faktorů virulence (Rutherford and Bassler, 2012). Předpokládá se, že QS umožňuje zpomalení produkce faktorů virulence, které by poškodily tkáň hostitele až do doby nahromadění dostatečného množství bakterií pro ovlivnění okolního prostředí tkáně. V důsledku tak dochází k obejití imunitní reakce hostitele (Daniels *et al.*, 2004).

## 1.1.5 Mikroorganismy tvořící biofilm

Původci běžných biofilmových infekcí jsou nejčastěji bakterie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* častěji však *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, dále *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, anaerobní bakterie např. *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Actinomyces* spp. a *Bacteroides fragilis*. Biofilmové infekce často tvoří i zástupci rodu *Enterococcus* (Tande *et al.*, 2014). Mezi bakterie tvořící biofilm v nemocničním prostředí patří i koaguláza negativní stafylokoky a to zejména *Staphylococcus epidermidis*, který fyziologicky kolonizuje kůži a je často izolovaný z ran a z povrchu implantátu (Otto, 2013). Mezi eukaryotní organismy, které často tvoří infekční biofilm, patří kvasinka *Candida albicans* a *Candida parapsilosis* (Azzam *et al.*, 2009).

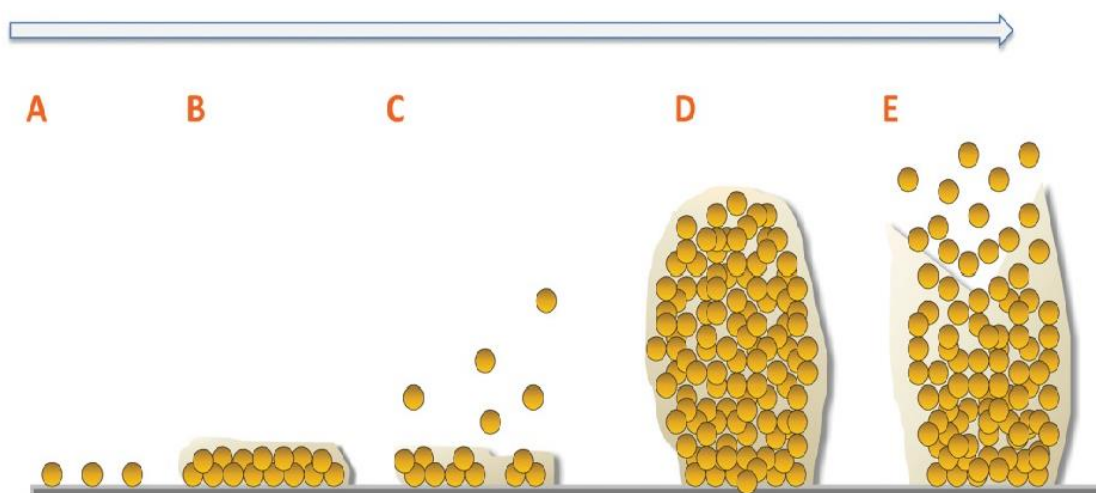
### 1.1.5.1 *Staphylococcus aureus*

Grampozitivní (G+) bakterie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) patří do skupiny patogenních mikroorganismů, kteří jsou nejčastějšími původci komunálních infekcí a infekcí spojených se zdravotnickou péčí (HAI) (Lister and Horswill, 2014). *S. aureus* kolonizuje převážně sliznici dutiny nosní. Infekce je často způsobená porušením slizniční bariéry a proniknutím bakteriálních buněk ke tkáním nebo do krevního řečiště. *S. aureus* je původcem velké řady infekcí, jako jsou akutní kožní abscesy, bakteriémie, endokarditidy a infekce chronických ran. Bakterie *S. aureus* a *S. epidermidis* patří mezi nejběžnější původce chronických infekcí spojených s tvorbou biofilmu (Costerton *et al.*, 2003). *S. aureus* tvoří biofilm nejčastěji na zdravotnických implantátech a hostitelských tkáních (Lister and Horswill, 2014). Růst bakterie *S. aureus* na krevním agaru (KA) znázorňuje **obrázek 2**.



**Obrázek 2** - *Staphylococcus aureus* 94A (izolát z chronické rány) na KA (24h, 37°C; foto autor)

Tvorba biofilmu u bakterie *S. aureus* zahrnuje 5 kroků a to adhezi, zmnožení, exodus, zrání a odloučení. K adhezi bakteriálních buněk dochází pomocí hydrofobních interakcí nebo pomocí mikrobiálních povrchových složek rozpoznávajících molekuly adhezivní matrice. Po adhezi následuje druhá fáze, kdy se buňky začnou množit a vytvoří konfluentní vrstvu buněk, která obsahuje proteinovou matici a extracelulární DNA (eDNA). Ve třetí fázi dochází k hromadnému exodu buněk, při kterém se z biofilmu uvolní subpopulace buněk pomocí degradace eDNA. Toto uvolnění umožní následnou tvorbu trojrozměrných mikrokolonií, tvořících se z různých ohnisek buněk, které zůstaly přichyceny během předešlé fáze exodu. V této předposlední fázi dochází ke zrání biofilmu. V poslední fázi dochází k odloučení planktonních buněk. Vývoj biofilmu bakterie *S. aureus* znázorňuje **obrázek 3** (Moormeier and Bayles, 2017).



**Obrázek 3** - Cyklus vývoje biofilmu *Staphylococcus aureus* (upraveno dle Moormeier and Bayles, 2017).

(a) adheze, (b) zmnožení, (c) exodus, (d) zrání, (e) rozptýlení

Mathur *et al.* (2006) hodnotili tvorbu biofilmu u 152 klinických izolátů bakterie *S. aureus* pomocí metody mikrotitračních destiček. Jako silně biofilm-pozitivních bylo vyhodnoceno 22 izolátů, středně biofilm-pozitivních 60 izolátů a slabě biofilm-pozitivních 70 izolátů bakterie *S. aureus*.

Rohde *et al.* (2007) sledovali schopnost bakterie *S. aureus* tvořit biofilm pomocí mikrotitračních destiček po kultivaci v mozko-srdcovém bujónu (BHI) s přídavkem 2% sacharózy a BHI s přídavkem 2% glukózy. Z 18 testovaných klinických izolátů této bakterie byly všechny izoláty vyhodnoceny jako biofilm pozitivní. 100% pozitivita mohla být dána použitím obohacených kultivačních médií o sacharózu a glukózu, které zvyšují expresi biofilm pozitivních fenotypů.

Malik *et al.* (2013) detekovali tvorbu biofilmu u klinických izolátů od pacientů se syndromem diabetické nohy. Celkem bylo získáno 255 bakteriálních izolátů a 60 izolátů tvořila bakterie *S. aureus*. Z těchto 60 izolátů bylo vyhodnoceno jako biofilm-pozitivních 43 izolátů.

Becker *et al.* (2018) sledovali tvorbu biofilmu u 126 klinických izolátů bakterie *S. aureus*, způsobující rozsáhlou řadu infekcí. Schopnost tvorby biofilmu testovali na mikrotitračních destičkách po obarvení krystalovou violetí. Jednotlivé izoláty byly rozděleny do 3 skupin podle schopnosti tvořit biofilm. Celkem 36,5 % izolátů bakterie *S. aureus* patřilo mezi silné producenty biofilmu, 46,8 % mezi mírné producenty biofilmu a 16,7 % izolátů biofilm netvořilo.

Studie provedená Luther *et al.* (2018) hodnotila tvorbu biofilmu u methicilin rezistentních *S. aureus* (MRSA) získaných ze 128 klinických izolátů. Ze všech testovaných izolátů MRSA produkovalo biofilm silně 25,8 % izolátů a 40,7 % izolátů produkovalo biofilm pouze slabě. Izoláty MRSA od pacientů, kteří byli v posledních 90 dnech vystaveny chemoterapii, patřily mezi silné producenty biofilmu. Naopak izoláty MRSA od pacientů, kteří měli vysokou koncentrací kreatininu v séru nebo byli dříve léčeni vankomycinem, patřily mezi slabé producenty biofilmu.

Klinickou studii 89 izolátů bakterie *S. aureus* získaných z ran provedli Tiwari *et al.* (2018). Tvorba biofilmu byla prokázána spektrofotometricky pomocí mikrotitračních destiček a barvení krystalovou violetí. 89 izolátů bylo zařazeno do 4 kategorií podle schopnosti tvořit biofilm. Ze všech izolátů bakterie *S. aureus* tvořilo 33 biofilm silně, 21 tvořilo biofilm středně, 25 tvořilo biofilm pouze slabě a 10 biofilm netvořilo vůbec.

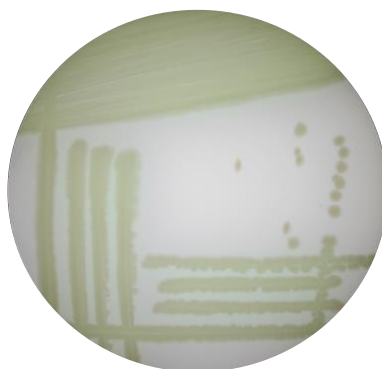
### 1.1.5.2 *Staphylococcus epidermidis*

G+ bakterie *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) patří mezi komenzální mikroflóru kůže a sliznic a při manipulaci se zdravotnickými pomůckami nebo při jejich implantaci může dojít k přenesení bakterie na povrch pomůcek, na kterém vzápětí tato bakterie vytváří biofilm a následně způsobuje infekci. *S. epidermidis* je hlavním původcem infekcí spojených s vnitřními zdravotnickými pomůckami jako jsou např. intravaskulární katetry, protetické klouby, protetické srdeční ventily, katetry peritoneální dialýzy a jiné. Chronická infekce může mít za následek vznik osteomyelitidy nebo akutní sepse a to hlavně u pacientů s oslabenou imunitou (Kaplan *et al.*, 2004).

Rohde *et al.* (2007) sledovali tvorbu biofilmu *S. epidermidis* pomocí mikrotitračních destiček v trypton-sójovém bujónu (TSB) a TSB s 2% chloridem sodným. Z 52 klinických izolátů *S. epidermidis* mělo 36 izolátů schopnost tvořit biofilm. Schopnost tvorby biofilmu rozlišuje invazivní kmeny *S. epidermidis* od komenzálních izolátů.

### 1.1.5.3 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (*Ps. aeruginosa*) je gramnegativní (G-) tyčinka, která je běžným lidským oportunním patogenem a při oslabení imunitního systému může způsobit závažné infekce. Je tak jedním z nejčastějších původců HAI infekcí. *Ps. aeruginosa* produkuje mnoho faktorů virulence a exprese těchto faktorů je regulovaná v reakci na změny v okolním prostředí, kterými může být i tvorba biofilmu (Alhazmi, 2015). Kultivaci bakterie *Ps. aeruginosa* na masopeptonovém agaru (MPA) znázorňuje **obrázek 4**.



**Obrázek 4** – *Pseudomonas aeruginosa* 87A (izolát z chronické rány) na MPA (24h, 37°C; foto autor)

Infekce způsobené *Ps. aeruginosa* mohou být akutní i chronické. Akutní infekce zahrnují např. infekci močových cest, kostí a kloubů nebo infekci měkkých tkání (Colvin *et al.*, 2012). Perzistentní infekce způsobené *Ps. aeruginosa* jsou typické hlavně pro onemocnění cystické fibrózy (CF) (Ryder *et al.*, 2007). Bakteriální biofilm *Ps. aeruginosa* má vysokou prevalenci u chronických ran, kde infekce způsobená touto bakterií často představuje vyšší riziko komplikací a negativní účinek na hojení (Gjodsbol *et al.*, 2006).

U pacientů s CF převládá v počátku infekce kolonizace nemukoidními fenotypy *Ps. aeruginosa* a postupem času se začínou objevovat mukoidní fenotypy, které jsou typické pro perzistentní CF. Pro mukoidní fenotyp je charakteristická nadprodukce extracelulárního polysacharidu alginátu, který je významným faktorem virulence *Ps. aeruginosa*. Tato nadprodukce vede k výrazným morfologickým změnám v biofilmu, které mají za následek zvýšenou rezistenci k ATB a zvýšenou odolnost vůči imunitnímu systému (Govan and Deretic, 1996). Kmeny produkující biofilm mají schopnost produkce několika typů polysacharidů, které jsou hlavní složkou biofilmové matrice. *Ps. aeruginosa* kromě alginátu, produkuje Pel a Psl polysacharidy, které se podílí na vývoji biofilmu. Produkce alginátu je charakteristická hlavně u mukoidních kmenů, Pel a Psl jsou exprimovány u planktonních buněk a přispívají tak k tvorbě biofilmu v počáteční fázi infekce, kde převládají nemukoidní kmeny *Ps. aeruginosa*. Protože terapie u chronické infekce, která je způsobená mukoidními kmeny, je často neúspěšná, zaměření terapie na Pel a Psl může úspěšně zabránit počáteční infekci (Ryder *et al.*, 2007).

Bendouah *et al.* (2006) provedli studii tvorby biofilmu u 10 klinických izolátů *Ps. aeruginosa* od pacientů s chronickou rinosinuitidou. K detekci biofilmu použili semikvantitativní metodu s krystalovou violetí. Z deseti testovaných izolátů bylo 6 stanoveno jako biofilm-pozitivní.

Perez *et al.* (2011) hodnotili tvorbu biofilmu *Ps. aeruginosa* u 74 klinických izolátů od pacientů s CF a bez CF. Kvantitativní stanovení bylo provedeno metodou mikrotitračních destiček dle Stepanovic *et al.* (2007) s modifikacemi. Byl použit TSB bujón s 0,25% glukózou. Jako biofilm-pozitivní bylo vyhodnoceno 50 ze 74 klinických izolátů. Z 50 biofilm-pozitivních izolátů bylo 48 slabě adherentních a 2 izoláty byly středně adherentní. U následující studie Perez *et al.* (2013) bylo jako biofilm pozitivní vyhodnoceno 85 z 91 klinických bakteriálních izolátů. Z toho 51 jako slabě adherentní, 22 jako středně adherentní a 15 jako silně adherentní.

Zubair *et al.* (2011) sledovali tvorbu biofilmu u G- bakterií izolovaných od pacientů trpících syndromem diabetické nohy. Od 57 pacientů bylo získáno 97 G- bakteriálních izolátů, které byly dále detekovány na tvorbu biofilmu. Z celkového počtu 97 izolátů zastupovala 23 izolátů bakterie *Ps. aeruginosa* a z toho bylo 14 izolátů vyhodnoceno jako biofilm-pozitivní.

Malik *et al.* (2013) sledovali tvorbu biofilmu u pacientů se syndromem diabetické nohy. Z 255 izolátů bylo detekováno 40 izolátů jako bakterie *Ps. aeruginosa* a z tohoto počtu bylo 33 izolátů vyhodnoceno jako biofilm-pozitivní.

Lima *et al.* (2017) vyhodnotili produkci biofilmu u 20 klinických izolátů *Ps. aeruginosa* získaných od pacientů s pneumonií, která byla spojena s použitím ventilátorů. Produkce biofilmu byla ověřena pomocí kvalitativní i kvantitativní techniky. Kvalitativní technika s použitím agaru s kongo červení ukázala, že pouze 15 % bakteriálních izolátů mělo schopnost tvořit biofilm. Zatímco druhá, kvantitativní metoda detekce biofilmu pomocí mikrotitračních destiček s BHI se sacharózou a vyhodnocením dle Stepanovic *et al.* (2007) s modifikacemi ukázala, že až 75 % bakteriálních izolátů mělo schopnost tvořit biofilm. Z 20 izolátů 40 % tvořilo biofilm slabě, 25 % tvořilo biofilm mírně a 10 % tvořilo biofilm silně. Rozdíl ve vyhodnocení produkce biofilmu dokazuje, že kvantitativní technika byla účinnější než technika kvalitativní.

Lima *et al.* (2018) provedli studii 40 klinických izolátů *Ps. aeruginosa* metodou mikrotitračních destiček za použití BHI se sacharózou. Ze 40 izolátů bylo 31 vyhodnoceno jako biofilm-pozitivní. Z těchto 31 biofilm-pozitivních izolátů jich 17 produkovalo biofilm slabě, 11 produkovalo biofilm středně a 3 izoláty produkovaly biofilm silně.

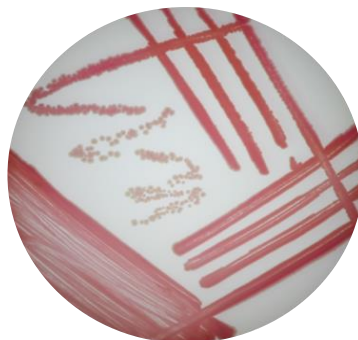
Vatan *et al.* (2018) hodnotili tvorbu biofilmu u pacientů trpících syndromem diabetické nohy. Ze 115 biofilm-pozitivních bakteriálních izolátů tvořila bakterie *Ps. aeruginosa* 52 %.

#### **1.1.5.4 *Serratia marcescens***

G- bakterie *Serratia marcescens* (*Ser. marcescens*), je významným lidským oportunním patogenem. Běžný environmentální výskyt rodu *Serratia* pomáhá vysvětlit velké množství HAI infekcí, způsobené právě touto bakterií. *Ser. marcescens* je patogenem způsobující onemocnění centrálního nervového systému (CNS), převážně meningitidy, dále respirační onemocnění, oční infekce a infekce močových cest, krevního oběhu a také různé typy infekcí ran (Mahlen, 2011). *Ser. marcescens* produkuje červený pigment zvaný prodigiosin. Produkce



tohoto pigmentu je však typická převážně pro enviromentální kmeny *Ser. marcescens*, HAI kmeny pigmentaci často postrádají (Carbonell *et al.*, 2000). Růst bakterie *Ser. marcescens* na MPA včetně pigmentace znázorňuje **obrázek 5**.



**Obrázek 5** – *Serratia marcescens* CCM 303 na MPA (24h, 30°C; foto autor)

Tvorba biofilmu u *Ser. marcescens* zahrnuje řadu definovaných stupňů, zakončené vysoce pórezním, vláknitým biofilmem (Labbate *et al.*, 2004). Systém QS působí u *Ser. marcescens* jako celkový regulátor většiny virulentních faktorů (Bakkiyaraj *et al.*, 2012). Velké množství signalizačních molekul reguluje tvorbu biofilmu ale také pohyblivost bakterie, produkci bisurfaktantu, prodigiosinu nebo nukleázy (Wei *et al.*, 2004). Nemožnost některých kmenů *Ser. marcescens* tvořit biofilmy nebo produkovat pigment prodigiosin a jiné exoenzymy je dána mutanty QS a odráží důležitost systému QS v patogenezi *Ser. marcescens* (Morohoshi *et al.*, 2007).

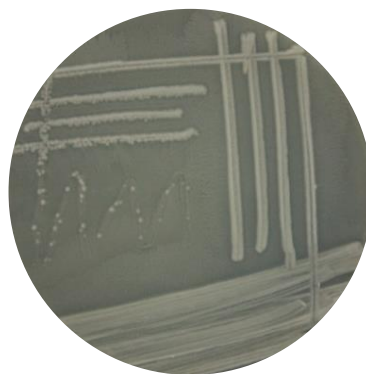
Vatan *et al.* (2018) hodnotili tvorbu biofilmu u pacientů trpících syndromem diabetické nohy pomocí metody mikrotitračních destiček. Z celkem 115 biofilm-pozitivních bakteriálních izolátů tvořila 18 % izolátů bakterie *Ser. marcescens*.

#### **1.1.5.5 *Proteus* spp.**

Bakterie *Proteus* spp. je G- oportunní patogen, nejčastěji způsobující uroinfekce. Mezi virulentní faktory rodu *Proteus* patří např. fimbrie, bičíky, hemolyzin, proteusový toxin aglutinin (Pta) a jiné. Důležitým virulentním faktorem je také schopnost této bakterie tvořit biofilm a to zejména na povrchu močových katetrů (Rózalski *et al.*, 2012). Bakterie *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) produkuje ureasu, která po hydrolýze močoviny na amoniak a oxid uhličitý zvyšuje pH moči a biofilmu. V těchto podmínkách alkalického prostředí

dochází k tvorbě struvitu (fosforečnan hořečnato-amonný) a apatitu (fosforečnan vápenatý), které se následně přichycují k biofilmové matrici a dojde tak k tvorbě krystalického biofilmu který blokuje tok moči v katetru. Zablokování toku moči může následně vést až k pyelonefritidě a urosepsi u pacienta (Morris *et al.*, 1999).

Rod *Proteus* je typický pro fenomén mnohobuněčné diferenciaci „swarming“ (Rausův fenomén). Tento fenomén umožňuje bakteriím koordinovaným způsobem migrovat na pevný povrch a s velkou pravděpodobností těmto bakteriím napomáhá v kolonizaci makroorganismů. Zahrnuje buněčné signalizace a interakce a umožňuje morfologickou diferenciaci bakterií v závislosti na kultivačních médiích. Dimorfní bakterie *Proteus* tvoří v kapalných kultivačních médiích pohyblivé krátké tyčinky s 6-10 bičíky. Při přeočkování na pevná kultivační média se krátké tyčinky změny na polodlouhé, mnohojaderné, rojící tyčinky s velkým počtem bičíků, které migrují z místa inokulace. Po zastavení migrace se delší bakteriální buňky rozpadnou na kratší. Tyto procesy diferenciaci a dediferenciaci jsou u bakterie *Proteus* cyklické a výsledkem je tvorba charakteristického růstu bakterie na pevné kultivační půdě ve tvaru prstenců (Morgenstein *et al.*, 2010). Růst bakterie *Proteus* spp. na MPA znázorňuje **obrázek 6**.



**Obrázek 6** – *Proteus* spp. 75 (izolát z chronické rány) na MPA (24h, 37°C; foto autor)

Zubair *et al.* (2011) detekovali tvorbu biofilmu u G- bakterií izolovaných od pacientů se syndromem diabetické nohy. Z celkového počtu 97 izolátů, tvořila 5 izolátů bakterie *Proteus vulgaris* (*P. vulgaris*), z toho 4 izoláty byly vyhodnoceny jako biofilm-pozitivní.

Majtan *et al.* (2014) studovali biofilm bakterie *P. mirabilis*. Izoláty *P. mirabilis* byly získané z chronických ran a tvorba biofilmu byla sledována metodou mikrotitračních destiček. Biofilm byl spektrofotometricky detekován po 1 denní kultivaci v TSB bujónu při 570 nm.

Optická denzita (OD) po 1 denní kultivaci byla více jak 0,8 a to značí silnou tvorbu biofilmu u bakterie *P. mirabilis*.

Malik *et al.* (2013) detekovali tvorbu biofilmu u pacientů se syndromem diabetické nohy. Z celkového počtu 255 bakteriálních izolátů bylo 9 izolátů tvořeno bakterií *P. vulgaris* a 4 izoláty *P. mirabilis*. Z 9 izolátů *P. vulgaris* bylo 5 vyhodnoceno jako biofilm-pozitivní a ze 4 izolátů *P. mirabilis* byly jako biofilm-pozitivní vyhodnoceny 2 izoláty.

Vatan *et al.* (2018) sledovali tvorbu biofilmu pomocí metody mikrotitračních destiček. Ze 115 biofilm-pozitivních izolátů bylo 25 % tvořeno *Proteus* spp.

## 1.2 SMĚSNÝ BIOFILM

Polymikrobiální forma biofilmu dominuje nad monomikrobiální formou jak v přírodě, tak v lidském organismu (Elias and Banin, 2012). Patogenní bakterie tvořící biofilm mají molekulární mechanismy, díky kterým se snaží do svého prostředí připojit další bakterie a mají tak snahu vytvořit polymikrobiální společenství. Polymikrobiální seskupení biofilmu zřejmě zlepšuje životaschopnost mikrobiálních buněk (Kuramitsu *et al.*, 2007). Tvorbou polymikrobiálního společenství získávají biofilmy řadu výhod, jako je metabolická spolupráce (Elias and Banin, 2012), širší genofond s účinnějším sdílením DNA (Madsen *et al.*, 2012), pasivní rezistenci (Weimer *et al.*, 2011) a další. Čím větší je různorodost biofilmu, tím více je biofilm odolný (Tuttle *et al.*, 2011).

Mezi typické polymikrobiální infekce patří např. infekce močových cest, vaginitida, osteomyelitida, peritonitida, cystická fibróza, pneumonie, otitida, keratitida, rinosinusitida, zubní kaz, stomatitida, popáleniny, ale také infekce spojené se zavedenými lékařskými pomůckami a hlavně chronické infekce, ke kterým se řadí chronické rány (Peters *et al.*, 2012b).

### 1.2.1 Synergismus ve směsném biofilmu

Polymikrobiální interakce, ke kterým dochází ve směsných biofilmech, jsou složité a mohou výrazně ovlivnit průběh infekce. Dva nebo více druhů mikroorganismů mohou například vykazovat synergismus, který následně vyvolá chorobný stav a u jednotlivých druhů nebyl pozorován (Smith *et al.*, 2017). Mikrobiální synergismus může způsobit změnu

virulence jednotlivých druhů mikroorganismů, zpomalit hojení infikovaných ran a také zvýšit rezistenci mikrobiálních druhů k antimikrobiální léčbě (Pastar *et al.*, 2013).

Bakterie se mohou aktivně slučovat s jinými prospěšnými druhy bakterií pomocí několika koagregačních molekulárních mechanismů. Tyto mechanismy představují ve většině případů reverzibilní molekulární vazby, které umožní bakteriím v biofilmu vybrat geneticky odlišné a prospěšné partnery (Rickard *et al.*, 2003).

Bakterie schopné tvořit biofilm obsahují cílově specifické molekuly, které zajišťují monoklonální uspořádání biofilmu (Zhu and Li, 2012). U G- bakterií je signalizační molekulou acyl-homoserinový lakton, G+ bakterie mají jako signalizační molekuly oligopeptidy a k mezidruhové komunikaci slouží jako signalizační molekula autoinduktor-2 (AI-2) (Reading *et al.*, 2005). 4,5-dihydroxy-2,3-pentandion (DPD) neboli AI-2 je malá molekula obsahující bór a je rozpoznávána různými druhy G+ a G- bakterií, včetně anaerobů (Zhu and Li, 2012). AI-2 patří mezi chemické molekuly QS, které jsou schopny u více druhů bakterií upregulovat molekulové dráhy nezbytné pro spolupráci jednotlivých složek uvnitř komunity bakterií polymikrobiálních biofilmů. Přítomnost AI-2 byla prokázána u chronických ran a jiných infekcí (Rickard *et al.*, 2010). Mnoho struktur biofilmu však může zahrnovat více kombinací signálních molekul (Cornforth *et al.*, 2014).

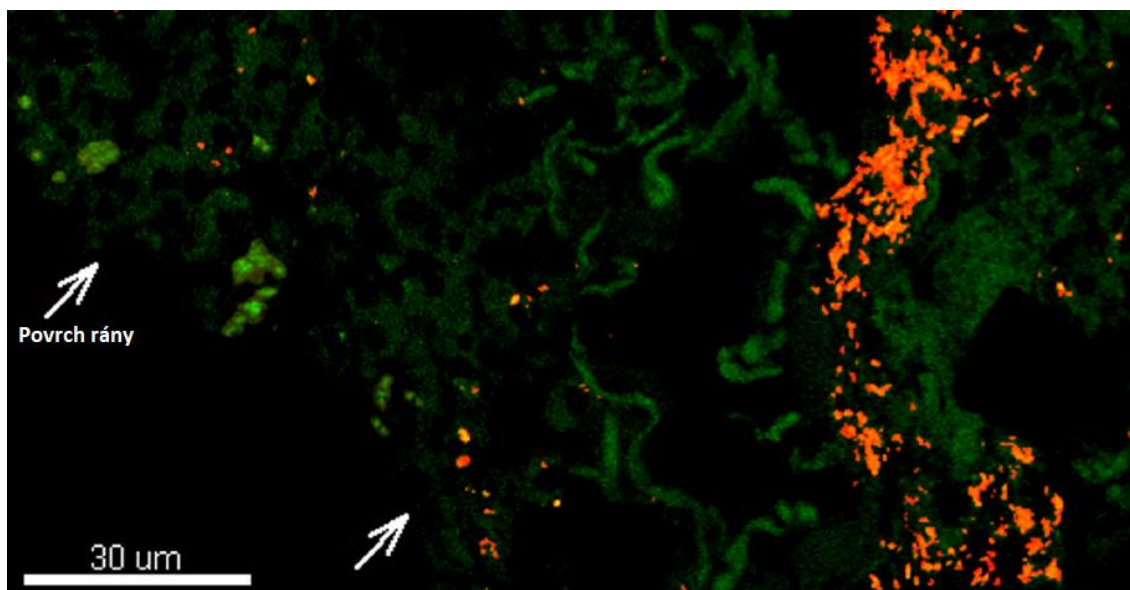
Příkladem chemického synergismu je interakce bakterií *Ps. aeruginosa* a bakterií orofaryngeální flóry. *Ps. aeruginosa* nemůže produkovat AI-2, ale je citlivá a schopná reakce na signál této molekuly. Bakterie orofaryngeální flóry, produkující AI-2, jsou často koinfikujícími bakteriemi u CF plic, kde je nejčastěji zastoupenou patogenní bakterií právě *Ps. aeruginosa*. Studie provedená skupinou Duan *et al.* (2003) prokázala, že synergie orofaryngeální flóry a bakterie *Ps. aeruginosa* vedla ke značnému zvýšení produkce faktorů virulence *Ps. aeruginosa*. Také studie provedená Armbruster *et al.* (2010) ukázala, že AI-2, který je produkován bakterií *Haemophilus influenzae*, ve směsné kultivaci s bakterií *Moraxella catarrhalis* (*M. catarrhalis*) podporuje významně tloušťku biofilmu a zvyšuje tak antibiotickou rezistenci bakterie *M. catarrhalis*.

Bakteriální synergismus může bakteriím poskytnout také zvýšenou odolnost proti imunitnímu systému. Kromě metabolitů a signálních molekul QS jsou bakterie ve směsném biofilmu vystaveny např. antibiotickým látkám, produkovanými některými druhy bakterií. Studie autorů Ramsey and Whiteley (2009) zjistila, že *Streptococcus gordonii* produkuje mimo laktátu také velké množství antimikrobiálního peroxidu vodíku.

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* je proti peroxidu vodíku značně rezistentní, ale také proti němu vykazuje jedinečnou transkripční odpověď, která následně způsobí expresi genu *apiA*. Tento gen se významně podílí na obraně proti lidskému imunitnímu systému.

### **1.2.1.1 Směsný biofilm bakterií *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa***

Chronické rány jsou typicky polymikrobiální a dva nejčastěji izolované mikrobiální druhy jak z chronických, tak z akutních ran jsou *S. aureus* a *Ps. aeruginosa* (Smith *et al.*, 2017). Dominantní teorie popisující koexistenci těchto dvou bakterií předpokládala, že *S. aureus* a *Ps. aeruginosa* zaujmají odlišnou oblast rány a vzájemně spolu neinteragují (Mansito *et al.*, 1987, Kessler *et al.*, 1993). Prostorové uspořádání bakterií *S. aureus* a *Ps. aeruginosa* u chronického žilního vředu dolních končetin pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace s využitím peptidových nukleových kyselin jako sond (PNA-FISH) a konfokální laserové rastovací mikroskopie (CLSM) studovali Fazli *et al.* (2009). Tato studie ukázala, že *Ps. aeruginosa* se nachází v chronické ráně hlouběji než *S. aureus*. Detekci znázorňuje **obrázek 7**. Bakterie *Ps. aeruginosa* je při nepřítomnosti kyslíku schopna anaerobního dýchání pomocí dusičnanů. Tato vlastnost umožňuje této bakterii přežít ve stacionární fázi v hlubších částech struktury biofilmu, kde je mimo jiné chráněna před účinky různých antimikrobiálních látek (Colvin *et al.*, 2012). V polymikrobiálním biofilmu v laboratorních podmínkách je bakterie *Ps. aeruginosa* schopna usmrtit bakterii *S. aureus* a nelze tedy za normálních podmínek stabilně kultivovat tyto bakterie souběžně. *Ps. aeruginosa* produkuje mnoho látek, které inhibují růst *S. aureus* (Smith *et al.*, 2017). Mezi tyto látky patří proteáza LasA (Mansito *et al.*, 1987, Kessler *et al.*, 1993), 4-hydroxy-2-heptylchilonin-N-oxid (Hoffman *et al.*, 2006), Pel a Psl polysacharidy (Qin *et al.*, 2009) a fenaziny jako je pyocyanin (Dietrich *et al.*, 2006).



**Obrázek 7** – Zobrazení *S. aureus* a *Ps. aeruginosa* v biofilmu chronické rány pomocí CLSM (upraveno dle Fazli *et al.*, 2009)

**Pozn.:** vizualizováno pomocí PNA-FISH, *S. aureus* (zelená) a *Ps. aeruginosa* (červená)

Pastar *et al.* (2013) studovali interakce mezi MRSA a *Ps. aeruginosa* na modelu prasečí kůže. Ukázalo se, že rány kontaminované směsí bakterií, které tvořily polymikrobiální biofilm vykazovaly horší hojení než rány kontaminované jednotlivými bakteriemi tvořící monomikrobiálními biofilmy. U ran obsahující pouze monomikrobiální biofilm došlo k výrazně rychlejší reepitelizaci. Dále se ukázalo, že prostředí prasečí kůže umožňuje koexistenci obou druhů *in vitro* na rozdíl od předešlých studií, kdy docházelo k inhibici *S. aureus* bakterií *Ps. aeruginosa*. Dále jejich studie ukázala vzájemný synergismus, jelikož došlo k výraznému zvýšení exprese virulentních faktorů MRSA vlivem přítomnosti bakterie *Ps. aeruginosa*.

Smith *et al.* (2017) studovali schopnost složek, nacházejících se v ranách, modulaci interakcí mezi *S. aureus* a *Ps. aeruginosa*. V této studii bylo prokázáno, že fyziologické hladiny sérového albuminu inhibují QS bakterie *Ps. aeruginosa* tím, že se váže na některé signální molekuly jako je homoserinový lakton. Tato inhibice vede k nemožnosti *Ps. aeruginosa* produkovat faktory virulence, které by jinak měly inhibiční účinek na růst *S. aureus*. Je tedy možné obě bakterie dohromady stabilně kultivovat *in vitro* a to pouze za použití kultivačního média, které je obohaceno o složky, poskytující bakteriím podobné prostředí jako se nachází v chronické ráně.

Hostitelské faktory ran podstatně podporují jedinečnou ekologii biofilmu a v rání přítomný albumin podporuje souběžnou kolonizaci těchto dvou druhů bakterií a zabraňuje usmrcení bakterie *S. aureus*. Tato smíšená kolonizace také zvyšuje rezistenci k některým antibiotikům (DeLeon *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2017).

Radlinski *et al.* (2017) prokázali, že přítomnost kmene *Ps. aeruginosa*, produkující *LasA* endopeptidázu nebo rhamnolipidy, zvyšuje citlivost bakterie *S. aureus* na vankomycin a tobramycin. Produkce těchto faktorů je závislá na genotypu kmene *Ps. aeruginosa*. Proto se citlivost *S. aureus* k terapii může během léčby měnit a to v závislosti na genotypu *Ps. aeruginosa*, který koexistuje v infikované tkáni.

Alves *et al.* (2018) testovali interakce mezi *Ps. aeruginosa* a *S. aureus* ve smíšeném biofilmu a pozorovali, že bakterie *S. aureus* zvyšuje schopnost připojení bakterie *Ps. aeruginosa*. Skupina jako první zjistila a popsala, že *S. aureus* výrazně zesiluje vazbu *Ps. aeruginosa* také na lidské keratinocyty a také to, že bakterie *Ps. aeruginosa* podporuje invazivní růst bakterie *S. aureus*. Vzájemné interakce mezi těmito dvěma bakteriemi jsou tedy přínosem pro patogenitu a kolonizaci v polymikrobiálním biofilmu.

### **1.2.1.2 Smíšený biofilm bakterií *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans***

Infekce způsobené polymikrobiálními biofilmy, zejména biofilmy zahrnující kvasinky i bakterie jsou spojené s velkou úmrtností a tyto infekce jsou často velice náročné na terapii. Bakterie *S. aureus* a kvasinka *Candida albicans* (*C. albicans*) jsou zařazovány mezi hlavní oportunní patogenní mikroorganismy díky jejich schopnosti dobře tvořit biofilm na lékařských zařízeních a katetrech. *S. aureus* je třetím nejčastějším izolovaným mikroorganismem společně s *C. albicans* (Kong *et al.*, 2016).

*In vitro* studie Peters *et al.* (2012a) prokázala vysokou afinitu *S. aureus* k vláknité formě *C. albicans*. Důsledkem této afinity dochází k vzájemné koadheraci a k synergickým interakcím v biofilmu. Specifický adhezín *Als3p* pro vláknité formy *C. albicans* byl prokázán jako jedna z hlavních složek podílejících se na této specifické koadhezi.

Kong *et al.* (2016) zjistili, že bakterie *S. aureus* prokazuje zvýšenou rezistenci k ATB, pokud je v přítomnosti této bakterie také kvasinka *C. albicans*. Fluorescenční mikroskopie prokázala zhoršení difúze léčiva přes biofilmovou matici u polymikrobiálního biofilmu.

Klíčový polysacharid biofilmové matrice, poskytující bakteriím zvýšenou rezistenci vůči ATB je beta-1,3 glukán, vylučovaný *C. albicans*.

### **1.2.1.3 Směsný biofilm bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterococcus faecalis***

*Ps. aeruginosa* a *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) patří do dvou rozdílných skupin G- a G+ bakterií, ale obě bakterie mají mnoho podobných vlastností. Jsou často původci biofilmových infekcí podobných oblastí lidského těla jako jsou močové cesty nebo chronické rány. Korgaonkar and Whiteley (2011) prokázali, že peptidoglykanové molekuly G+ bakterií mohou sloužit jako signál pro zvýšení exprese faktorů virulence bakterie *Ps. aeruginosa*, a také ke zvýšení exprese antimikrobiálních látek poškozujících hostitelskou tkáň.

Studie Lee *et al.* (2017) prokázala, že polymikrobiální biofilm *Ps. aeruginosa* a *E. faecalis* vykazoval zvýšenou tloušťku biofilmové matrice a docházelo ke zvýšené tvorbě biofilmu v porovnání s monomikrobiálními biofilmy těchto bakterií. Studie naznačuje, že zvýšená tloušťka biofilmové matrice je částečně důsledkem produkce Pel a Psl exopolysacharidů bakterie *Ps. aeruginosa*. Dále mají obě bakterie zřetelné prostorové uspořádání uvnitř polymikrobiálního biofilmu. Zatímco *E. faecalis* se nachází na dně biofilmu, *Ps. aeruginosa* tvoří více strukturovaný biofilm v horní části polymikrobiálního biofilmu. Tato zjištění potvrzují, že tyto dvě bakterie jsou schopny vzájemné interakce a mají synergické účinky na vývoj biofilmu.

Tsuchimori *et al.* (1994) provedl studii infekce močových cest u myší, která byla způsobená současným naočkováním bakterií *Ps. aeruginosa* a *E. faecalis* do močového měchýře myší. Polymikrobiální infekce se projevila mnohem dříve než infekce způsobená jednotlivými bakteriemi zvláště a také byla více odolná vůči léčbě ATB. Tato studie naznačila, že u polymikrobiální infekce močových cest bakterie *E. faecalis* nejprve pronikne do dřeně ledvin a vyvolá histologické změny ledviny, které následně vedou ke zhoršené pyelonefritidě, způsobené bakterií *Ps. aeruginosa*.

### **1.2.2 Antagonismus ve směsném biofilmu**

U směsných biofilmů byly pozorovány i antagonistické interakce, kdy omezené množství prostoru a živin vedlo ke konkurenci mezi mikroorganismy. Tento děj byl popsán např. mezi



*Ps. aeruginosa* a *C. albicans* nebo *Pseudomonas* spp. a *Agrobacterium* spp. (McAlester *et al.*, 2008).

### **1.2.2.1 Směsný biofilm bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans***

Přítomnost patogenní bakterie *Ps. aeruginosa* v plicích je hlavní příčinou úmrtnosti pacientu s CF. Společně s *Ps. aeruginosa* se zde může vyskytovat i *C. albicans* (McAlester *et al.*, 2008). Určité kmeny *Ps. aeruginosa* vykazují toxicitu pro *C. albicans*, která se nachází ve vláknité formě, ale na kvasinkovou formu *C. albicans* nemá *Ps. aeruginosa* žádný toxický vliv. Také bylo popsáno, že strukturní signální molekula QS N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserin lakton (3-oxo-C<sub>12</sub>HSL), produkovaná *Ps. aeruginosa*, ovlivňuje morfologii *C. albicans* (Hogan and Kolter 2002) a naopak metabolit farnesol produkovaný *C. albicans* snižuje hladiny faktoru virulence pyocyaninu *Ps. aeruginosa* (Cugini *et al.*, 2007).

Provedená klinická studie izolátu z plic pacientů s CF skupinou McAlester *et al.* (2008) zjistila, že přestože některé klinické kmeny ovlivnily morfologii *C. albicans*, u jiných kmenů k ovlivnění nedošlo. Schopnost ovlivnění morfologie úzce korelovala s množstvím 3-oxo-C<sub>12</sub>HSL. Toto zjištění je důležité hlavně z hlediska fáze onemocnění. Během akutní fáze onemocnění *Ps. aeruginosa* vylučuje vysoké hladiny HSL a všechny formy *C. albicans* zůstávají ve formě kvasinek. Při přechodu do chronické fáze onemocnění dochází k poklesu hladin HSL a následnému přechodu morfologie *C. albicans* do vláknité formy, která vede i ke změně morfologie biofilmu. Vzniká houbovité biofilm, který má potenciál pro invazivní růst. Molekula farnesolu produkovaná *C. albicans* způsobuje inhibici rotační mobility *Ps. aeruginosa*, ale nemá žádný účinek na adhezaci a růst *Ps. aeruginosa*.

Podobná studie byla provedena skupinou Morales *et al.* (2013) kteří zjistili, že zatímco milimolární koncentrace fenazinu mají na *C. albicans* toxický vliv, tak nižší koncentrace kteréhokoliv ze tří druhů fenazinu - pyocyaninu, fenazin-methosulfátu a fenazin-1 karboxylátu neinhibuje růst *C. albicans*. Přesto i nízké koncentrace fenazinu ovlivní tvorbu biofilmu *C. albicans* a to tím, že inhibují její přechod z kvasinkové do vláknité formy.

### **1.2.2.2 Směsný biofilm bakterií *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis***

Lidské komenzální bakterie jsou důležité pro svoji schopnost inhibovat kolonizaci patogenními bakteriemi. Studie provedená skupinou Iwase *et al.* (2010) ukázala, že serinová proteáza *Esp 2,3*, která je produkována bakterií *S. epidermidis*, je schopná inhibovat tvorbu biofilmů *S. aureus* a poškozovat již vzniklé biofilmy. Dále v přítomnosti proteázy dochází ke zvýšení citlivosti na složky imunitního systému. Přítomnost *S. epidermidis*, který vylučuje proteázu *Esp 2,3* v nosních dutinách, koreluje s nepřítomností bakterie *S. aureus*.

### **1.2.2.3 Směsný biofilm bakterií *Staphylococcus epidermidis* a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

Bakterie *S. epidermidis* má schopnost vytvářet biofilmy, které přilnou na plastických površích, hlavně díky schopnosti produkce extracelulárního slizu. Kaplan *et al.* (2004) studovali vlivy enzymů produkováných patogenní bakterií *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na biofilm *S. epidermidis*. Enzym disperzin B, který produkuje bakterie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, degraduje extracelulární polysacharid obsahující N-acetylglukosamin. Protože extracelulární sliz *S. epidermidis* obsahuje N-acetylglusaminové zbytky, enzym disperzin B způsobil odštěpení biofilmu z plastových povrchů u klinických kmenů *S. epidermidis*. Enzym byl účinný ve fyziologických koncentracích a zabraňoval tvorbě biofilmu na biomateriálech. Protože *S. epidermidis* a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* kolonizují rozdílné části lidského těla, není bakterie *S. epidermidis* přirozeným cílem pro disperzin B a tyto bakterie nejsou přirozenými antagonisty. Disperzin B může být ale použit jako prostředek léčby nebo prevence u infekcí katetrů a jiných zdravotnických prostředků způsobených kolonizací a tvorbou biofilmu *S. epidermidis*.

## 1.3 CHRONICKÉ RÁNY

Většinu chronických ran lze rozdělit na tři hlavní skupiny a to na diabetické vředy, tepenné vředy a žilní vředy (Mustoe *et al.*, 2006). **Obrázek 8** znázorňuje chronický diabetický vřed dolní končetiny. Chronické rány se vyznačují dlouhou dobou léčení (>4 týdny) a jejich charakterizací je dlouhotrvající zánět, snížená neovaskularizace a opožděná reepitelizace. Mezi rizikovou skupinu patří jedinci trpící onemocněním diabetes mellitus (DM) nebo ischemickou chorobou dolních končetin (Frank *et al.*, 2009). Chronický diabetický vřed dolních končetin postihuje alespoň jednou za život až 25 % jedinců trpících onemocněním DM (Rahim *et al.*, 2017). Chronické rány jsou často lokalizované na končetinách, kde jsou způsobené žilní nedostatečností či vaskulitidou, které mají vliv jak na náchylnost k infekcím tak i na samotné hojení ran (Frank *et al.*, 2009).



**Obrázek 8** - Chronický diabetický vřed dolní končetiny (upraveno dle <https://www.podiatrytoday.com/can-probiotics-facilitate-healing-diabetic-foot-ulcers/>); [cit. 2018-10-25]

### 1.3.1 Mikroorganismy v chronických ranách

Chronické rány jsou kromě typických patogenních mikroorganismů často kontaminovány a kolonizovány také nízkou koncentrací mikroorganismů, které se fyziologicky nacházejí na kůži nebo jiných částech lidského těla. Mezi tyto mikroorganismy se řadí *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp. a koliformní bakterie.

Za určitých okolností může koncentrace těchto bakterií kolonizující prostředí rány přesáhnout fyziologické množství a podílet se na vzniku infekce chronických ran (Frank *et al.*, 2009).

Gjodsbol *et al.* (2006) zjišťovali mikrobiální rozmanitost u chronických žilních vředů dolních končetin. U všech sledovaných pacientů byl zjištěn výskyt více než jednoho bakteriálního druhu a nejčastěji detekovanou bakterií byla bakterie *S. aureus* (93,5 %), dále *E. faecalis* (71,7 %), *Ps. aeruginosa* (v 52,2 %), koaguláza negativní stafylokoky (45,7 %), *Proteus spp.*, (41,3 %) a anaerobní bakterie (39,1 %). Chronické vředy s přítomností bakterie *Ps. aeruginosa* byly významně rozsáhlejší než vředy bez přítomnosti *Ps. aeruginosa*. Mezi zástupce anaerobních bakterií v chronických ranách se řadí např. *Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.* (Bader, 2008).

Rhoads *et al.* (2012) provedli molekulární identifikaci bakterií ze 168 vzorků chronických ran, kterou následně porovnali s metodou kultivační. Zatímco kultivačními metodami se podařilo identifikovat 17 bakteriálních druhů, molekulární identifikace prokázala 338 bakteriálních druhů. Za použití obou diagnostických metod byl nejčastěji izolovaným mikroorganismem *S. aureus*. **Tabulka 2** zobrazuje přehled chronických ran a 5 nejčastěji izolovaných bakterií v této studii.

Ve studii Pugazhendhi and Dorairaj (2018), která se zabývala bakteriální prevalencí u pacientů s diabetickou nohou, byl převládající izolovaný G+ mikroorganismus *S. aureus* (35 %), následovaný *Staphylococcus saprophyticus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *Micrococcus luteus* a *Streptococcus pneumoniae*. Nejčastější izolovaný G- mikroorganismus byl *Ps. aeruginosa* (25 %), dále *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Paratyphi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Shigella sonnei*, *Plesiomonas shigelloides* a *P. vulgaris*. Výsledky této studie také naznačily, že čím rozsáhlejší je velikost vředu, tím větší je pravděpodobnost přítomnosti biofilmu. 43 % klinických izolátů patřilo mezi silné producenty biofilmu, 26 % mezi mírné producenty biofilmu, 16 % izolátů mezi slabé producenty biofilmu a 15 % izolátů netvořilo biofilm vůbec.

**Tabulka 2 - Přehled bakteriálních kmenů izolovaných z chronických ran kulturační a molekulární metodou (upraveno Rhoads *et al.*, 2012)**

Typ rány	Počet vzorků	Kultivační metoda	Molekulární metoda
Dekubitus	24	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Corynebacterium</i> spp.
		<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Peptoniphilus</i> spp.*
		<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.
		<i>Serratia</i> spp.	<i>Anaerococcus</i> spp.*
		<i>Proteus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.*
Syndrom diabetické nohy	40	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Anaerococcus</i> spp.*
		<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Peptoniphilus</i> spp.*
		<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Corynebacterium</i> spp.
		<i>Serratia</i> spp.	<i>Finegoldia</i> spp.*
		<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.
Chirurgická rána	23	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Corynebacterium</i> spp.
		<i>Serratia</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.
		<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.*
			<i>Prevotella</i> spp.
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Serratia</i> spp.		
Bércový vřed	49	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Corynebacterium</i> spp.
			<i>Staphylococcus</i> spp.
		<i>Serratia</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.*
		<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Prevotella</i> spp.
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Peptoniphilus</i> spp.*		
Zranění/Absces	32	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.
			<i>Prevotella</i> spp.
		<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.*
		<i>Serratia</i> spp.	<i>Peptoniphilus</i> spp.*
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Corynebacterium</i> spp.		

**Pozn.:** Anaerobní bakterie u molekulární metody detekce jsou označeny (\*), u kulturační metody nebyly anaerobní bakterie detekovány

### 1.3.2 Biofilm v chronických ranách

Přestože se chronické rány často nenachází v plně anaerobním prostředí, symbióza anaerobních a aerobních bakterií v procesu koagregace umožňuje anaerobním bakteriím přežít v prostředí kyslíku. Biofilm v chronických ranách poskytuje anaerobům výhodné prostředí, jelikož ve vnitřní části biofilmu je anaerobní prostředí (Gontcharova *et al.*, 2010). U neléčených chronických ran je prevalence biofilmu až 78,2 % (Malone *et al.*, 2017).

Westgate *et al.* (2011) popsali přítomnost bakteriálního biofilmu v chronických ranách u koní. Chronické rány jsou u člověka a koní považovány za patologicky podobné. Tvorba biofilmu v Mueller-Hinton bujónu (MHB) byla detekována pomocí metody mikrotitračních destiček po obarvení krystalovou violetí a absorbance byla měřena spektrofotometricky při 570 nm. Nejběžnějšími bakteriemi izolovanými z chronických ran byly bakterie *Staphylococcus* spp. a *Ps. aeruginosa*. Dále byly detekovány bakterie *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp., *Salmonella* spp., *Alcaligenes* spp., *Propionibacterium* spp., *Bordetella* spp., *Moraxella* spp. a další. Skupina dále rozdělila izolované bakterie dle schopnosti tvořit biofilm. Bakterie *Pseudomonas* spp. a *Proteus* spp. vykazovaly silnou adhezenci (OD > 0,4), *Bacillus* spp. a *Aerococcus* spp. vykazovaly střední adhezenci (OD mezi 0,2 a 0,4). Nejvyšší adhezenci vykazoval rod *Moraxella* spp. (OD = 2,17 ± 1,33).

Sánchez *et al.* (2013) sledovali schopnost klinických izolátů vytvářet biofilm pomocí metody v mikrotitračních destičkách. Z celkového počtu 250 izolátů bylo 61,4 % schopno tvořit biofilm stejně nebo více než kontrolní kmen *S. epidermidis*. Z 23 testovaných izolátů bakterie *S. aureus* bylo 21 (91 %) kmenů vyhodnoceno jako biofilm-pozitivní, u bakterie *Klebsiella pneumoniae* bylo z 54 izolátů bylo vyhodnoceno 41 (76 %) jako biofilm-pozitivní, u *Ps. aeruginosa* bylo z 36 izolátů 30 (83 %) vyhodnoceno jako biofilm-pozitivní a u *Acinetobacter baumannii* bylo vyhodnoceno jako biofilm-pozitivní 29 (55 %) z 53 klinických izolátů.

Mottola *et al.* (2016) sledovali vliv polymikrobiálních společenstev na tvorbu biofilmu v mikrotitračních destičkách pomocí FISH. Tvorbu biofilmu hodnotili po 1 denní, 2 denní a 3 denní kultivaci u 95 klinických izolátů získaných od pacientů s chronickým diabetickým vředem dolních končetin. Tvorba biofilmu u jednotlivých druhů bakterií byla pozitivní už po 24 hodinách a s delší kultivační dobou se zvyšovalo také množství tvořeného biofilmu. Největší produkce biofilmu byla zaznamenána u *Pseudomonas* spp., poté *Corynebacterium* spp., *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp. a nejméně *Enterococcus* spp..

Oproti monomikrobiálnímu biofilmu byla zaznamenána zvýšená tvorba u polymikrobiálního biofilmu. Směs mikroorganismů *Pseudomonas* spp. a *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp. a *Staphylococcus* spp., *Acinetobacter* spp. a *Staphylococcus* spp. tvořila biofilm výrazněji než směs mikroorganismů *E. faecalis* a *Staphylococcus* spp. nebo *E. faecalis* a *Corynebacterium* spp.. U monomikrobiálních biofilmů dochází k dřívějšímu vyčerpání živin a to může být jeden z důvodů vyšší produktivity biofilmu u polymikrobiálních společenstev (Burmolle *et al.*, 2006).

Vatan *et al.* (2018) sledovali tvorbu biofilmu v TSB u vzorků od 165 pacientů se syndromem diabetické nohy. Tvorbu biofilmu detekovali pomocí modifikované metody v mikrotitračních destičkách. Celkem bylo izolováno 339 bakteriálních izolátů a 34 % těchto izolátů bylo vyhodnoceno jako biofilm-pozitivní. U G- bakterií byla rychlost tvorby a množství biofilmu výrazně vyšší než u G+ bakterií. Nejsilnější schopnost produkce biofilmu měla bakterie *Acinetobacter baumannii* (62 %), dále *Ps. aeruginosa* (52 %) a *Klebsiella* spp. (40 %). Z celkového počtu izolátů bylo 32 % monomikrobiálních a 68 % polymikrobiálních a v tvorbě biofilmu nebyl mezi monomikrobiálními a polymikrobiálními infekcemi žádný výrazný rozdíl. V této studii je dále uvedeno, že tvorba biofilmu u bakterie *S. aureus* narůstá s dobou kultivace a po 2 denní kultivaci je množství biofilmu výrazně vyšší než po 1 denní kultivaci. Tvorba biofilmu u *Ps. aeruginosa* naopak nebyla ovlivněna prodloužením kultivační doby.

## 2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo otestovat tvorbu monomikrobiálního biofilmu u klinických kmenů, získaných z izolátů chronických ran a u sbírkových kmenů. Pro sledování tvorby biofilmu byla použita Christensenova metoda a výsledky byly porovnány.

Dalším cílem bylo pokusit se pomocí spektrofotometrické metody stanovit tvorbu polymikrobiálního biofilmu.

Na závěr byly všechny testované kmeny na základě získaných hodnot rozděleny do čtyř skupin dle schopnosti tvořit biofilm a získané výsledky byly porovnány s dostupnou literaturou.



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 POUŽITÉ KMENY MIKROORGANISMŮ

#### 3.1.1 Bakteriální kmeny izolované z chronických ran

Na testování tvorby biofilmu byly použity klinické bakteriální kmeny *Moraxella osloensis*, *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus piscifermentans*. Všechny klinické kmeny, získané ve spolupráci s Fakultní nemocnicí v Hradci Králové, byly izolované ze stěrů z chronických ran. Seznam všech testovaných klinických kmenů včetně místa stěru znázorňuje **tabulka 3**.

#### 3.1.2 Sbírkové bakteriální kmeny

K testování tvorby biofilmu byly použity také sbírkové kmeny bakterií *Proteus* spp. CCM 1799, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960, *Pseudomonas putida* CCM 3423, *Serratia marcescens* CCM 303, *Staphylococcus aureus* CCM 4223, *Staphylococcus aureus* CCM 3953. Tyto kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

**Tabulka 3 – Přehled testovaných klinických kmenů**

Bakteriální kmen	Místo stěru	Datum odběru	Léčba
<i>Moraxella osloensis</i> 93B	–	22. 1. 2018	Sorelex
<i>Proteus</i> spp. 93	–	22. 1. 2018	Sorelex
<i>Proteus</i> spp. 88	LDK	15. 1. 2018	Wound gel, Bactigras
<i>Proteus</i> spp. 87	PDK	15. 1. 2018	Prontosan W., Bactigras
<i>Proteus</i> spp. 80	PDK	11. 12. 2017	Silvercel
<i>Proteus</i> spp. 76	LDK	27. 11. 2017	Braunol
<i>Proteus</i> spp. 75	PDK	27. 11. 2017	Hcel
<i>Proteus</i> spp. 68B	PDK	13. 11. 2017	Protosan gel, Braunovidon
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 93C	–	22. 1. 2018	Sorelex
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 91A	LDK	15. 1. 2018	Biatain Ag
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 87A	PDK	15. 1. 2018	Prontosan W., Bactigras
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 82A	LDK	11. 12. 2017	Prontosan W. gel
<i>Pseudomonas monteilii</i> 82B	LDK	11. 12. 2017	Prontosan W. gel
<i>Pseudomonas putida</i> 80B	PDK	11. 12. 2017	Silvercel
<i>Serratia marcescens</i> 93A	–	22. 1. 2018	Sorelex
<i>Serratia marcescens</i> 93D	–	22. 1. 2018	Sorelex
<i>Serratia marcescens</i> 92C	PDK	22. 1. 2018	Hcel
<i>Serratia marcescens</i> 78B	LDK	27. 11. 2017	Braunovidol
<i>Staphylococcus aureus</i> 94A	–	22. 1. 2017	Silvercel non adher.
<i>Staphylococcus piscifermentans</i> 90A	PDK	15. 1. 2018	Allewyn life

**Pozn.:** LDK: levá dolní končetina, PDK: pravá dolní končetina, –: blíže neurčeno

## 3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, POMŮCKY, ŽIVNÁ MÉDIA A PRACOVNÍ ROZTOKY

### 3.2.1 Přístroje

Analytické váhy BBC32	(BOECO, Německo)
Autokláv PS 20A	(BMT, Česká republika)
BACMED	(ASPIAG s.r.o., Česká republika)
Horkovzdušný sterilizátor Sterimat 5104	(BMT, Česká republika)
Chladnička K4220	(Liebherr, Německo)
McFarland denzitometr DEN-1	(Biosan, Litva)
Počítačka bakteriálních kolonií LKB 2002	(POL-EKO, Polsko)
Spektrofotometr TECAN Infine M 200	(Tecan Trading AG, Švýcarsko)
Termostat ST 1/B/40 Basic	(POL-EKO, Polsko)
Třepačka Reax Top Test Tube	(Heidolph, Německo)

### 3.2.2 Pomůcky

Automatické pipety DISCOVERY comfort	(Discovery, Německo)
Automatické pipety	(Thermo specific, Finsko)
Běžné laboratorní sklo	
Kahan	
Pryžové a plastové pomůcky	
Polyethylenové mikrotitrační destičky, 96 jamkové	(SPL, Korea)

### 3.2.3 Živná média a pracovní roztoky

#### ***Baird Parker agar (Baird Parker agar base):***

##### ***výrobce:***

-HiMedia, Indie

##### ***složení:***

enzymatický hydrolyzát kaseinu	10 g
hovězí extrakt	5 g
kvasniční extrakt	1 g
glycin	12 g

pyrohroznán sodný	10 g
chlorid lithný	5 g
agar	20 g

**příprava:**

v 950 ml destilované vody bylo rozpuštěno 63g dehydratovaného média a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po zchladnutí na 45 – 50 °C bylo asepticky přidáno 50 ml žloutkové emulze s teluricitanem draselným (FD 046 Egg Yolk Tellurite Emulsion). Před nalitím na Petriho misky byl roztok důkladně promíchán a po ztuhnutí byla kultivační půda uchovávána v chladničce při 4 °C.

**BHI bujón (Brain Heart Infusion Broth)**

**výrobce:**

-HiMedia, Indie

**složení:**

telecí mozková infúze (sušina)	12,5 g
infúze z hovězího srdce (sušina)	5 g
masový pepton	10 g
chlorid sodný	5 g
hydrogenfosforečnan (di)sodný	2,5 g
dextróza	2 g

**příprava:**

v 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 37 g dehydratovaného bujónu a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po zchladnutí na laboratorní teplotu byl BHI bujón uchováván v chladničce při 4 °C.

**BHI bujón s 2 % glukózy a 2 % sacharózy**

**složení:**

dehydratovaný bujón BHI	37 g
glukóza	0,74 g
sacharóza	0,74 g

**příprava:**

v 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 37 g dehydratovaného bujónu, 0,74 g glukózy, 0,74 g sacharózy a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po

zchladnutí na laboratorní teplotu byl BHI bujón s 2 % glukózy a 2 % sacharózy uchováván v chladničce při 4 °C.

### ***Fyziologický roztok***

#### ***složení:***

chlorid sodný	8,5 g
---------------	-------

#### ***příprava:***

v 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 8,5 g chloridu sodného a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po zchladnutí na laboratorní teplotu byl fyziologický roztok uchováván v chladničce při 4 °C.

### ***Krevní agar (Blood Agar Base No. 2)***

#### ***výrobce:***

-HiMedia, Indie

#### ***složení:***

proteosový pepton	15 g
játrový extrakt	2,5 g
kvasničný extrakt	5 g
chlorid sodný	5 g
agar	15 g
sterilní defibrinovaná beranní krev	5 %

#### ***příprava:***

v 500 ml destilované vody bylo rozpuštěno 21,25 g dehydratovaného média a směs byla zahřána až do úplného rozpuštění. Následně byl roztok sterilizován v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut. Po ochlazení roztoku na 40-50 °C bylo asepticky přidáno 5 % sterilní defibrinované beranní krve. Před nalitím na Petriho misky byl roztok důkladně promíchán a po ztuhnutí se krevní agar uchovával v chladničce při 4°C.

### ***Krystalová violet'***

#### ***složení:***

roztok A: krystalová violet'	10 g
96% ethanol	400 ml

roztok B: 1% oxalát amonný

1600 ml

***příprava:***

bylo připraveno 400 ml roztoku A a 1600 ml roztoku B. Obě nádoby byly ponechány 24 hodin při pokojové teplotě a následně byly roztoky smíseny dohromady. Vzniklá směs byla přefiltrována a uchovávána při laboratorní teplotě.

***MPA agar (Nutrient Agar No. 2)***

***výrobce:***

-Himedia, Indie

***složení:***

hovězí extrakt	10 g
masový pepton	10 g
chlorid sodný	5 g
agar	15 g

***příprava:***

v 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 40 g dehydratovaného média a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po zchladnutí na laboratorní teplotu byl roztok rozlíván se na Petriho misky a po ztuhnutí byl MPA agar uchováván v chladničce při 4 °C.

***TSB bujón (Soyabean Casein Digest Medium w/o Dextrose)***

***výrobce:***

-Himedia, Indie

***složení:***

enzymatický hydrolyzát kaseinu	17 g
sojový pepton	3 g
chlorid sodný	5 g
hydrogenfosforečnan draselný	2,5 g

***příprava:***

v 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 27,5 g dehydratovaného bujónu a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po zchladnutí na laboratorní teplotu byl sterilní roztok uchováván v chladničce při 4 °C.

### **TSB bujón s 1 % glukózy**

#### **složení:**

dehydratovaný TSB bujón	27,5 g
glukóza	0,275 g

#### **příprava:**

v 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 27,5 g dehydratovaného bujónu a přidáno 0,275 g glukózy. Takto připravený roztok byl sterilizován při 121 °C po dobu 15 minut a po vychladnutí na laboratorní teplotu byl roztok uchováván v chladničce při 4 °C.

## **3.3 PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍ SUSPENZE A OVĚŘENÍ DENZITY BUNĚK**

Před začátkem testování každého bakteriálního kmene byla ve fyziologickém roztoku připravena bakteriální suspenze, která odpovídala 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice a koncentraci  $10^8$  CFU/ml. Pouze pro bakterii *Moraxella osloensis* (*M. osloensis*) se připravila suspenze odpovídající 1,5 McFarlandovy zákalové stupnice. Denzita připravených suspenzí byla proměřena pomocí denzitometru. Pro přípravu mikrobiálních suspenzí byla použita 24 hodinová bakteriální kultura kultivovaná při 37°C za aerobních podmínek. Pro kultivaci bakterií *S. aureus* a *Staphylococcus piscifermentans* (*S. piscifermentans*) byl použit KA, pro ostatní testované mikroorganismy MPA.

Výchozí denzita připravené suspenze byla po naředění a následné kultivaci ověřena také stanovením hodnoty CFU/ml. Suspenze byla naředěna pomocí desítkového ředění až na koncentraci  $10^3$  CFU/ml a po 100  $\mu$ l vyočkována na příslušné půdy, roztěrem L-hokejkou vždy v dubletu. Po 24 hodinové aerobní inkubaci při 37 °C byl stanoven počet narostlých kolonií.

## 3.4 DETEKCE MIKROBIÁLNÍHO BIOFILMU CHRISTENSENOVOU METODOU V MIKROTITRAČNÍCH DESTIČKÁCH

### 3.4.1 Detekce monomikrobiálního biofilmu

Tvorba monomikrobiálního biofilmu byla sledována modifikovanou Christensenovou metodou v mikrotitračních destičkách. U všech uvedených klinických i sbírkových bakteriálních kmenů byla sledována schopnost tvorby biofilmu po 1 a 2 denní kultivaci postupně ve 4 rozdílných kultivačních médiích a to v BHI bujónu, BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, TSB bujónu a TSB bujónu s 1 % glukózy.

Sterilní 96 jamková mikrotitrační destička byla promyta 96% ethanolem a ponechána při laboratorní teplotě do vyschnutí. Do každé jamky bylo napipetováno 180  $\mu$ l kultivačního média a 20  $\mu$ l suspenze testované bakterie z 24 hodinové bakteriální suspenze. Tato suspenze odpovídala 1,5 McFarlandovy zákalové stupnice u bakterie *M. osloensis* a 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice u ostatních testovaných bakterií. U každé testované bakterie v každém testovaném médiu byla souběžně provedena negativní kontrola, která představovala čisté médium bez zaočkovaných bakterií. Před samotnou kultivací byla mikrotitrační destička spektrofotometricky proměřena při 595 nm. Poté byla zakrytá mikrotitrační destička kvůli zábraně vyschnutí vložena do plastového sáčku a kultivována aerobně při 37 °C 1 nebo 2 dny. Z použitých bakteriálních suspenzí bylo provedeno ověření denzity, viz výše uvedený postup. Po 1 denní nebo 2 denní kultivaci, v závislosti na zvolené délce testování tvorby biofilmu, byla mikrotitrační destička znovu spektrofotometricky proměřena při 595 nm. Po proměření byl obsah destiček 3x promyt sterilní destilovanou vodou. Po vyschnutí bylo do každé jamky napipetováno 150  $\mu$ l 1% krystalové violeti a mikrotitrační destička byla ponechána 45 minut při laboratorní teplotě. Po obarvení byla destička 5x promyta sterilní destilovanou vodou. Po vyschnutí bylo do každé jamky napipetováno 150  $\mu$ l 96% ethanolu a po 20 minutovém působení bylo 100  $\mu$ l z každé jamky odpipetováno do další, 96% ethanolem promyté sterilní mikrotitrační destičky. U každé jamky byla spektrofotometricky proměřena absorbance zbarveného ethanolu při 595 nm. Každý testovaný kmen byl napipetován v 8 jamkách.

Tento postup detekce biofilmu byl pro každou testovanou bakterii a každé testované médium proveden ve třech nezávislých opakováních. Ze všech měření byly vyloučeny 3 nejdlejší hodnoty absorbance a poté stanoven průměr a výsledky byly vyhodnoceny.



### 3.4.2 Detekce polymikrobiálního biofilmu

Schopnost tvorby biofilmu po 1 a 2 denní kultivaci byla detekována polymikrobiálního biofilmu byla sledována modifikovanou Christensenovou metodou v mikrotitračních destičkách ve 4 rozdílných kultivačních médiích a to v BHI bujónu, BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, TSB bujónu a TSB bujónu s 1 % glukózy. Schopnost tvořit polymikrobiální biofilm byla sledována u klinických kmenů *S. aureus* 94A společně s *Ps. aeruginosa* 87A a u sbírkových kmenů *S. aureus* CCM 4223 společně s *Ps. aeruginosa* CCM 1960.

K detekci byl zvolen obdobný postup jako u detekce monomikrobiálního biofilmu. Rozdíl spočíval ve vytvoření bakteriálních suspenzí jednotlivých bakterií, opět odpovídající 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice a následnému smíchání těchto dvou suspenzí po 100 µl každé suspenze ve sterilní skleněné zkumavce. Směsná suspenze byla promíchána a poté bylo ze suspenze napipetováno 20 µl do 180 µl kultivačního média v jamkách mikrotitrační destičky.

#### 3.4.2.1 Kontrola růstu bakterií při polymikrobiální kultivaci

Po 1 denní kultivaci směsného biofilmu bakterií *S. aureus* a *Ps. aeruginosa* ve zvoleném testovacím médiu bylo ze dvou jamek odpipetováno po 100 µl, které byly následně rozetřeny L-hokejkou na Baird-Parker agaru a MPA, vždy v dubletu. Poté bylo provedeno desítkové ředění a z dalších dvou jamek a z každého ředění opět v dubletu odpipetováno 100 µl těchto ředění a rozetřeno L-hokejkou na Baird-Parker agar a MPA. Po 24 hodinové aerobní kultivaci při 37 °C byl stanoven počet kolonií *S. aureus* na Baird-Parker agaru a počet kolonií *S. aureus* společně s koloniemi *Ps. aeruginosa* na MPA.

### 3.4.3 Hodnocení výsledků

Pro stanovení tvorby biofilmu byly použity naměřené hodnoty absorbance po obarvení a následném odbarvení v ethanolu. U každé testované bakterie v příslušném testovaném médiu byla stanovena tzv „cut-off value“, která byla spočítána z naměřené optické denzity

negativní kontroly (ODc) příslušné bakterie a média. Současně byla také vypočítána OD testované bakterie, která byla následně porovnána s ODc a bakterie byly rozděleny do 4 kategorií podle schopnosti tvořit biofilm. Rozdělení dle optické denzity znázorňuje **tabulka 4**.

**Tabulka 4** – Stanovení tvorby biofilmu dle optické denzity

Porovnání optických denzit	Tvorba biofilmu	
$OD \leq ODc$	0	biofilm-negativní
$ODc < OD \leq 2x ODc$	+	slabě biofilm-pozitivní
$2x ODc < OD \leq 4x ODc$	++	středně biofilm-pozitivní
$4x ODc < OD$	+++	silně biofilm-pozitivní

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V praktické části diplomové práce byla testována tvorba monomikrobiálního biofilmu u klinických kmenů bakterií *Moraxella osloensis* 93B, *Proteus* spp. 93, 88, 87, 80, 76, 75, 68B, *Pseudomonas aeruginosa* 93C, 91A, 87A, 82A, *Pseudomonas monteilii* 82B, *Pseudomonas putida* 80B, *Serratia marcescens* 93A, 93D, 92C, 78B, *Staphylococcus aureus* 94A a *Staphylococcus piscifermentans* 90A. Tyto klinické kmeny byly získány ze stěrů chronických ran. Dále byla testována tvorba monomikrobiálního biofilmu u sbírkových kmenů bakterií *Proteus* spp. CCM 1799, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960, *Pseudomonas putida* CCM 3423, *Serratia marcescens* CCM 303, *Staphylococcus aureus* CCM 4223, *Staphylococcus aureus* CCM 3953.

Dále byla v praktické části diplomové práce testována tvorba polymikrobiálního biofilmu u klinických kmenů bakterií *S. aureus* 94A společně s *Ps. aeruginosa* 87A a u sbírkových kmenů bakterií *S. aureus* CCM 4223 společně s *Ps. aeruginosa* CCM 1960.

K testování tvorby monomikrobiálního biofilmu a polymikrobiálního biofilmu byla použita modifikovaná Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách dle Stepanović *et al.* (2007). Biofilm byl spektrofotometricky detekován po 1 a 2 denní kultivaci v BHI bujónu, BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, TSB bujónu a TSB bujónu s 1 % glukózy. Z naměřené hodnoty absorbance byla spočítána optická denzita testovaných bakterií a jejich kontrol a bakterie byly zařazeny do jedné ze 4 skupin dle schopnosti tvořit biofilm. **Tabulka 5** znázorňuje rozdělení testovaných bakterií do skupin dle schopnosti tvořit monomikrobiální biofilm, tvorbu polymikrobiálního biofilmu znázorňuje **tabulka 6**.

**Tabulka 5** – Rozdělení testovaných bakterií do skupin dle schopnosti tvořit monomikrobiální biofilm ve všech testovacích médiích

	BHI		BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy		TSB		TSB s 1 % glukózy	
	Kultivace							
Bakteriální kmeny	1 denní	2 denní	1 denní	2 denní	1 denní	2 denní	1 denní	2 denní
<i>Moraxella osloensis</i> 93B	+	0	0	0	+	+	+	+
<i>Proteus</i> spp. 93	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Proteus</i> spp. 88	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Proteus</i> spp. 87	++	+++	+++	+++	++	++	+++	++
<i>Proteus</i> spp. 80	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Proteus</i> spp. 76	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Proteus</i> spp. 75	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Proteus</i> spp. 68B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Proteus</i> spp. CCM 1799	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 93C	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 91A	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 87A	++	+++	+	+++	++	+++	++	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 82A	++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1960	++	+	+	++	+	+	+	++
<i>Pseudomonas monteilii</i> 82B	+	+++	+	+++	+	++	+	+++
<i>Pseudomonas putida</i> 80B	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas putida</i> CCM 3423	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i> 93A	+	++	+	++	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i> 93D	+	++	+	++	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i> 92C	+	+	+	+	+	+	+	++
<i>Serratia marcescens</i> 78B	+	+	++	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i> CCM 303	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 94A	+	+	+++	+	+++	+	+++	+
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	+	+	+++	+	++	+	+++	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	+	+	++	+	++	+	+++	+
<i>Staphylococcus piscifermentans</i> 90A	+	+	+	+	+	+	+	+

**Pozn.:** 0 biofilm-negativní, + slabě biofilm-pozitivní, ++ středně biofilm-pozitivní, +++ silně biofilm-pozitivní

**Tabulka 6** – Rozdělení testovaných bakterií do skupin dle schopnosti tvořit polymikrobiální biofilm ve všech testovacích médiích

	BHI		BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy		TSB		TSB s 1 % glukózy	
	kultivace							
Bakteriální kmeny	1 denní	2 denní	1 denní	2 denní	1 denní	2 denní	1 denní	2 denní
<i>Staphylococcus aureus</i> 94A + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 87A	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223 + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1960	++	+++	++	+++	++	+++	++	++

**Pozn.:** 0 biofilm-negativní, + slabě biofilm-pozitivní, ++ středně biofilm-pozitivní, +++ silně biofilm-pozitivní

#### 4.1.1 Optimalizace metody

Tvorba bakteriálního biofilmu se nejčastěji prokazuje zkumavkovou metodou (Christensen *et al.*, 1982; Christensen *et al.*, 1985) nebo metodou v mikrotitračních destičkách (Christensen *et al.*, 1985). Modifikace standardní destičkové metody detekce spočívá v měření absorbance po odbarvení krystalové violeti pomocí kyseliny octové nebo ethanolu. Kyselina octová nebo ethanol resolubilizuje krystalovou violet navázanou na přichycené buňky tvořící biofilm. Výhoda modifikované metody spočívá hlavně v umožnění nepřímého měření obarvených bakterií přichycených nejen ke dnu destičky či zkumavky, ale také ke stěnám jamek, jelikož ve standardní metodě měření biofilmu byly spektrofotometricky detekovány pouze obarvené bakterie zachycené na dno jamek (Stepanović *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 1994).

Množství produkovaného biofilmu bakteriemi je ovlivněno mnoha faktory, jako je velikost inokula, složení kultivačního média, výběr vhodných mikrotitračních destiček, kultivace, vymývání, fixace nebo barvení.

Množství produkovaného biofilmu se výrazně zvyšuje se zvyšující se denzitou počátečního inokula a proto je standardizovaná denzita inokula klíčovým faktorem testování tvorby

biofilmu (Deighton *et al.*, 2001). Ve studii Stepanović *et al.* (2007) bylo inokulum o počáteční denzitě odpovídající  $10^8$  CFU/ml, naředěno v poměru 1:100, aby byla získána denzita buněk odpovídající  $10^6$  CFU/ml. V naší práci bylo zvoleno stejné množství inokula jako ve studii Stepanović *et al.* (2007). Po ověření denzity stanovením CFU/ml byla kvůli malému počtu narostlých kolonií u bakterie *M. osloensis* zvolena počáteční denzita buněk odpovídající 1,5 McFarlandovy zákalové stupnice. Inokulum připravené z bakterií kultivovaných na pevném kultivačním médiu více napodobuje *in vivo* kultivační podmínky infekčních bakterií a je tedy pro testování tvorby biofilmu vhodnější než inokulum připravené z bakterií kultivovaných v tekutém kultivačním médiu. V této práci byly pro kultivaci zvoleny pevné půdy MPA nebo KA.

Složení kultivačního média pro kultivaci biofilmu je s velkou pravděpodobností nejpodstatnějším faktorem ovlivňující produkci biofilmu *in vitro*. Například obohacení kultivačního média přídavkem glukózy zvyšuje tvorbu biofilmu u bakterie *S. aureus*. Vliv obohacení kultivačních médií na tvorbu biofilmu u bakterie *S. aureus* v této práci je diskutován v kapitole 4.2.2. Také přídavek neinhibiční koncentrace ATB, ethanolu a chloridů sodného může zvýšit tvorbu biofilmu (Stepanović *et al.*, 2007). K testování tvorby biofilmu je doporučeno použití nejméně dvou kultivačních médií a to TSB s 1 % glukózy a BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy (Knobloch *et al.*, 2002). V této práci bylo k testování tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií zvoleno kultivační médium TSB, které už běžně v základu obsahuje 0,25 % glukózy a také TSB obohacené 0,1 % glukózy. Dále bylo zvoleno kultivační médium BHI a BHI obohacené 2 % glukózy a 2 % sacharózy.

Pro tvorbu biofilmu je důležitá počáteční adheze buněk na povrch mikrotitračních destiček. Adheze je ovlivněna mnoha faktory, zahrnující i vlastnost povrchu mikrotitrační destičky. Proto je důležité, aby byly použity destičky pro tkáňovou kultivaci se speciálně upraveným povrchem, který zajistí lepší adhezi a proliferaci testovaných bakterií. Dno jamek mikrotitrační destičky může být ve tvaru U, V nebo být ploché. K testování biofilmu se nejčastěji používají polystyrenové mikrotitrační destičky s plochým dnem (Stepanović *et al.*, 2007). V této práci byly použity 96 jamkové polystyrenové mikrotitrační destičky pro tkáňovou kultivaci s plochým dnem.

Významná je také délka kultivační doby biofilmu, protože hustota biofilmu je závislá na délce kultivace (Deighton *et al.*, 2001). Doporučená je 1 denní kultivační doba, kvůli

odlučování svrchních částí biofilmu, ke kterému může dojít při prodloužené kultivační době. V této práci se tvorba biofilmu testovala po 1 denní a 2 denní kultivaci.

Promývání biofilmu by mělo odstranit všechny neadherentní planktonní buňky a zároveň nesmí porušit celistvost biofilmu. Proto je správné provedení jedním z nejdůležitějších kroků. Jako ideální bylo zvoleno třístupňové promytí pomocí šetrného pipetování. Tento postup promývání byl také zvolen v této práci. Celistvost biofilmu by měla být dobře sledována a všechny jamky s narušenou integritou by měly být vyloučeny z následného testování.

Délka barvení je v různých experimentech jiná, ale je prokázáno, že dostatečný čas působení je 15 minut, jelikož za tuto dobu dojde k proniknutí barvy přes biofilm (Stepanović *et al.*, 2007). V této práci byla zvolena délka působení krystalové violeti 45 minut.

Pro měření OD zabarvených jamek byla zvolena skupinou Stepanović *et al.* (2007) vlnová délka 570 nm. V této práci byla zvolena vlnová délka, nejvíce se blížící absorpčnímu maximu krystalové violeti, a to 595 nm. V některých studiích byl roztok krystalové violeti po obarvení a následné resolubilizaci v ethanolu přepipetován do nových sterilních mikrotitračních destiček (Beenken *et al.*, 2003). Tento postup je dle Stepanović *et al.* (2007) prospěšný, ale neovlivňuje správnost výsledků. Přesto byl tento krok zařazen do naší práce.

Dále je doporučeno sledovat a měřit růst testovaných bakteriálních kmenů na mikrotitrační destičce a to pomocí spektrofotometrického měření zákalu po 1 denní nebo 2 denní kultivaci. Snížený růst může být následkem technických chyb či různých jiných faktorů a mohl by ovlivnit výsledky testování.

Při detekci polymikrobiálního biofilmu bylo důležitým krokem práce ověření polymikrobiální kultivace bakterií *S. aureus* společně s bakterií *Ps. aeruginosa*. K ověření životaschopnosti po společné 1 denní kultivaci sloužila kultivace na MPA a pro bakterii *S. aureus* Baird-Parker agar po předchozím desítkovém ředění. Rozlišení kolonií bakterií *S. aureus* a *Ps. aeruginosa* bylo v naší práci možné již při páté ředění, ale jako vhodný počet ředění bylo stanoveno ředění osmé, kdy bylo možné stanovit počitatelné množství kolonií jednotlivých bakterií. Pro další kontrolu polymikrobiální kultivace bylo tedy zvolené vždy osmé ředění.

## 4.2 TVORBA MONOMIKROBIÁLNÍHO A POLYMIKROBIÁLNÍHO BIOFILMU V JEDNOTLIVÝCH KULTIVAČNÍCH MÉDIÍCH

### 4.2.1 Tvorba biofilmu v BHI po 1 denní a 2 denní kultivaci

Jak znázorňuje **graf 1**, po 1 denní kultivaci v BHI při 37° C došlo k největší tvorbě monomikrobiálního biofilmu u klinických kmenů bakterie *Proteus* spp. a to hlavně u bakterie *Proteus* spp. 68B ( $A_{595} = 0,865$ ), *Proteus* spp. 75 ( $A_{595} = 0,8337$ ), *Proteus* spp. 76 ( $A_{595} = 0,7754$ ) a *Proteus* spp. 80 ( $A_{595} = 7158$ ). Pouze tyto 4 klinické kmeny byly po 1 denní kultivaci v BHI vyhodnoceny jako silně biofilm-pozitivní. Naopak jako biofilm-negativní byla vyhodnocena bakterie *Pseudomonas putida* (*Ps. putida*) CCM 3423 ( $A_{595} = 0,1221$ ). Ostatní testované bakterie byly vyhodnoceny jako slabě nebo středně biofilm-pozitivní. Mezi klinickými a sbírkovými kmeny nebyly v tvorbě biofilmu patrné žádné velké rozdíly.

Tvorba polymikrobiálního biofilmu v BHI byla hodnocena u klinických kmenů *S. aureus* 94A + *Ps. aeruginosa* 87A. Bakterie byly po 1 denní kultivaci v BHI vyhodnoceny jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,3396$ ). U monomikrobiálního biofilmu těchto stejných bakterií byla tvorba biofilmu u bakterie *S. aureus* 94A vyhodnocena jako slabě biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,2115$ ) a u bakterie *Ps. aeruginosa* 87A jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,2982$ ). Hodnota absorbance u polymikrobiálního biofilmu byla tedy vyšší než hodnota absorbance u monomikrobiálních biofilmu pro každou bakterii zvlášť a došlo tedy k mírně zvýšené tvorbě biofilmu.

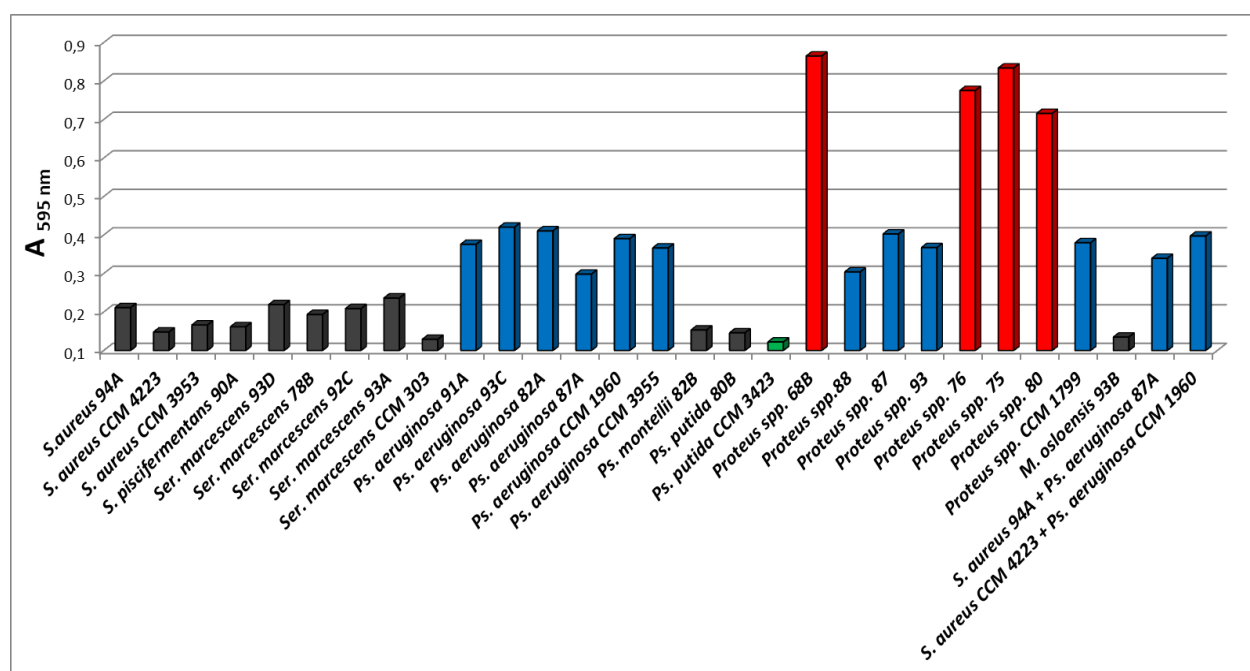
U sbírkových kmenů *S. aureus* CCM 4223 a *Ps. aeruginosa* CCM 1960 byla tvorba polymikrobiálního biofilmu nepatrně vyšší než u bakterií z klinických kmenů. Polymikrobiální biofilm po 1 denní kultivaci v BHI u sbírkových kmenů *S. aureus* CCM 4223 + *Ps. aeruginosa* CCM 1960 byl vyhodnocen jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,3974$ ). U testování tvorby monomikrobiálního biofilmu byla bakterie *S. aureus* CCM 4223 vyhodnocena jako slabě biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,1481$ ) a bakterie *Ps. aeruginosa* CCM 1960 byla vyhodnocena jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,3907$ ). Tvorba polymikrobiálního biofilmu tedy odpovídala tvorbě monomikrobiálního biofilmu bakterie *Ps. aeruginosa*.



Smith *et al.* (2017) poukazují na to, že v laboratorních podmínkách je bakterie *Ps. aeruginosa* schopna usmrtit bakterii *S. aureus* a nelze tyto bakterie společně za normálních podmínek stabilně kultivovat. Tuto teorii však naše studie nepotvrdila. Při ověření polymikrobiální kultivace pomocí Baird-Parker agaru, došlo vždy po 1 denní kultivaci v BHI k poklesu počtu bakterií *S. aureus*, ale nedošlo k úplnému usmrcení této bakterie.

Alves *et al.* (2018) pozorovali, že bakterie *S. aureus* zvyšuje schopnost připojení bakterie *Ps. aeruginosa*. V naší studii byla tvorba biofilmu těchto dvou bakterií nepatrně vyšší u polymikrobiální kultivace než u kultivace jednotlivých bakterií zvlášť.

**Graf 1** – Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů v BHI po 1 denní kultivaci při 37° C



Pozn.: Červená: +++, modrá: ++, černá: +, zelená: 0

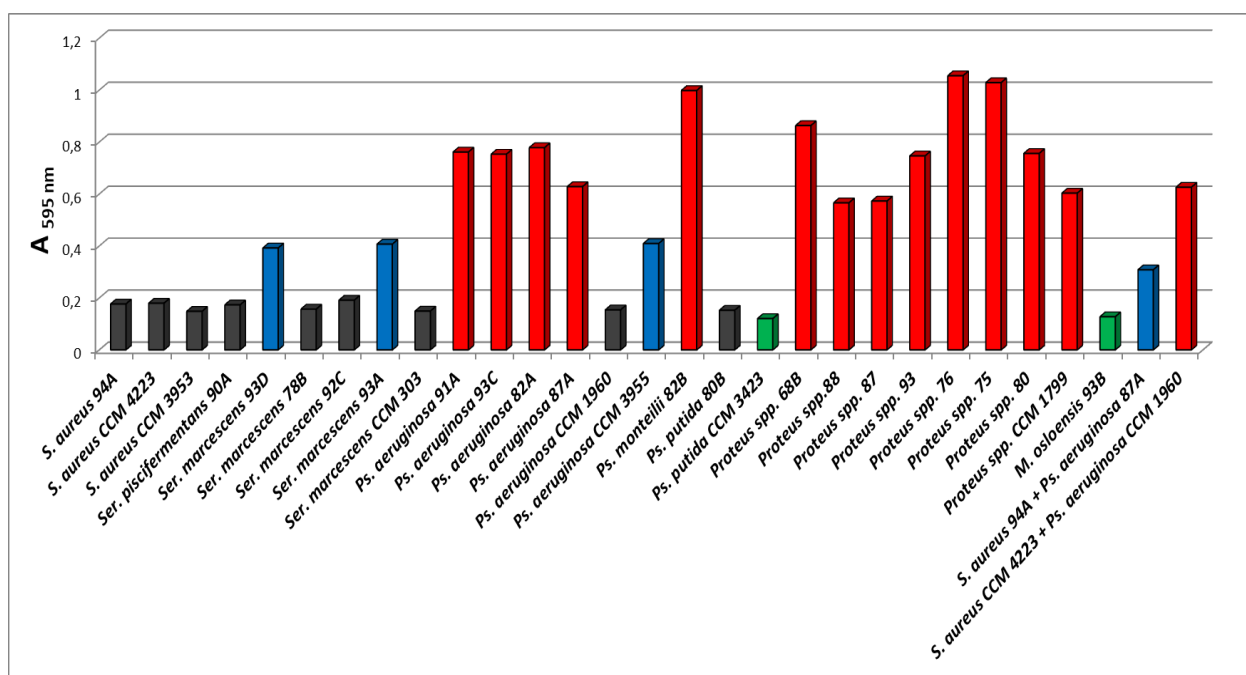
**Graf 2** znázorňuje tvorbu biofilmu u všech testovaných bakteriálních kmenů v BHI při 37° C po 2 denní kultivaci. Oproti 1 denní kultivaci, došlo ke zvýšení počtů bakteriálních kmenů, které byly vyhodnoceny jako silně biofilm-pozitivní. K největší tvorbě monomikrobiálního biofilmu došlo u bakterií *Proteus* spp. 76 ( $A_{595} = 1,0552$ ), *Proteus* spp. 75 ( $A_{595} = 1,0286$ ) a *Ps. monteilii* 82B ( $A_{595} = 0,9985$ ), které byly vyhodnoceny jako silně biofilm-pozitivní. Jako silně biofilm-pozitivní byly v tomto médiu vyhodnoceny také všechny klinické kmeny *Ps. aeruginosa* a klinické i sbírkové kmeny *Proteus* spp. Naopak bakterie *Ps. putida* CCM 3423 ( $A_{595} = 0,1226$ ) a *M. osloensis* 93B ( $A_{595} = 0,128$ ) byly vyhodnoceny

jako biofilm-negativní. Rozdíl mezi sbírkovými a klinickými kmeny byl u všech izolátů *Ps. aeruginosa* a u dvou izolátů *S. marcescens*, kde došlo ke zmenšené tvorbě biofilmu u sbírkových kmenů.

Tvorba polymikrobiálního biofilmu v BHI po 2 denní kultivaci u klinických kmenů *S. aureus* 94A + *Ps. aeruginosa* 87A byla podobná jako tvorba ve stejném médiu po 1 denní kultivaci. Bakterie tvořící polymikrobiální biofilm byly po 2 denní kultivaci vyhodnoceny jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,3086$ ) a po 1 denní kultivaci také jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,3396$ ). Bakterie *S. aureus* 94A, byla v tvorbě monomikrobiálního biofilmu v BHI po 2 denní kultivaci vyhodnocena jako slabě biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,1769$ ) a bakterie *Ps. aeruginosa* 87A jako silně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,6283$ ).

U tvorby polymikrobiálního biofilmu sbírkových kmenů bakterií *S. aureus* CCM 4223 + *Ps. aeruginosa* CCM 1960, došlo na rozdíl od klinických kmenů ke zvýšení tvorby po 2 denní kultivaci oproti 1 denní kultivaci. Sbírkové bakterie tvořící polymikrobiální biofilm, byly vyhodnoceny jako silně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,626$ ) a po 1 denní kultivaci byly vyhodnoceny pouze jako středně biofilm-pozitivní. Bakterie *S. aureus* CCM 4223 byla po monomikrobiální kultivaci vyhodnocena jako slabě biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,1798$ ) a bakterie *Ps. aeruginosa* CCM 1960 také jako slabě biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,1542$ ). V tvorbě polymikrobiálního biofilmu u sbírkových bakteriálních kmenů došlo tedy k výraznému zvýšení oproti tvorbě monomikrobiálních biofilmů stejných sbírkových bakteriálních kmenů.

**Graf 2** - Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů v BHI po 2 denní kultivaci při 37° C



Pozn.: Červená: +++, modrá: ++, černá: +, zelená: 0

#### 4.2.2 Tvorba biofilmu v BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy po 1 denní kultivaci

**Graf 3** znázorňuje tvorbu biofilmu u všech testovaných bakteriálních kmenů po 1 denní kultivaci v BHI při 37° C obohaceném 2 % glukózy a 2 % sacharózy. Monomikrobiální biofilm v tomto kultivačním médiu nejvíce tvořila bakterie *S. aureus* 94A ( $A_{595} = 1,8860$ ). Dále byly jako silně biofilm-pozitivní vyhodnoceny bakterie *S. aureus* CCM 4223 ( $A_{595} = 0,8314$ ), *Proteus* spp. 68B ( $A_{595} = 0,6841$ ), *Proteus* spp. 87 ( $A_{595} = 0,5622$ ) a *Proteus* spp. CCM 1799 ( $A_{595} = 0,6522$ ). Nejméně v tomto médiu tvořily biofilm bakterie *Ps. putida* CCM 3423 ( $A_{595} = 0,1215$ ) a *M. osloensis* 93B ( $A_{595} = 0,1272$ ), které byly vyhodnoceny jako biofilm-negativní.

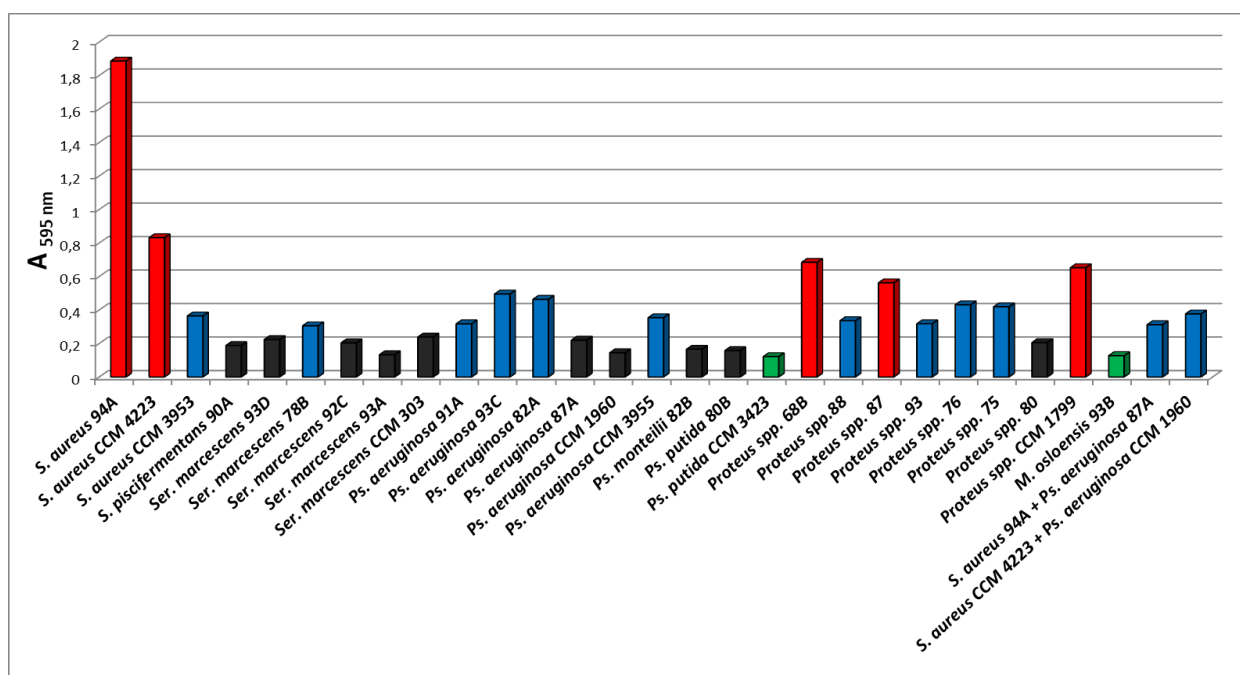
Stepanović *et al.* (2007) zmiňují, že po obohacení kultivačního média glukózou, dochází u bakterie *S. aureus* ke zvýšení tvorby biofilmu. Toto tvrzení se v naší studii potvrdilo, u všech testovaných kmenů *S. aureus* došlo ke zvýšené tvorbě biofilmu po obohacení BHI 2 % glukózy a 2 % sacharózy po 1 denní kultivaci. K největšímu nárůstu tvorby biofilmu došlo u bakterie *S. aureus* 94A, která byla vyhodnocena jako silně biofilm-pozitivní ( $A_{595} =$

1,8860) a v BHI bez přídavku 2 % glukózy a 2 % sacharózy, byla vyhodnocena jako slabě biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,2115$ ). K výraznému zvýšení tvorby biofilmu došlo i u sbírkového kmene *S. aureus* CCM 4223, kdy byla bakterie po 1 denní kultivaci v BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy vyhodnocena jako silně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,8314$ ) a po kultivaci v neobohaceném BHI jako slabě biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,1481$ ). U ostatních bakteriálních kmenů nedošlo k výrazné změně ve tvorbě biofilmu po obohacení BHI a u některých bakterií došlo naopak k výraznému poklesu tvorby biofilmu. *Proteus* spp. 80 byl po 1 denní kultivaci v BHI vyhodnocen jako silně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,7157$ ) a po 1 denní kultivaci v BHI s 2 % glukózou a 2 % sacharózou jako slabě biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,2055$ ).

Klinické kmeny *S. aureus* 94A + *Ps. aeruginosa* 87A tvořící polymikrobiální biofilm byly po 1 denní kultivaci v BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy vyhodnoceny jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,312$ ). Samotná bakterie *S. aureus* 94A byla u tvorby monomikrobiálního biofilmu po 1 denní kultivaci vyhodnocena jako silně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 1,8860$ ) a *Ps. aeruginosa* 87A jako slabě biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,2198$ ).

Sbírkové kmeny *S. aureus* CCM 4223 + *Ps. aeruginosa* CCM 1960 byly v tvorbě polymikrobiálního biofilmu po 1 denní kultivaci v BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy vyhodnoceny jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,3764$ ). Bakterie *S. aureus* CCM 4223 v monomikrobiálním biofilmu po 1 denní kultivaci ve stejném kultivačním médiu, byla vyhodnocena jako silně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,8314$ ) a bakterie *Ps. aeruginosa* CCM 1960 jako slabě biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,1443$ ).

**Graf 3** – Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů v BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy po 1 denní kultivaci při 37° C



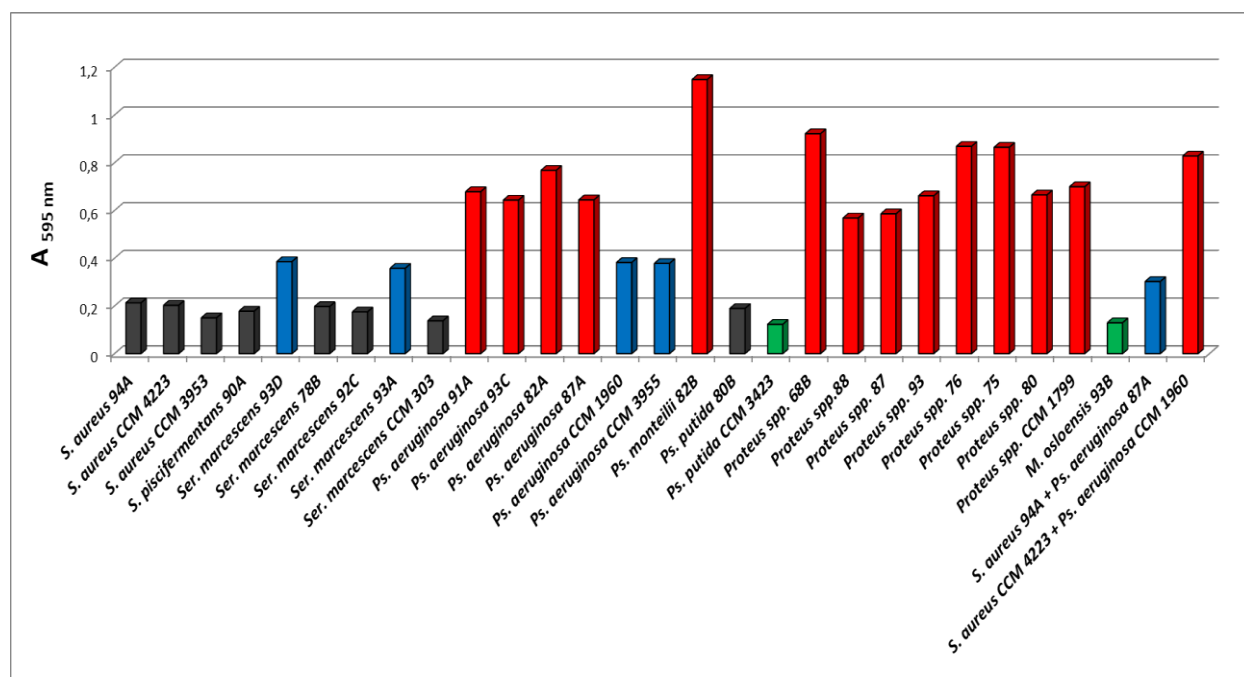
**Pozn.:** Červená: +++, modrá: ++, černá: +, zelená: 0

Na **grafu 4** je znázorněná tvorba biofilmu všech testovaných bakteriálních kmenů v BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy po 2 denní kultivaci při 37° C. Oproti 1 denní kultivaci došlo opět ke zvýšení počtu kmenů, které byly vyhodnoceny jako silně biofilm-pozitivní. Nejvíce zde monomikrobiální biofilm tvořila bakterie *Ps. monteilii* 82B ( $A_{595} = 1,1485$ ), dále všechny kmeny *Proteus* spp. a všechny klinické kmeny *Ps. aeruginosa*. Tyto bakterie byly vyhodnoceny jako silně biofilm-pozitivní. Naopak jako biofilm-negativní byly vyhodnoceny bakterie *Ps. putida* CCM 3423 a *M. osloensis* 93B. Největší změna v tvorbě biofilmu byla zaznamenána u kmenů *S. aureus*, kdy došlo po 2 denní kultivaci k výraznému poklesu tvorby. Pokles mohl být způsobený odlučováním svrchní části biofilmu po prodloužené kultivaci.

U polymikrobiálního biofilmu, tvořeného klinickými kmeny *S. aureus* 94A + *Ps. aeruginosa* 87A, nedošlo k výrazné změně ve tvorbě biofilmu po 2 denní kultivaci v porovnání s 1 denní kultivaci. Bakterie byly po polymikrobiální, 2 denní kultivaci vyhodnoceny jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,302$ ), stejně tak i po 1 denní kultivaci. Po monomikrobiální 2 denní kultivaci byla bakterie *S. aureus* 94A vyhodnocena jako slabě biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,2128$ ) a *Ps. aeruginosa* 87A jako silně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,6443$ ).

Sbírkové kmeny bakterií *S. aureus* CCM 4223 + *Ps. aeruginosa* CCM 1960 byly po 2 denní kultivaci v BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy vyhodnoceny jako silně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,8281$ ). Po 1 denní kultivaci ve stejném médiu byla tato směs bakterií vyhodnocena jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,3764$ ). Při 2 denní kultivaci došlo tedy k výraznému zvýšení tvorby polymikrobiálního biofilmu oproti 1 denní kultivaci. Při sledování tvorby monomikrobiálního biofilmu těchto dvou bakterií, byla bakterie *S. aureus* CCM 4223 vyhodnocena jako slabě biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,2028$ ) a bakterie *Ps. aeruginosa* CCM 1960 jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,3822$ ). V porovnání s tvorbou monomikrobiálního biofilmu každého bakteriálního kmene zvlášť, došlo ke zvýšení tvorby u polymikrobiálního biofilmu těchto dvou bakterií.

**Graf 4** – Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů v BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy po 2 denní kultivaci při 37° C



Pozn.: **Červená:** +++, **modrá:** ++, **černá:** +, **zelená:** 0

### 4.2.3 Tvorba biofilmu v TSB po 1 denní kultivaci

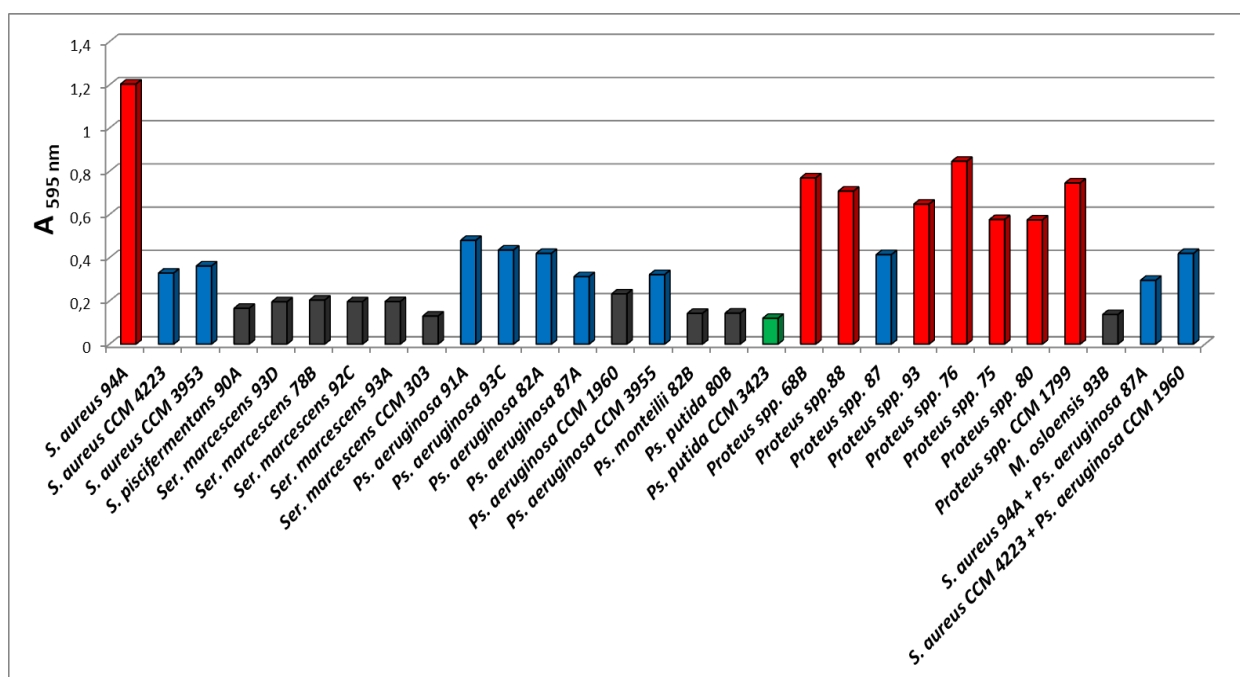
**Graf 5** znázorňuje tvorbu biofilmu po 1 denní kultivaci v TSB při 37° C u všech testovaných kmenů bakterií. K tvorbě monomikrobiálního biofilmu došlo nejvíce u bakterie *S. aureus* 94A, která byla vyhodnocena jako silně biofilm pozitivní ( $A_{595} = 1,2036$ ), dále u všech kmenů bakterie *Proteus* spp., kromě bakterie *Proteus* spp. 87, která byla vyhodnocena jako středně biofilm-pozitivní. Jako biofilm-negativní byla vyhodnocena sbírková bakterie *Ps. putida* CCM 3423 ( $A_{595} = 0,1197$ ).

U polymikrobiálního biofilmu byly hodnoceny bakterie z klinických izolátů *S. aureus* 94A + *Ps. aeruginosa* 87A. Tyto bakterie byly po 1 denní kultivaci v TSB vyhodnoceny jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,2951$ ). Bakterie *S. aureus* 94A, byla po 1 denní kultivaci vyhodnocena jako silně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 1,2036$ ) a bakterie *Ps. aeruginosa* 87A jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,3124$ ). Tvorba biofilmu těchto dvou bakterií dohromady tedy více odpovídá tvorbě biofilmu *Ps. aeruginosa* 87A a u polymikrobiální kultivace došlo k mírnému poklesu tvorby biofilmu, oproti kultivaci každé bakterie zvlášť.

Sbírkové kmeny bakterií, u kterých byla sledována tvorba polymikrobiálního biofilmu *S. aureus* CCM 4223 + *Ps. aeruginosa* CCM 1960, byly po 1 denní kultivaci v TSB vyhodnoceny jako středně biofilm pozitivní ( $A_{595} = 0,4196$ ). Po 1 denní kultivaci byla bakterie *S. aureus* CCM 4223 vyhodnocena jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,3289$ ) a bakterie *Ps. aeruginosa* CCM 1960 také jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,2325$ ). Tvorba polymikrobiálního biofilmu byla tedy nepatrně vyšší než tvorba monomikrobiálního biofilmu u každého samostatného bakteriálního kmene zvlášť.

Vatan *et al.* (2018) sledovali tvorbu biofilmu bakteriálních izolátů získaných od pacientů se syndromem diabetické nohy. V TSB po 1 denní kultivaci nejvíce tvořila biofilm bakterie *Ps. aeruginosa*, poté *Proteus* spp., *S. marcescens* a nakonec *S. aureus*. Autoři nezaznamenali žádný významný rozdíl mezi tvorbou biofilmu u monomikrobiálních a polymikrobiálních infekcí. V naší studii tvořily biofilm v TSB po 1 denní kultivaci nejvíce bakterie *S. aureus* 94A a *Proteus* spp. a kmeny bakterie *Ps. aeruginosa* byly vyhodnoceny pouze středně biofilm-pozitivní. Dále byl v naší studii zaznamenán rozdíl v tvorbě biofilmu u polymikrobiálních a monomikrobiálních kultivací, kdy tvorba polymikrobiálního biofilmu byla nepatrně vyšší než tvorba monomikrobiálního biofilmu.

**Graf 5** – Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů v TSB po 1 denní kultivaci při 37° C



**Pozn.:** Červená: +++, modrá: ++, černá: +, zelená: 0

Na **grafu 6** je znázorněná tvorba biofilmu všech testovaných bakteriálních kmenů v TSB po 2 denní kultivaci v 37° C. Z grafu je patrné, že oproti 1 denní kultivaci, došlo opět ke zvýšení počtů silně biofilm-pozitivních bakterií. Monomikrobiální biofilm nejvíce tvořila bakterie *Proteus* spp. 76 ( $A_{595} = 0,9657$ ), dále byly jako silně biofilm-pozitivní vyhodnoceny všechny kmeny *Proteus* spp., kromě *Proteus* spp. 87 a také všechny klinické izoláty bakterie *Ps. aeruginosa*. Nejméně biofilm tvořila po 2 denní kultivaci v TSB bakterie *Ps. putida* CCM 3423 ( $A_{595} = 0,124$ ). Po 2 denní kultivaci došlo opět k výraznému poklesu u tvorby biofilmu kmenů *S. aureus* oproti kultivaci 1 denní a to hlavně u klinického kmenu *S. aureus* 94A. Protože hodnoty negativní kontroly byly měřeny ke každému kmenu zvlášť, byly mezní hodnoty, potřebné pro rozřazení do kategorií podle tvorby biofilmu, pro každý kmen jiné. Proto je u některých kmenů, např. u *Ps. putida* CCM 3423 a *M. osloensis* 93B, hodnota absorbance velice podobná, ale každý kmen byl zařazen do jiné kategorie tvorby biofilmu.

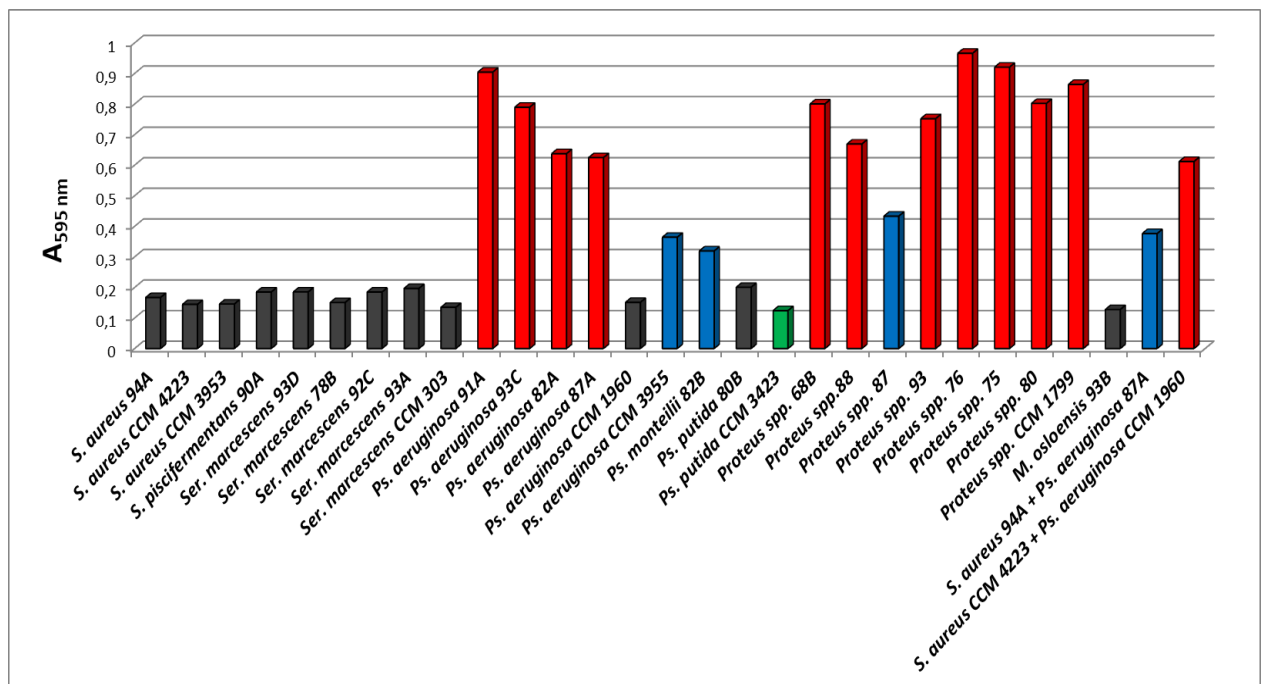
Klinické bakterie *S. aureus* 94A + *Ps. aeruginosa* 87A, tvořící polymikrobiální biofilm, byly po 2 denní kultivaci v TSB vyhodnoceny jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,376$ ). Po 1 denní kultivaci byl výsledek tvorby polymikrobiálního biofilmu mírně nižší ( $A_{595} = 0,2951$ ) ale stále hodnocený jako středně biofilm-pozitivní. Bakterie *S. aureus* 94A, tvořící monomikrobiální biofilm po 2 denní kultivaci v TSB, byla vyhodnocena jako slabě



biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,1668$ ) a bakterie *Ps. aeruginosa* 87A jako silně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,6244$ ).

Sbírkové bakterie *S. aureus* CCM 4223 + *Ps. aeruginosa* CCM 1960 byly po 2 denní kultivaci v TSB vyhodnoceny jako silně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,6118$ ) a po 1 denní kultivaci ve stejném kultivačním médiu byla tvorba vyhodnocena jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,4196$ ). Při prodloužení kultivace došlo tedy ke zvýšení tvorby polymikrobiálního biofilmu. Samotná bakterie *S. aureus* CCM 4223 byla vyhodnocena po 2 denní kultivaci v TSB jako slabě biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,1443$ ) a bakterie *Ps. aeruginosa* CCM 1960 také jako slabě biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,1509$ ). Při směsné kultivaci obou bakterií došlo tedy k zesílení tvorby biofilmu v porovnání s tvorbou biofilmu u každé bakterie zvlášť.

**Graf 6** – Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů v TSB po 2 denní kultivaci při 37° C



Pozn.: Červená: +++, modrá: ++, černá: +, zelená: 0

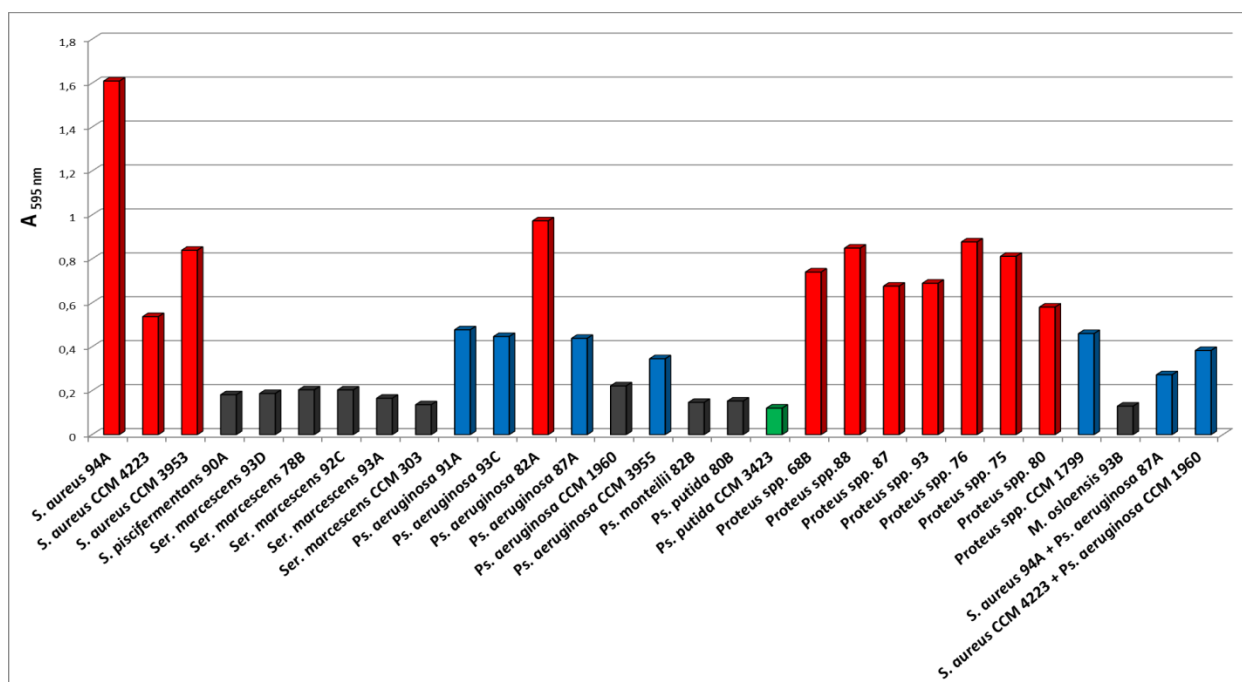
#### 4.2.4 Tvorba biofilmu v TSB s 1 % glukózy po 1 denní kultivaci

Tvorbu biofilmu všech testovaných bakterií po 1 denní kultivaci v TSB s 1 % glukózy při 37° C znázorňuje **graf 7**. K největší tvorbě monomikrobiálního biofilmu v tomto médiu došlo u bakterie z klinických izolátů *S. aureus* 94A, která byla vyhodnocena jako silně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 1,6092$ ). V tomto médiu byly jako silně biofilm-pozitivní vyhodnoceny také sbírkové bakterie *S. aureus* CCM 4223 a *S. aureus* CCM 3953 a všechny kmeny bakterie *Proteus* spp., získané z klinických izolátů. Jako biofilm-negativní byla vyhodnocena bakterie *P. putida* CCM 3423 ( $A_{595} = 0,1206$ ).

Tvorba polymikrobiálního biofilmu byla hodnocena u klinických izolátů bakterií *S. aureus* 94A + *Ps. aeruginosa* 87A. Po 1 denní kultivaci v TSB s 1 % glukózy byla tvorba polymikrobiálního biofilmu stanovena jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,2723$ ). Ve stejném médiu, tvořila bakterie *S. aureus* 94A biofilm silně ( $A_{595} = 1,6092$ ) a bakterie *Ps. aeruginosa* 87A byla vyhodnocena jako středně biofilm pozitivní ( $A_{595} = 0,4381$ ). U polymikrobiální kultivace došlo tedy ke snížení tvorby biofilmu oproti monomikrobiální kultivaci každého bakteriálního kmene zvlášť.

**Graf 7** znázorňuje také tvorbu polymikrobiálního biofilmu sbírkových kmenů bakterií *S. aureus* CCM 4223 + *Ps. aeruginosa* CCM 1960. Tyto bakterie tvořící polymikrobiální biofilm byly vyhodnoceny jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,383$ ). Sbírkové bakterie *S. aureus* CCM 4223 a *Ps. aeruginosa* CCM 1960 byly hodnoceny i v tvorbě monomikrobiálního biofilmu, kde byly vyhodnoceny jako silně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,537$ ) a slabě biofilm pozitivní ( $A_{595} = 0,2216$ ).

**Graf 7** – Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů v TSB s 1 % glukózy po 1 denní kultivaci při 37° C



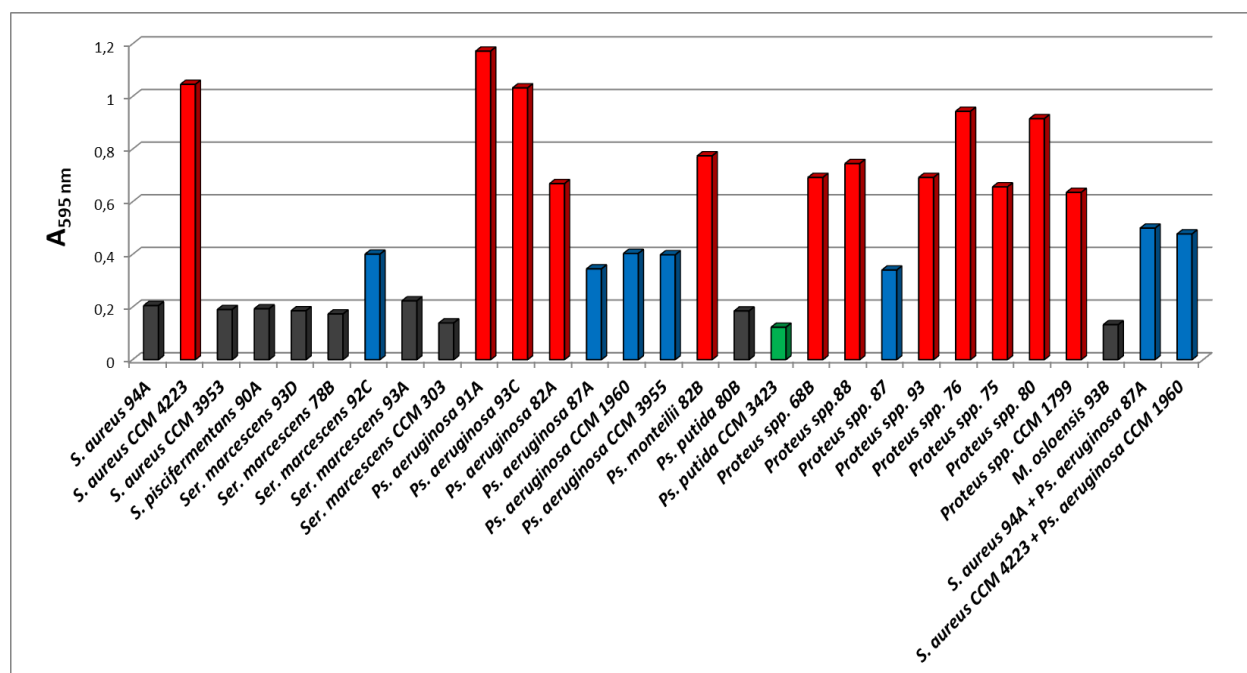
**Pozn.: Červená: +++**, **modrá: ++**, **černá: +**, **zelená: 0**

**Graf 8** znázorňuje tvorbu biofilmu všech testovaných kmenů bakterií po 2 denní kultivaci v TSB s 1 % glukózy při 37° C. Nejvíce zde tvořila monomikrobiální biofilm bakterie *Ps. aeruginosa* 91A ( $A_{595} = 1,1725$ ), která byla vyhodnocena jako silně biofilm-pozitivní. Mezi silně biofilm-pozitivní dále patří *S. aureus* CCM 4223, *Ps. aeruginosa* 93C a 82A, *Ps. monteilii* 82B a všechny kmeny bakterie *Proteus* spp. kromě *Proteus* spp. 87. Naopak jako biofilm-negativní byla vyhodnocena bakterie *Ps. putida* CCM 3423 ( $A_{595} = 0,1232$ ).

U tvorby polymikrobiálního biofilmu byly hodnoceny bakterie z klinických izolátů *S. aureus* 94A + *Ps. aeruginosa* 87A, které byly po 2 denní kultivaci vyhodnoceny jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,4997$ ). Oproti 1 denní kultivaci, kde byla tvorba polymikrobiálního biofilmu vyhodnocena také jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,2723$ ), byla tvorba po 2 denní kultivaci vyšší. Samotná bakterie *S. aureus* 94A byla v tvorbě monomikrobiálního biofilmu hodnocena jako slabě biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,2053$ ) a bakterie *Ps. aeruginosa* 87A jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,3449$ ). Při polymikrobiální kultivaci došlo tedy ke zvýšení tvorby biofilmu oproti kultivaci monomikrobiální.

Sbírkové kmeny *S. aureus* CCM 4223 + *Ps. aeruginosa* CCM 1960, tvořící polymikrobiální biofilm, byly po 2 denní kultivaci v TSB s 1 % glukózy vyhodnoceny jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,4777$ ). Po 1 denní kultivaci ve stejném médiu, byly tyto bakterie hodnoceny také jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,383$ ), ikdyž po 2 denní kultivaci došlo k mírnému nárůstu tvorby polymikrobiálního biofilmu. Bakterie *S. aureus* 94A tvořící monomikrobiální biofilm byla po 2 denní kultivaci vyhodnocena jako slabě biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,2053$ ) a bakterie *Ps. aeruginosa* 97A jako středně biofilm-pozitivní ( $A_{595} = 0,3449$ ). Při polymikrobiální kultivaci došlo opět ke zvýšení tvorby biofilmu v porovnání s kultivací monomikrobiální.

**Graf 8** – Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů v TSB s 1 % glukózy po 2 denní kultivaci při 37° C



Pozn.: Červená: +++, modrá: ++, černá: +, zelená: 0

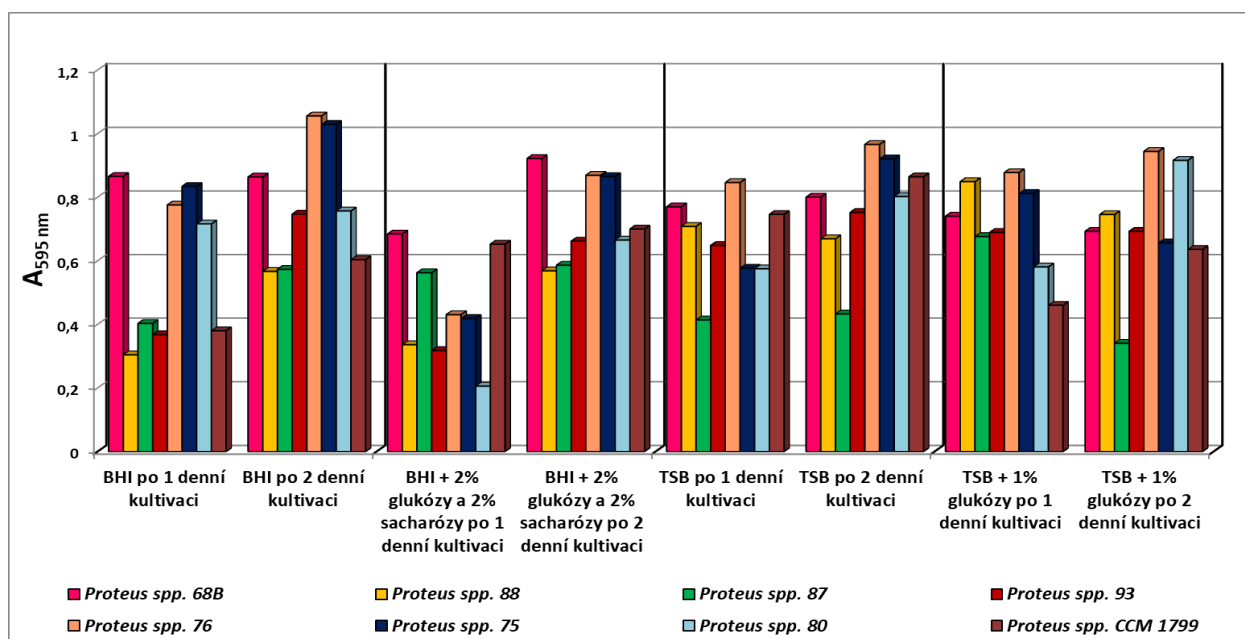
## 4.3 TVORBA BIOFILMU TESTOVANÝCH MIKROBIÁLNÍCH KMENŮ

### 4.3.1 *Proteus* spp.

Z **grafu 9**, který znázorňuje tvorbu biofilmu u *Proteus* spp. je patrné, že po 1 denní kultivaci při 37° C všechny testované kmeny tvořily biofilm nejméně v BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, naopak k největší tvorbě biofilmu došlo v TSB s 1 % glukózy. Celkově v našem testování všechny kmeny bakterie *Proteus* spp. tvořily po 1 denní kultivaci biofilm lépe v TSB než v BHI. Po 2 denní kultivaci došlo k největší tvorbě biofilmu v BHI a TSB a rozdíl mezi TSB a BHI nebyl patrný.

Nejvíce biofilm tvořila bakterie z klinických izolátů *Proteus* spp. 68B, která byla ve všech testovaných médiích vyhodnocena jako silně biofilm-pozitivní po 1 denní i po 2 denní kultivaci. Naopak nejméně biofilm tvořila bakterie z klinických izolátů *Proteus* spp. 87. Rozdíl v době kultivace byl patrný téměř u všech testovaných médií, kde po 2 denní kultivaci došlo ke zvýšené tvorbě biofilmu téměř u všech testovaných mikroorganismů, kromě kultivace v TSB s 1 % glukózy, kde došlo k nárůstu tvorby pouze u *Proteus* spp. 76, 80 a *Proteus* spp. CCM 1799.

**Graf 9** – Tvorba biofilmu všech testovaných kmenů bakterie *Proteus* spp. ve vybraných kultivačních médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37° C



Zubair *et al.* (2011) hodnotili tvorbu biofilmu bakterie *P. vulgaris*. Z 5 izolátů této bakterie byly 4 vyhodnoceny jako biofilm-pozitivní. V našem testování byly všechny kmeny *Proteus* spp. vyhodnoceny jako středně biofilm-pozitivní nebo silně biofilm-pozitivní a žádný kmen jako biofilm-negativní.

Majtan *et al.* (2014) spektrofotometricky detekovali biofilm u izolátů bakterie *P. mirabilis* získaných z chronických ran. Po 1 denní kultivaci v TSB byla OD vyšší jak 0,8 a to značilo silnou tvorbu biofilmu. V našem testování byla OD testovaných kmenů *Proteus* spp. po 1 denní kultivaci v TSB průměrně 0,7 ale i tak byly téměř všechny kmeny vyhodnoceny jako silně biofilm-pozitivní s výjimkou *Proteus* spp. 87, který byl vyhodnocen jako středně biofilm-pozitivní.

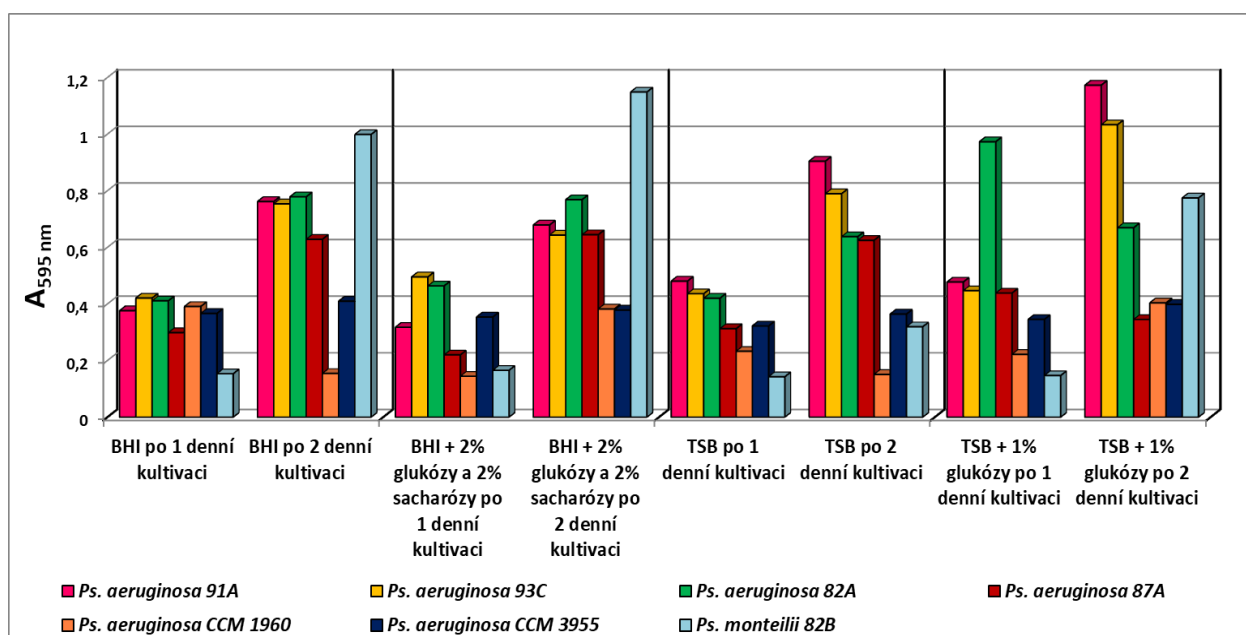
Malik *et al.* (2013) hodnotili tvorbu biofilmu u bakteriálních izolátů *P. vulgaris* a *P. mirabilis* získaných od pacientů se syndromem diabetické nohy. Celkově bylo vyhodnoceno jako biofilm-pozitivní 5 z 9 izolátů bakterie *P. vulgaris* a 2 ze 4 izolátů bakterie *P. mirabilis*.

### 4.3.2 *Pseudomonas* spp.

Tvorbu biofilmu bakterie *Ps. aeruginosa* a *Ps. monteilii* ve všech vybraných kultivačních médiích znázorňuje **graf 10**. Po 1 denní kultivaci kmeny *Ps. aeruginosa* tvořily biofilm nejlépe v TSB s 1 % glukózy a naopak nejhůře v BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy. Bakterie *Ps. monteilii* tvořila biofilm po 1 denní kultivaci ve všech médiích téměř totožně. Po 2 denní kultivaci došlo ve všech kultivačních médiích u téměř všech bakterií k nárůstu tvorby biofilmu. K největší tvorbě po 2 denní kultivaci docházelo opět u TSB s 1 % glukózy. Jak je patrné na **grafu 10**, největší rozdíl mezi 1 denní a 2 denní kultivaci vykazovala bakterie *Ps. monteilii* získaná z klinického izolátu. Naopak nejmenší rozdíl ve tvorbě biofilmu po prodloužení doby kultivace měl sbírkový kmen *Ps. aeruginosa* CCM 3955 a u dalšího sbírkového kmene *Ps. aeruginosa* CCM 1960 došlo ve dvou kultivačních médiích k poklesu tvorby biofilmu po prodloužení doby kultivace.

Po 1 a 2 denní kultivaci nejlépe biofilm tvořila klinická bakterie *Ps. aeruginosa* 82A a naopak nejméně biofilm tvořily *Ps. aeruginosa* CCM 1960 a *Ps. aeruginosa* CCM 3955. Bakterie *Ps. monteilii* tvořila biofilm obecně hůře než kmeny bakterií *Ps. aeruginosa*.

**Graf 10** – Tvorba biofilmu testovaných kmenů *Ps. aeruginosa* a *Ps. monteilii* ve vybraných kultivačních médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37° C



Perez *et al.* (2011) hodnotili tvorbu biofilmu *Ps. aeruginosa* u 74 klinických izolátů metodou mikrotitračních destiček dle Stepanović *et al.* (2007) s modifikacemi. Byl použit TSB bujón s 0,25% glukózou. Z 50 biofilm-pozitivních izolátů bylo 48 slabě biofilm-pozitivních a 2 izoláty byly středně biofilm-pozitivních. Podobná studie Perez *et al.* (2013) vyhodnotila jako biofilm pozitivní 85 z 91 klinických bakteriálních izolátů, z toho jich bylo 51 vyhodnoceno jako slabě biofilm-pozitivní, 22 jako středně biofilm-pozitivní a 15 jako silně biofilm-pozitivní. V naší studii tvorby biofilmu byly opět všechny kmeny v TSB s 1 % sacharózy vyhodnoceny jako biofilm-pozitivní. Po 1 denní kultivaci byl jako silně biofilm-pozitivní vyhodnocen 1 kmen, jako středně biofilm-pozitivní 4 kmeny a 1 kmen byl vyhodnocen jako slabě biofilm-pozitivní.

Lima *et al.* (2018) hodnotili tvorbu biofilmu pomocí mikrotitračních destiček v BHI obohaceném sacharózou. Z celkového počtu 31 biofilm-pozitivních klinických izolátů, biofilm produkovalo 17 slabě, 11 středně a 3 silně.

V další obdobné studii Lima *et al.* (2018) hodnotili tvorbu biofilmu v BHI obohaceném sacharózou pomocí mikrotitračních destiček dle Stepanović *et al.* (2007). Z 20 klinických izolátů jich 5 bylo vyhodnoceno jako biofilm-negativní a z biofilm-pozitivních izolátů jich 8 tvořilo biofilm slabě, 5 tvořilo biofilm středně a 2 tvořily biofilm silně. V naší studii byly všechny kmeny bakterie *Ps. aeruginosa* v BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy vyhodnoceny jako biofilm pozitivní. Po 1 denní kultivaci byly 4 kmeny vyhodnoceny jako středně biofilm-pozitivní a 2 jako slabě biofilm-pozitivní.

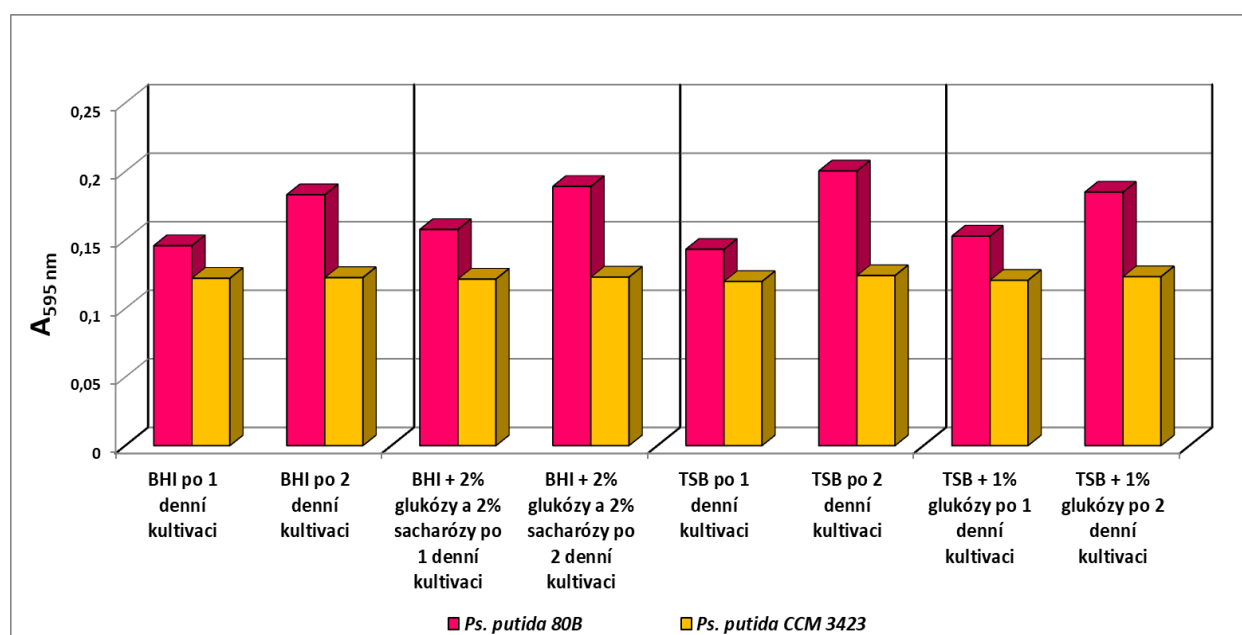
Vatan *et al.* (2018) sledovali tvorbu biofilmu u klinických izolátů, získaných od pacientů se syndromem diabetické nohy, modifikovanou metodou v mikrotitračních destičkách. Tato studie uvádí, že tvorba biofilmu *Ps. aeruginosa* nebyla ovlivněna prodloužením kultivační doby. Naše studie je v rozporu s tímto tvrzením, jelikož jsme zaznamenaly výrazný rozdíl mezi 1 denní a 2 denní kultivací, kdy po prodloužení kultivace došlo k nárůstu tvorby biofilmu téměř u všech kmenů bakterie *Ps. aeruginosa*.

**Graf 11** znázorňuje tvorbu biofilmu kmenů *Ps. putida*. Po 1 denní kultivaci nebyl výrazný rozdíl ve tvorbě biofilmu v závislosti na druhu kultivačního média. Po 2 denní kultivaci došlo k nepatrnému nárůstu hodnoty absorbance u klinického kmenu *Ps. putida* 80B v TSB, ale stále byla tato bakterie vyhodnocena jako slabě biofilm-pozitivní, stejně jako ve všech ostatních kultivačních médiích. Rozdíl v tvorbě biofilmu byl sledován pouze mezi sbírkovým



a klinickým kmenem bakterie *Ps. putida*. Kmen *Ps. putida* 80B získaný z chronické rany, byl ve všech kultivačních médiích vyhodnocen po 1 denní i 2 denní kultivaci jako slabě-biofilm pozitivní a došlo zde k nepatrnému zvýšení tvorby po 2 denní kultivaci. Sbírkový kmen *Ps. putida* CCM 3423 byl jako jediný námi testovaný bakteriální kmen vyhodnocen jako biofilm-negativní ve všech kultivačních médiích a nebyl zde zjištěn žádný rozdíl v tvorbě biofilmu po 1 denní a 2 denní kultivaci.

**Graf 11** – Tvorba biofilmu testovaných kmenů *Ps. putida* ve vybraných kultivačních médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37° C

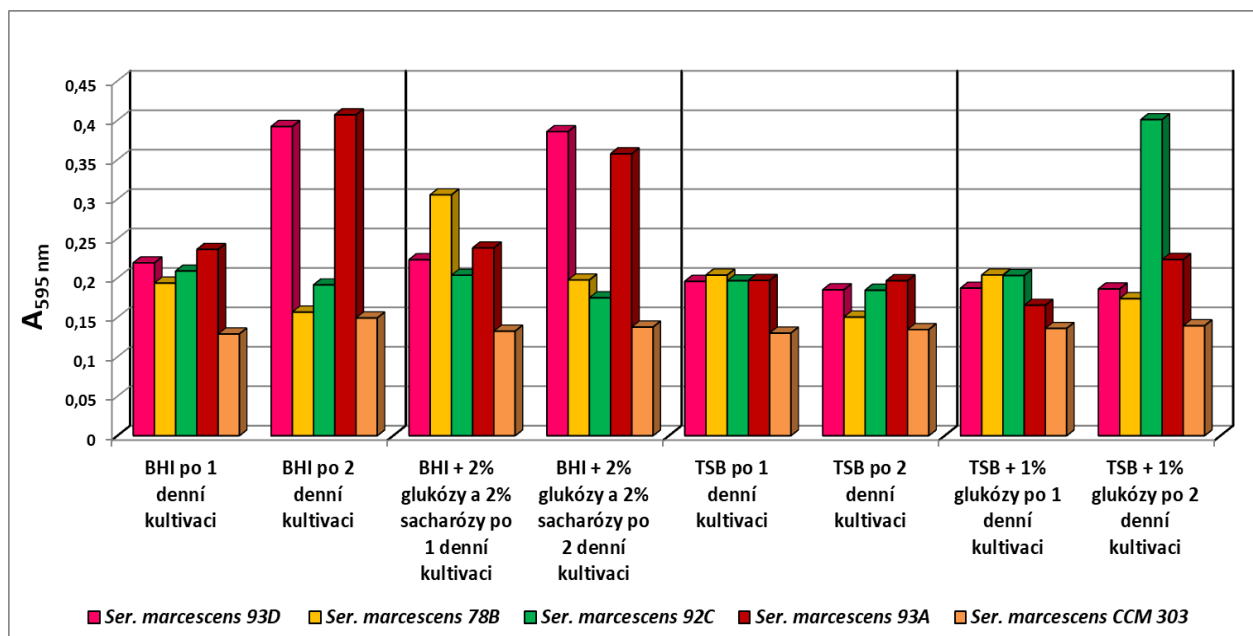


#### 4.3.3 *Serratia marcescens*

Z grafu 12 je patrné, že po 1 denní kultivaci kmenů *Ser. marcescens* došlo k největší tvorbě biofilmu v BHI + 2 % glukózy a 2 % sacharózy, v ostatních kultivačních médiích tvořily kmeny bakterie *Ser. marcescens* biofilm podobně. Po 2 denní kultivaci došlo u klinického izolátu bakterie *Ser. marcescens* 93D k nárůstu tvorby biofilmu ale pouze v BHI a BHI + 2 % glukózy a 2 % sacharózy. K podobnému nárůstu tvorby došlo i u další klinické bakterie *Ser. marcescens* 93A. U *Ser. marcescens* 92C došlo ke zvýšení tvorby biofilmu po 2 denní kultivaci pouze v TSB + 1 % glukózy. Naopak u klinické bakterie *Ser. marcescens* 78B, byl pozorován pokles tvorby biofilmu po 2 denní kultivaci ve všech kultivačních médiích. Nejméně tvořil biofilm sbírkový kmen *Ser. marcescens* CCM 303, u kterého nebyl

pozorován žádný rozdíl ve tvorbě biofilmu v závislosti na druhu kultivačního média nebo doby kulivace.

**Graf 12** – Tvorba biofilmu testovných kmenů *Ser. marcescens* ve vybraných kultivačních médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37° C



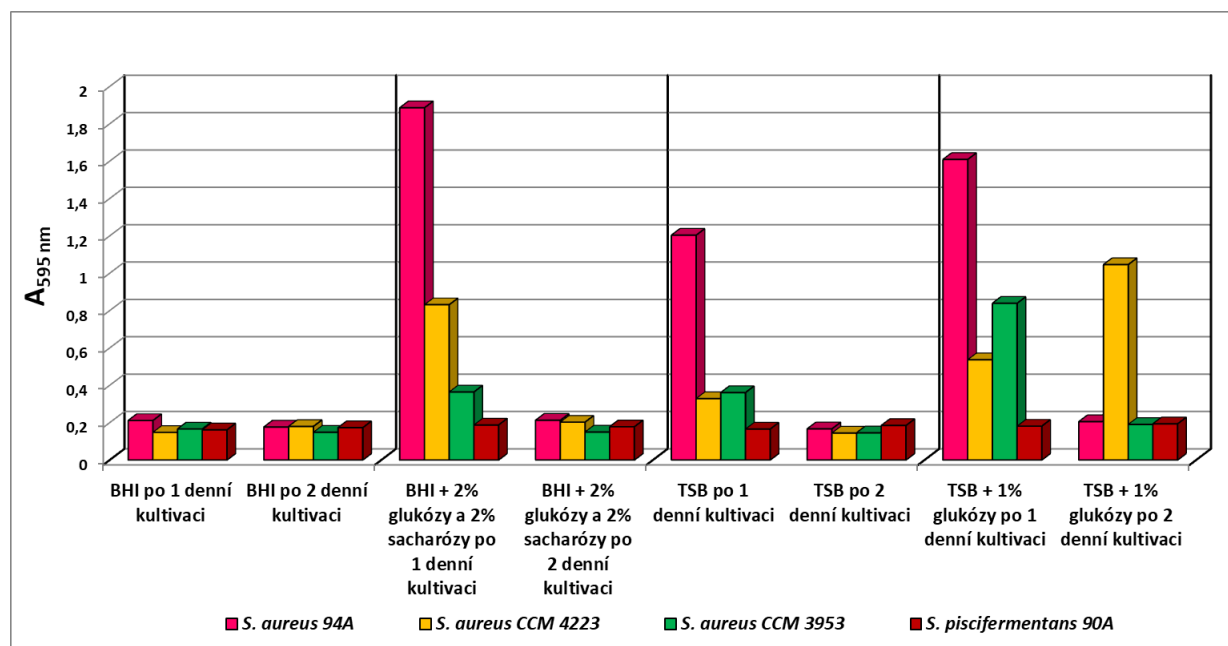
Rice *et al.* (2005) uvádí, že přidavek 0,05 % glukózy a 0,05 % kaseinového hydrolyzátu do kultivačního média, podpořil rychlost růstu biofilmu *Ser. marcescens*. V našem testování došlo k nárůstu tvorby biofilmu po 2 denní kultivaci více v kultivačních médiích s přidavkem glukózy než v médiích bez přidavku.

#### 4.3.4 *Staphylococcus* spp.

**Graf 13** znázorňuje tvorbu biofilmu klinického izolátu a sbírkových kmenů bakterie *S. aureus* a klinické bakterie *S. piscifermentans* po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37° C. Z grafu 13 je patrné, že k největší tvorbě biofilmu po 1 denní kultivaci došlo u bakterie *S. aureus* 94A. Po 2 denní kultivaci došlo k výraznému poklesu biofilmu u této bakterie a to ze silně biofilm-pozitivní na slabě biofilm-pozitivní. K podobnému poklesu došlo i u sbírkového kmene *S. aureus* CCM 4223, pouze v TSB s 1 % glukózy došlo k nárůstu tvorby po prodloužení kultivace. Sbírkový kmen *S. aureus* CCM 4223 tvořil biofilm ze všech testovaných stafylokoků nejlépe a naopak klinický izolát *S. piscifermentans* 90A byl ve všech

kultivačních médiích vyhodnocen jako slabě biofilm-pozitivní. Nejčastěji biofilm tvořily všechny bakterie v BHI, kde byly po 1 denní i 2 denní kultivaci vyhodnoceny jako slabě biofilm-pozitivní.

**Graf 13** – Tvorba biofilmu testovaných kmenů *Staphylococcus* spp. ve vybraných kultivačních médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37° C



Knobloch *et al.* (2002) stanovovali tvorbu biofilmu u 128 izolátů bakterie *S. aureus* pomocí metody mikrotitračních destiček a po 1 denní kultivaci v TSB byly pouze 4 izoláty stanoveny jako biofilm-pozitivní. Po přidání 1 % glukózy bylo jako biofilm-pozitivních stanoveno 49 klinických izolátů. V BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy bylo stanoveno jako biofilm-pozitivních 43 izolátů *S. aureus*.

Také Mathur *et al.* (2006) hodnotili pomocí metody mikrotitračních destiček tvorbu biofilmu u 152 klinických izolátů bakterie *Staphylococcus* spp. a o 1 denní kultivaci v TSB vyhodnotili pouze 7 izolátů jako biofilm-pozitivní. Po přidání 1 % glukózy se počet biofilm-pozitivních izolátů zvýšil. Jako silně biofilm-pozitivních bylo vyhodnoceno 22 izolátů, středně biofilm-pozitivních 60 izolátů a slabě biofilm-pozitivních 70 izolátů.

Tiwari *et al.* (2018) hodnotili tvorbu biofilmu 89 izolátů z chronických ran pomocí metody mikrotitračních destiček po 1 denní kultivaci v TSB + 2 % glukózy. Ze všech izolátů bakterie *S. aureus* tvořilo 33 biofilm silně, 21 tvořilo biofilm středně, 25 tvořilo biofilm pouze slabě a 10 biofilm netvořilo vůbec.

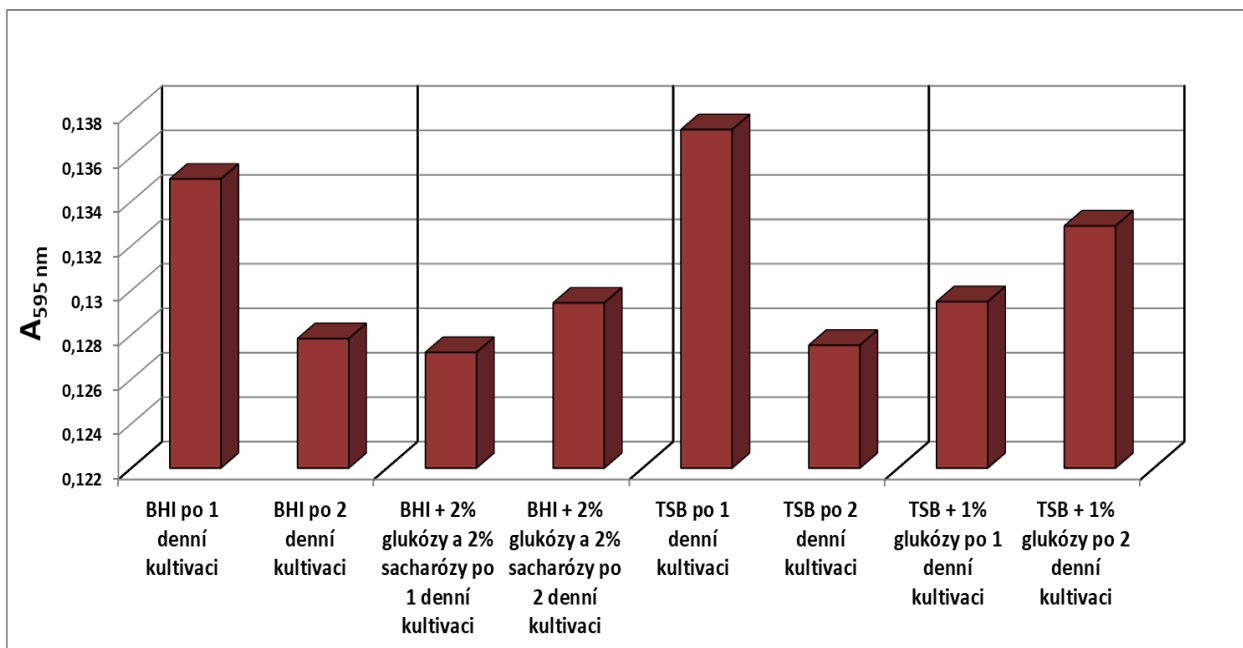
Becker *et al.* (2018) sledovali tvorbu biofilmu u 126 klinických izolátů bakterie *S. aureus* a celkem 36,5 % izolátů bakterie *S. aureus* patřilo mezi silné producenty biofilmu, 46,8 % mezi mírné producenty biofilmu a 16,7 % izolátů biofilm netvořilo.

V naší studii jsme měli pouze 1 kmen bakterie *S. aureus* a 1 kmen *S. piscifermentans* získané z izolátů z chronických ran. Naše studie navazovala na předchozí diplomovou práci, kde byly testovány další kmeny *S. aureus* (Jemelková, 2018). Bakterie *S. aureus* 94A byla po 1 denní kultivaci v TSB s 1 % glukózy vyhodnocena jako silně biofilm-pozitivní a *S. piscifermentans* 90A jako slabě biofilm-pozitivní. Sbírkové kmeny *S. aureus* byly vyhodnoceny jako silně biofilm-pozitivní. Jak znázorňuje **graf 13**, po obohacení TSB glukózou a BHI glukózou a sacharózou došlo také v naší studii ke zvýšení tvorby biofilmu u všech kmenů *S. aureus*.

#### **4.3.5 *Moraxella osloensis***

Tvorbu biofilmu u bakterie *Moraxella osloensis*, získanou z izolátu z chronických ran, zobrazuje **graf 14**. U této bakterie byla tvorba biofilmu, hned po sbírkové bakterii *Ps. putida* CCM 3423, nejmenší. Po 1 denní kultivaci byla největší tvorba biofilmu v TSB a BHI, po 2 denní kultivaci však došlo k poklesu biofilmu v těchto médiích. Naopak v kultivačních médiích obohacených glukózou a sacharózou došlo po prodloužené kultivaci k zvýšené tvorbě biofilmu. Tvorba biofilmu měla být původně porovnána i se sbírkovým kmenem *M. osloensis*, který se uchovával zamražený. Po rozmražení a následné izolaci byla zjištěna kontaminace bakteriální kultury, kmen *M. osloensis* se v zamraženém izolátu nevyskytoval a proto jsme nemohli tvorbu biofilmu porovnat.

**Graf 14** – Tvorba biofilmu testovaného kmene *Moraxella osloensis* ve vybraných kultivačních médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37° C



## 5 ZÁVĚR

Mikroorganismy žijící v biofilmu jsou spojeny s chronickými a opakujícími se infekcemi, které jsou vysoce rezistentní na antimikrobiální léčbu. Tvorba biofilmu je u mikroorganismů důležitým faktorem patogenity, a proto je sledování této schopnosti velice významné.

K detekci tvorby biofilmu je možné využít mnoha metod, avšak k nejpoužívanějším metodám patří zkumavková metoda nebo metoda v mikrotitračních destičkách. V této práci byla k detekci biofilmu použita Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách, která je oblíbená pro svoji rychlost a jednoduchost. Touto metodou lze detekovat biofilm u několika bakteriálních kmenů najednou, ve více kultivačních médiích. Nevýhodou této metody je sledování tvorby biofilmu pouze v umělém prostředí mikrotitračních destiček a výsledky se tedy mohou lišit od reálného prostředí chronických ran.

V této práci jsme sledovaly tvorbu biofilmu ve čtyřech kultivačních médiích, u klinických izolátů z chronických ran, zahrnující kmeny *Moraxella osloensis*, *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus piscifermentans*. Dále byla sledována tvorba biofilmu u sbírkových kmenů, která byla následně porovnána s tvorbou u klinických izolátů stejného druhu.

Kromě *Moraxella osloensis* 93B a *Pseudomonas putida* CCM 3423, byly jako biofilm-pozitivní vyhodnoceny všechny testované kmeny. Po 2 denní kultivaci byla tvorba biofilmu u většiny kmenů větší a prodloužení kultivace mělo tedy vliv na tvorbu biofilmu s výjimkou testovaných kmenů *Staphylococcus* spp., u kterých po prodloužené kultivaci docházelo k výraznému poklesu tvorby biofilmu. Pokles byl nejspíše způsoben odlučováním svrchní části biofilmu po prodloužené kultivaci. Dále z výsledků této práce vyplývá, že klinické izoláty vytváří biofilm lépe než sbírkové kmeny stejného druhu.

Dále jsme se v této práci pokusily stanovit tvorbu polymikrobiálního biofilmu u bakterií *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Ve většině testovacích médií byla tvorba polymikrobiálního biofilmu rozdílná oproti monomikrobiálnímu biofilmu a tento výsledek značí, že má směsná kultivace vliv na tvorbu biofilmu. Ke zvýšené tvorbě biofilmu oproti monomikrobiálnímu biofilmu došlo hlavně po 2 denní kultivaci. Jelikož je značná část infekcí spojená s polymikrobiálními biofilmy a většina dosavadních studií tvorby biofilmu se zabývá pouze detekcí monomikrobiálního biofilmu, bylo by vhodné se při dalším testování zaměřit právě na detekci polymikrobiálního biofilmu.

## 6 ZDROJE

- ABISADO, R. G., BENOMAR, S., KLAUS, J. R., DANDEKAR, A. A., CHANDLER, J. R. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. *mBio*, 2018, 9 (3), e02331-17.
- ALHAZMI, A. *Pseudomonas aeruginosa*—Pathogenesis and pathogenic mechanisms. *International journal of biology*, 2015, 7 (2).
- ALVES, P. M., AL-BADI, E., WITHYCOMBE, C., JONES, P. M., PURDY, K. J., MADDOCKS, S. E. Interaction between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is beneficial for colonisation and pathogenicity in a mixed biofilm. *Pathogens and disease*, 2018, 76 (1), fty003.
- ARMBRUSTER, CH. E., HONG, W., PANG, B., WEIMER, K. E. D., JUNEUR, R. A. Indirect pathogenicity of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in polymicrobial otitis media occurs via interspecies quorum signaling. *MBio*, 2010, 1 (3), e00102-10.
- AZZAM, K., PARVAZI, J., JUNDKIND, D., HANSSSEN, A., FEHRING, T., SPRINGER, B., BOZIC, K., DELLA, V., PULIDO, L., BARRACK, R. Microbiological, clinical, and surgical features of fungal prosthetic joint infections: a multi-institutional experience. *JBJS*, 2009, 91 (6), 142-149.
- BADER, M. S. Diabetic foot infection. *Am Fam Physician*, 2008, 78 (1), 71-79.
- BAKKIYARAJ, D., SIVASANKAR, CH., PANDIAN, S. K. Inhibition of quorum sensing regulated biofilm formation in *Serratia marcescens* causing nosocomial infections. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2012, 22 (9), 3089-3094.
- BASELGA, R., ALBIZU, I., AMORENA, B. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Veterinary microbiology*, 1994, 39 (3-4), 195-204.
- BECKER, A. P., DIAS, C., MACEDO, A. J. Biofilm formation in clinical isolates of *S. aureus* is associated with presence of device and dissemination of infection. *Journal of clinical & diagnostic research*, 2018, 12 (6).
- BENDOUAH, Z., BARBEAU, J., HAMAD, W. A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, 2006, 134 (6), 991-996.
- BEEKEN, K. E., BLEVINS, J. S., SMELTZER, M. S. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infection and immunity*, 2003, 71 (7), 4206-4211.

- BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *Apmis*, 2013, 121, 1-58.
- BROOKFIELD, J. F. Y. Quorum sensing and group selection. *Evolution*, 1998, 52 (5), 1263-1269.
- BURMØLLE, M., WEBB, J. S., RAO, D., HANSEN, L. H., SØRENSEN, S. J., KJELLEBERG, S. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 2006, 72 (6), 3916-3923.
- CARBONELL, G. V., COLLETA, D., YANO, T., DARINY, A. L. C., LEVY, C. E., FONSECA, B. A. L. Clinical relevance and virulence factors of pigmented *Serratia marcescens*. *FEMS immunology & medical microbiology*, 2000, 28 (2), 143-149.
- CORNFORTH, D. M., POPAT, R., MCNALLY, L., GURNEY, J., SCOTT-PHILLIPS, T. C., IVENS, A., DIGGLE, S. P., BROWN, S. P. Combinatorial quorum sensing allows bacteria to resolve their social and physical environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111 (11), 4280-4284.
- COLVIN, K. M., IRIE, Y., TART, K. S., URBANO, R., WHITNEY, J. C., RYDER, C., HOWELL, L., WOZNIAK, D. J., PARSEK, M. R. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environmental microbiology*, 2012, 14 (8), 1913-1928.
- COSTERTON, J. W., STEWART, P. S., GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, 284 (5418), 1318-1322.
- COSTERTON, W., VEEH, R., SHIRTLIFF, M., PASMORE, M., POST, CH., EHRLICH, G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *The Journal of clinical investigation*, 2003, 112 (10), 1466-1477.
- CUGINI, C., CALFEE, M. W., FARROW, J. M., MORALES, D. K., PESCI, E. C., HOGAN, D. A. Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 2007, 65 (4), 896-906.
- DANIELS, R., VANDERLEYDEN, J., MICHIELS, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 2004, 28 (3), 261-289.
- DEIGHTON, M. A., CAPSTICK, J., DOMALEWSKI, E., NGUYEN, T. V. Methods for studying biofilms produced by *staphylococcus epidermidis*. *Methods in enzymology*. Academic Press, 2001, 336 (17), 177-195.
- DELEON, S., CLINTON, A., FOWLER, H., EVERETT, J., HORSWILL, A. R., RAMBAUGH, K. P. Synergistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an in vitro wound model. *Infection and immunity*, 2014, 82 (11), 4718-4728.
- DIETRICH, L.E.P., PRICE-WHELAN, A., WHITELEY, M., NEWMAN, D. K. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 2006, 61 (5), 1308-1321



- DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 2002, 8 (9), 881.
- DONLAN, R. M., COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 2002, 15 (2), 167-193.
- DOWD, Scot E., et al. Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *PloS one*, 2008, 3 (10) e3326.
- DUAN, K., WOLCOTT, R. D., DUN, Y., MCKEEHAN, T., SMITH, E., RHOADS, D. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Molecular microbiology*, 2003, 50 (5), 1477-1491.
- ELIAS, S, BANIN, E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS microbiology reviews*, 2012, 36 (5), 990-1004.
- FAZLI, M., BJARNSHOLT, T., KIRKETERP-MOLLER, K., JORGENSEN, B., ANDERSEN, A. S., KROGFELT, K. A., GIVSKOV, M., TOLKER-NIELSEN, T. Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *Journal of clinical microbiology*, 2009, 47 (12), 4084-4089.
- FRANK, D. N., WYSOCKI, A., SPECHT-GLICK, D. D., ROONEY, A., FELDMAN, R. A., AMAND, A. L. S., PACE, N. R., TRENT, J. D. Microbial diversity in chronic open wounds. *Wound repair and regeneration*, 2009, 17 (2), 163-172.
- FUX, C. A., COSTERNOT, J. W., STEWARD, P. S., STOODLEY, P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology*, 2005, 13 (1), 34-40.
- GJØDSBØL, K., CHRISTENSEN, J. J., KARLSMARK, T., JØRGENSEN, B., KLEIN, B. M., KROGFELT, K. A.. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *International wound journal*, 2006, 3 (3), 225-231.
- GONTCHAROVA, V., YOUN, E., SUN, Y., WOLCOTT, R. D., DOWD, S. E. A comparison of bacterial composition in diabetic ulcers and contralateral intact skin. *The open microbiology journal*, 2010, 4, 8-19.
- GOVAN, J. R., DERETIC, V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological reviews*, 1996, 60 (3), 539-574.
- HOFFMAN, L. R., DÉZIEL, E., D'ARGENIO, D. A., LÉPINE, F., EMERSON, J., MCNAMARA, S., GIBSON, R. L., RAMSEY, B. W., MILLER, S. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103 (52), 19890-19895.
- HOGAN, D. A., KOLTER, R. *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science*, 2002, 296 (5576), 2229-2232.
- HOGG, J. S., HU, F. Z., JANTO, B., BOISSY, R., HAYES, J., KEEFE, R., POST, J. CH., EHRICH, G. D. Characterization and modeling of the *Haemophilus influenzae* core and

- supragenomes based on the complete genomic sequences of Rd and 12 clinical nontypeable strains. *Genome biology*, 2007, 8 (6), 103.
- CHRISTENSEN, G. D., SIMPSON, W. A., YOUNGER, J. J., BARRETT, F. F., MELTON, D. M., BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, 1985, 22 (6), 996-1006.
- CHRISTENSEN, G. D., SIMPSON, W. A., BISNO, A. L., BEACHEY, E. H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and immunity*, 1982, 37 (1), 318-326.
- IWASE, T., UEHARA, Y., SHINJI, H., TAJIMA, A., SEO, H., TAKADA, K., TOSHIHIKO, A., MIZUNOE, Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*, 2010, 465 (7296), 346-349.
- JACOB, M. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology*, 2006, 94 (1), 1-9.
- JAMAL, M., TASNEEN, U., ANDLEEB, S. Bacterial biofilm: its composition, formation and role in human infections. *Research & reviews: Journal of mikrobiology and biotechnology*, 2015, 4 (3), 1-15.
- KAPLAN, J. B., RAGUNATH, CH., VELLIYAGOUNDER, K., FINE, D. H., RAMASUBBU, N. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2004, 48 (7), 2633-2636.
- KESSLER, E., SAFRIN, M., OLSON, J. C., OHMAN, D. E. Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *Journal of biological chemistry*, 1993, 268 (10), 7503-7508.
- KNOBLOCH, J. K. M., HORSTKOTTE, M. A., ROHDE, H., MACK, D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical microbiology and immunology*, 2002, 191 (2), 101-106.
- KONG, E. F., TSUI, CH., KUCHARÍKOVÁ, S., ANDES, D., DIJCK, P. V., JABRA-RIZK, M. A. Commensal protection of *Staphylococcus aureus* against antimicrobials by *Candida albicans* biofilm matrix. *MBio*, 2016, 7 (5), e01365-16.
- KORGAONKAR, A. K., WHITELEY, M. *Pseudomonas aeruginosa* enhances production of an antimicrobial in response to N-acetylglucosamine and peptidoglycan. *Journal of bacteriology*, 2011, 193 (4), 909-917.
- KURAMITSU, H- K., HE, X., LUX, R., ANDERSON, M. H., SHI, W. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2007, 71 (4), 653-670.
- LABBATE, M., QUECK, S. Y., KOH, K. S., RICE, S. A., GIVSKOV, M., KJELLBERG, S. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of bacteriology*, 2004, 186 (3), 692-698.

- LEAR, G., LEWIS, G. D. Microbial biofilms: current research and applications. *Horizon Scientific Press*, 2012.
- LEE, K., LEE, K. M., KIM, D., YOON, S. S. Molecular determinants of the matrix thickening of a dual-species *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* biofilm. *Applied and environmental microbiology*, 2017, 83 (21), e01182-17.
- LIMA, J. L. C., ALVES, L. R., PAZ, P. J. N., RABELO, M. A., MACIEL, M. A. V., MORAIS, D. M. M. Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-associated pneumonia. *Revista Brasileira de terapia intensiva*, 2017, 29 (3), 310-316.
- LIMA, J. L. C., ALVES, L. R., JACOME, P. R. L. A., BEZZERA NETO, J. P., MACIEL, M. A. V., MORAIS, M. M. C. Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. *Brazilian journal of infectious diseases*, 2018, 22 (2), 129-136.
- LISTER, J. L., HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2014, 4(178).
- LUTHER, M. K, Parente, D. M, Caffrey, A. R, Daffinee, K, Lopes, V. V, Martin, E. T, LaPlante, K. L. Clinical and genetic risk factors for biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018, 62 (5), e02252-17.
- LU, T. K., COLLINS, J. J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104 (27), 11197-11202.
- MAHLEN, S. D. *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clinical microbiology reviews*, 2011, 24 (4), 755-791.
- MAJTAN, J., BOHOVA, J., HORNIACKOVA, M., KLAUDINY, J., MAJTAN, V. Antibiofilm effects of honey against wound pathogens *Proteus mirabilis* and *Enterobacter cloacae*. *Phytotherapy research*, 2014, 28 (1), 69-75.
- MANDSBERG, L. F., CIOFU, O., KIRKBY, N., PHILIPSEN, K. R., HOIBI, N. Development of antibiotic resistance in weak *Pseudomonas aeruginosa* mutators with impaired DNA oxidative repair system. *Abstracts book of The International symposium and the 43rd ESCMID post-graduate course-Bacterial Adaptation Mechanisms: Biofilms, Hypermutability and antibiotic Resistance*. 2007, 52.
- MANSITO, T. B., FALCÓN, M. A., MORENO, J., CARNICERO, A., GUTIERREZ-NAVARRO, A. M. Effects of staphylolytic enzymes from *Pseudomonas aeruginosa* on the growth and ultrastructure of *Staphylococcus aureus*. *Microbios*, 1987, 49 (198), 55-64.
- MADSEN, J. S., BURMOLLE, M., HANSEN, L. H., SORENSEN, S. J. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS immunology & medical microbiology*, 2012, 65 (2), 183-195.
- MALIK, A., MOHAMMAD, Z., AHMAD, J. The diabetic foot infections: biofilms and antimicrobial resistance. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 2013, 7 (2), 101-107.

- MALONE, M., BJARNSHOLD, T., MCBAIN, A. J., JAMES, G. A., STOODLEY, P., LEAPER, D., TACHI, M., SCHULTS, G., SWANSON, T., WOLCOTT, R. D. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *Journal of wound care*, 2017, 26 (1), 20-25.
- MATHUR, T., SINGHAL, S., KHAN, S., UPADHYAY, D. J., FATMA, T., RATTAN, A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. *Indian journal of medical microbiology*, 2006, 24 (1), 25.
- MCALESTER, G., O'GARA, F., MORRISSEY, J. P. Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *Journal of medical microbiology*, 2008, 57 (5), 563-569.
- MOORMEIER, D. E., Bayles, K. W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular microbiology*. 2017, 104 (3), 365-76.
- MORALES, D. K., GRAHL, N., OKEGBE, CH., DIETRICH, L. E. P., JACOBS, N. J., HOGAN, D. A. Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *MBio*, 2013, 4 (1), e00526-12.
- MORGENSTEIN, R. M., SZOSTEK, B., RATHER, P. N. Regulation of gene expression during swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *FEMS microbiology reviews*, 2010, 34 (5), 753-763.
- MORRIS, N. S., STICKLER, D. J., MCLEAN, R. J. C. The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. *World journal of urology*, 1999, 17 (6), 345-350.
- MOROHOSHI, T., SHIONO, T., TAKIDOUCI, K., KATO, M., KATO, J., IKEDA, T. Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by synthetic analogs of N-acylhomoserine lactone. *Applied and environmental microbiology*, 2007, 73 (20), 6339-6344.
- MOTTOLA, C., MENDES, J. J., CRISTINO, J. M., CAVACO-SILVA, P., TAVARES, L., OLIVEIRA, M. Polymicrobial biofilms by diabetic foot clinical isolates. *Folia microbiologica*, 2016, 61 (1), 35-43.
- MUSTOE, T. A., O'SHAUGHNESSY, K., KLOETERS, O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plastic and reconstructive surgery*, 2006, 117 (7), 35S-41S.
- NABLO, B. J., ROTHROCK, A. R.; SCHOENFISCH, M. H. Nitric oxide-releasing sol-gels as antibacterial coatings for orthopedic implants. *Biomaterials*, 2005, 26 (8), 917-924.
- NETT, J. E. Future directions for anti-biofilm therapeutics targeting *Candida*. *Expert review of anti-infective therapy*, 2014, 12 (3), 375-382.
- OTTO, M. *Staphylococcal* infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual review of medicine*, 2013, 64, 175-188.
- PARSEK, M. R., GREENBERG, E. P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97 (16), 8789-8793.

- PARSEK, M.R. and Singh, P.K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual review of microbiology*, 2003, 57, 677-701.
- PASTAR, I., NUSBAUM, A. G., GIL, J., PATEL, S. B., CHEN, J., VALDES, J., STOJADINOVIC, O., PLANO, L. R., TOMIC-CANIC, M., DAVIS, S. C. Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PloS one*, 2013, 8 (2), e56846.
- PERCIVAL, S. L., SULEMAN, L., VUOTTO, C., DONELLI, G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *Journal of medical microbiology*, 2015, 64 (4), 323-334.
- PEREZ, L. R. R., COSTA, M. C. N., FREITAS, A. L. P., BARTH, A. L. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Brazilian journal of microbiology*, 2011, 42 (2), 476-479.
- PEREZ, L. R. R., MACHADO, A. B. M. P., BARTH, A. L. The presence of quorum-sensing genes in *Pseudomonas* isolates infecting cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Current microbiology*, 2013, 66 (4), 418-420.
- PETERS, B. M., OVCHINNIKOVA, E. S., KROM, B. P., SCHLECHT, L. M., ZHOU, H., HOYER, L. L., BUSSCHER, H. J., MEY, H. C., JABRA-RIZK, M. A., SHIRTLIFF, M. E. *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. *Microbiology*, 2012 a, 158 (12), 2975-2986.
- PETERS, B. M., JABRA-RIZK, M. A., O'MAY, G. A., COSTERTON, J. W., SHIRTLIFF, M. E. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clinical microbiology reviews*, 2012 b, 25 (1), 193-213.
- PUGAZHENDHI, S., DORAIRAJ, A. P. Appraisal of biofilm formation in diabetic foot infections by comparing phenotypic methods with the ultrastructural analysis. *The journal of foot and ankle surgery*, 2018, 57 (2), 309-315.
- QIN, Z., YANG, L., QU, D., MOLIN, S., TOLKER-NIELSEN, T. *Pseudomonas aeruginosa* extracellular products inhibit *staphylococcal* growth, and disrupt established biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 2009, 155 (7), 2148-2156.
- RADLINSKI, L., ROWE, S. E., KARTCHNER, L. B., MAILE, R., CAIRNS, B. A., VITKO, N. P., GODE, C. J., LACHIEWICZ, A. M., WOLFGANG, M. C., CONLON, B. P. *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts determine antibiotic efficacy against *Staphylococcus aureus*. *PLoS biology*, 2017, 15 (11), e2003981.
- RAHIM, K., SALEHA, S., ZHU, X., HUO, L., BASIT, A., FRANCO, O. L. Bacterial contribution in chronicity of wounds. *Microbial ecology*, 2017, 73 (3), 710-721.
- RAMSEY, M. M., WHITELEY, M. Polymicrobial interactions stimulate resistance to host innate immunity through metabolite perception. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106 (5), 1578-1583.
- READING, N. C., SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS microbiology letters*, 2005, 254 (1), 1-11.

- RHOADS, D. D., COX, S. B., REES, E. J., SUN, Y., WOLCOTT, R. D. Clinical identification of bacteria in human chronic wound infections: culturing vs. 16S ribosomal DNA sequencing. *BMC infectious diseases*, 2012, 12 (1), 321.
- RICE, S. A., KOH, K. S., QUECK, S. Y., LABBATE, M., LAM, K. W., KJELLEBERG, S. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *Journal of bacteriology*, 2005, 187 (10), 3477-3485.
- RICKARD, A. H., GILBERT, P., HIGH, N. J., KOLEBRANDER, P. E., HANDLEY, P. S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in microbiology*, 2003, 11 (2), 94-100.
- RICKARD, A. H., COLACINO, K. R., MANTON, K. M., PULCINI, E., PFEIL, J., RHOADS, D., WOLCOTT, R. D., JAMES, G. Production of cell-cell signalling molecules by bacteria isolated from human chronic wounds. *Journal of applied microbiology*, 2010, 108 (5), 1509-1522.
- ROHDE, H., BURANDT, E. C., SIEMSEN, N., FROMMELT, L., BURDELSKI, CH., WURSTER, S., SCHERPE, S., DAVIES, A. P., HARRIS, L. G., HORTKOTTE, M. A., KNOBLOCH, K. M., RAGUNATH, CH., KAPLAN, J. B., MACK, D. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials*, 2007, 28 (9), 1711-1720.
- RÓŻAŁSKI, A., TORZEWSKA, A., MORYL, M., KWIL, I., MASZEWSKA, A., OSTROWSKA, K., DRZEWIECKA, D., ZABLOTNI, A., PALUSIAK, A., SIVIŃSKA, M., STACZEK, P. *Proteus* sp.—an opportunistic bacterial pathogen—classification, swarming growth, clinical significance and virulence factors. *Folia biologica et oecologica*, 2012, 8 (1), 1-17.
- RUTHERFORD, S. T., BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold spring harbor perspectives in medicine*, 2012, 2 (11), a012427.
- RYDER, C., BYRD, M., WOZNIAK, D. J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current opinion in microbiology*, 2007, 10 (6), 644-648.
- SÁNCHEZ, C. J., MENDE, K., BECKIUS, M. L., AKERS, K. S., ROMANO, D. R., WENKE, J. C., MURRAY, C. K. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC infectious diseases*, 2013, 13 (1), 47.
- SEKHAR, S., KUMAR, R., CHAKRABORTI, A. Role of biofilm formation in the persistent colonization of *Haemophilus influenzae* in children from northern India. *Journal of medical microbiology*, 2009, 58 (11), 1428-1432.
- SMITH, A. C., RICE, A., SUTTON, B., GABRILSKA, R., WESSEL, A. K., WHITELEY, M., RUMBAUGHT, K. P. Albumin inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and alters polymicrobial interactions. *Infection and immunity*, 2017, 85 (9), e00116-17.

- STEPANOVIĆ, S., VUKOVIĆ, D., DAKIĆ, I., SAVIĆ, B., ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 2000, 40 (2), 175-179.
- STEPANOVIĆ, S., VUKOVIĆ, D., HOLA, V., BONAVENTURA, G., DJUKIĆ, S., ĆIRKOVIĆ, I., RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. *Apmis*, 2007, 115 (8), 891-899.
- TAKAHASHI, G. W., MONTGOMERY, R. B., STAHL, W. L., CRITTENDEN, C. A., VALENTINE, M. A., THORNING, D. R., ANDREWS, D. F., LILLY, M. B. Pentoxifylline inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated cytotoxicity and cytostasis in L929 murine fibrosarcoma cells. *International journal of immunopharmacology*, 1994, 16 (9), 723-736.
- TANDE, A. J., OSMON, D. R., GREENWOOD-QUAINTANCE, K. E., MABRY, T. M., HANSEN, A. D., PATEL, R. Clinical characteristics and outcomes of prosthetic joint infection caused by small colony variant *staphylococci*. *MBio*, 2014, 5 (5), e01910-14.
- TIWARI S., RAJAK, S., MONDAL, D. P., BISWAS, D. Sodium hypochlorite is more effective than 70% ethanol against biofilms of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *American journal of infection control*. 2018, 46 (6), 37-42.
- TSUCHIMORI, N., HAYASHI, R., SHINO, A., YAMAZAKI, T., OKONOJI, K. *Enterococcus faecalis* aggravates pyelonephritis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in experimental ascending mixed urinary tract infection in mice. *Infection and immunity*, 1994, 62 (10), 4534-4541.
- TUTTLE, M. S., MOSTOW, E., MUKHERJEE, P., HU, F. Z., MELTON-KREFT, R., EHRLICH, G. D., DOWD, S. E., GHANNOUM, M. A. Characterization of bacterial communities in venous insufficiency wounds using conventional culture and molecular diagnostic methods. *Journal of clinical microbiology*, 2011, 49 (11), e00847-11.
- VATAN, A., SALTOGLU, N., YEMISEN, M., BALKAN, I. I., SURME, S., DEMIRAY, T., METE, B., TABAK, F. Association between biofilm and multi/extensive drug resistance in diabetic foot infection. *International journal of clinical practice*, 2018, 72 (3), e13060.
- VON EIFF, CH., JANSEN, B., KOHNEN, W., BECKER, K. Infections associated with medical devices. *Drugs*, 2005, 65 (2), 179-214.
- WEIMER, K. E. D., JUNEAU, R. A., MURRAH, K. A., PANG, B., ARMBRUSTER, CH. E., RICHARDSON, S. H., SWORDS, W. E. Divergent mechanisms for passive pneumococcal resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in the presence of *Haemophilus influenzae*. *Journal of infectious diseases*, 2011, 203 (4), 549-555.
- WEI, Y., LAI, H., CHEN, S., YEH, M., CHANG, J. Biosurfactant production by *Serratia marcescens* SS-1 and its isogenic strain SM $\Delta$ R defective in SpnR, a quorum-sensing LuxR family protein. *Biotechnology letters*, 2004, 26 (10), 799-802.
- WESTGATE, S. J., PERCIVAL, S. L., KNOTTENBELT, D. T., CLEGG, P. D., COCHRANE, C. A. Microbiology of equine wounds and evidence of bacterial biofilms. *Veterinary microbiology*, 2011, 150 (1-2), 152-159.

WILLEY, J. M., SHERWOOD, L. M., WOOLVERTON, CH. J.. *Prescott, Harley, and Klein's microbiology*. New York: McGraw-Hill Higher Education, 2008, ISBN 978-00-729-9291-5

WOLCOTT, R. D., RHOADS, D. D., DOWD, S. E. Biofilms and chronic wound inflammation. *Journal of wound care*, 2008, 17 (8), 333-341.

WOLCOTT, R., COSTERTON, J. W., RAOULT, D., CUTLER, S. J. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clinical microbiology and infection*, 2013, 19 (2), 107-112.

ZHU, P., LI, M. Recent progresses on AI-2 bacterial quorum sensing inhibitors. *Current medicinal chemistry*, 2012, 19 (2), 174-186.

ZUBAIR, M., MALIK, A., AHMAD, J., RIZVI, M., FAROOQUI, K. J., RIZVI, M. W. A study of biofilm production by gram-negative organisms isolated from diabetic foot ulcer patients. *Biol Med*, 2011, 3 (2), 147-57.

### **Internetové zdroje**

WWW.PODIATRYTODAY.COM

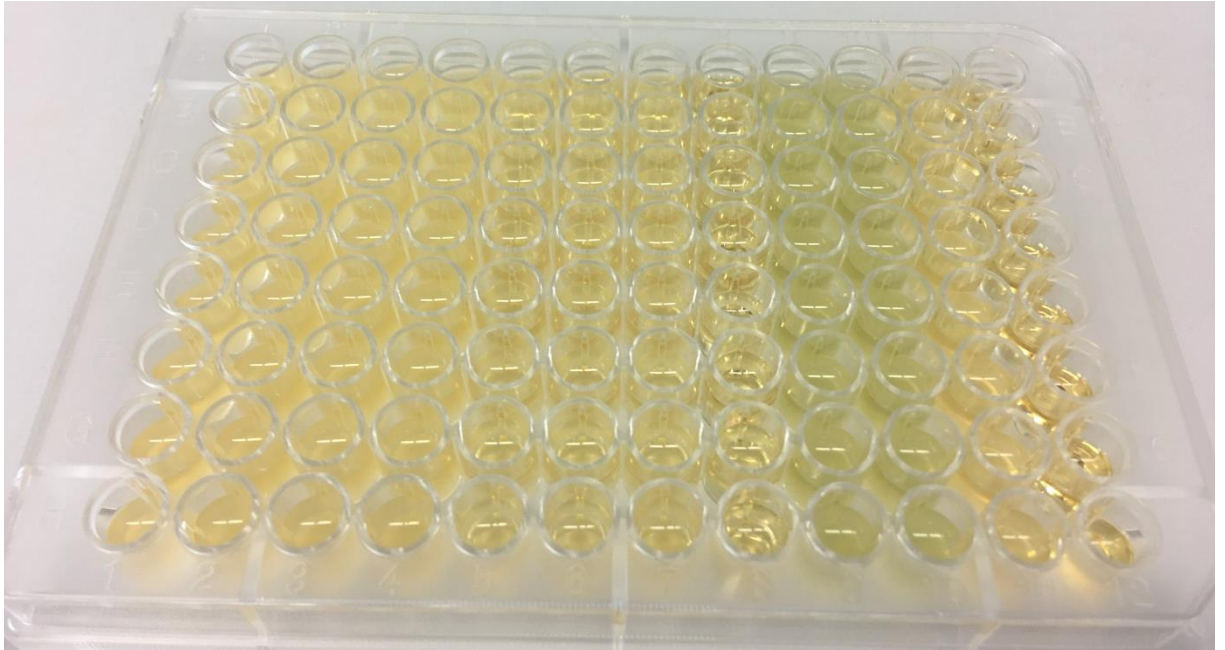
Dostupné z: <https://www.podiatrytoday.com/can-probiotics-facilitate-healing-diabetic-foot-ulcers> [cit. 2018-09-20].



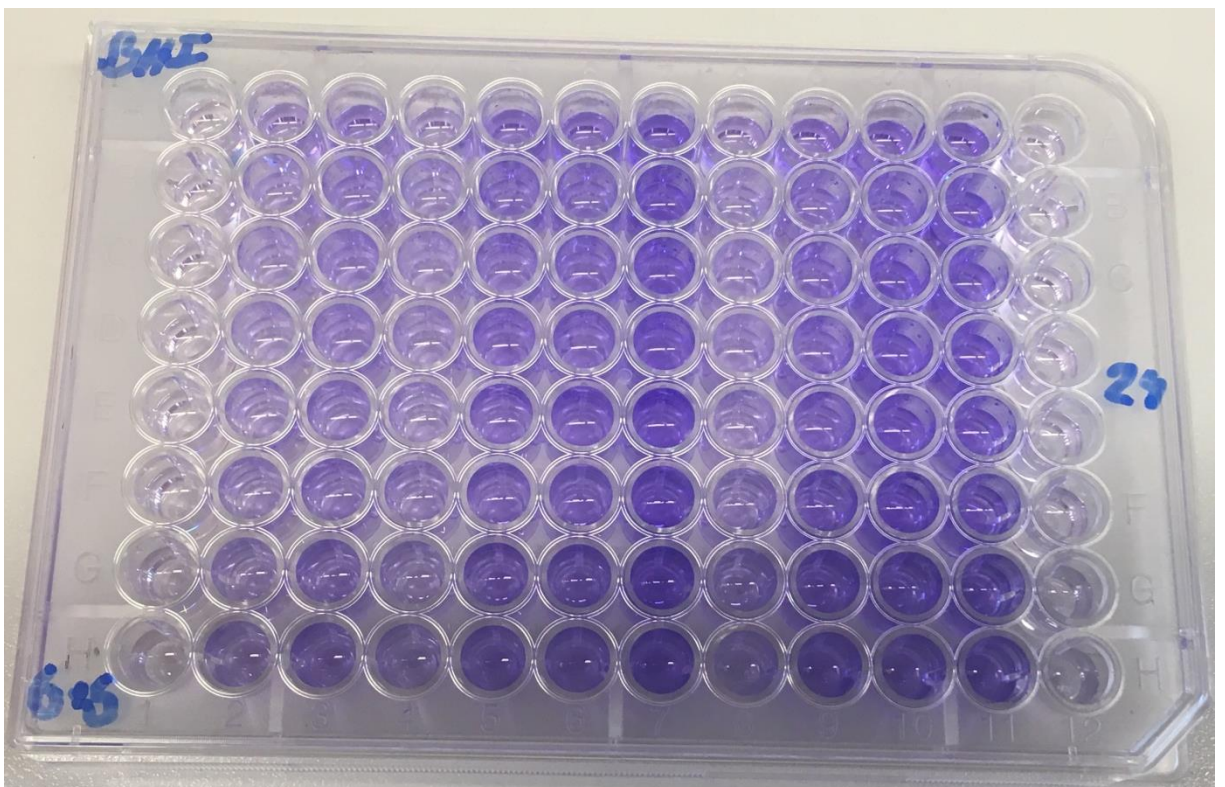
## 7 PŘÍLOHY

**Příloha 1:** Mikrotitrační destička s vybranými testovanými kmeny v BHI po 1 denní kultivaci při 37° C

**Příloha 2:** Mikrotitrační destička s vybranými testovanými kmeny v BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy po 1 denní kultivaci v 37° C a následném obarvení biofilmu krystalovou violetí



**Příloha 1-** Mikrotitrační destička s vybranými testovanými kmeny v BHI po 1 denní kultivaci při 37° C



**Příloha 2** – Mikrotitrační destička s vybranými testovanými kmeny v BHI s 2 % glukózy a 2 % sacharózy po 1 denní kultivaci v 37° C a následném obarvení biofilmu krystalovou violetí