

Studium vlivu roztoků polyvinylpyrrolidonu na tvorbu bakteriálního biofilmu

Sabina Helešicová

Bakalářská práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů
akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Sabina Helešicová**
Osobní číslo: **T12339**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Studium vlivu roztoků polyvinylpyrrolidonu na tvorbu bakteriálního biofilmu**

Zásady pro vypracování:

1. Sepište literární rešerši zaměřenou na použití polyvinylpyrrolidonu (PVP) ve farmaceutické oblasti.
2. Experimentálně ověřte vliv roztoků PVP na tvorbu biofilmu u vybraných bakteriálních kultur
3. Získané výsledky zpracujte přehlednou formou a práci odevzdejte v řádném termínu v tištěné i elektronické podobě.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Literatura zaměřená na vlastnosti a použití PVP. Předcházející Bc. práce nebo DP vypracované na ÚIOŽP v letech 2013 až 2014.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Datum zadání bakalářské práce: **16. ledna 2015**
Termín odevzdání bakalářské práce: **25. května 2015**

Ve Zlíně dne 2. března 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 14.5.2015


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací

(1) Vysoká škola nevyjádřeně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví smítní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlédnutí veřejnosti v místě určeném smítním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může se zveřejnění práce pořízovat na své náklady výtisk, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3.

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, uděle-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

¹⁴ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo.

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložil, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlíží k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Byl sledován vliv roztoku polyvinylpyrrolidonu (PVP) na tvorbu bakteriálního biofilmu u vybraných druhů bakterií. Teoretická část byla věnována charakteristice polyvinylpyrrolidonu, vlastnostem a tvorbě biofilmu, stručné charakteristice vybraných bakteriálních kultur.

V praktické části převažovaly experimenty v mikrotitračních destičkách k přesnému zjištění vlivu PVP na tvorbu biofilmu. Tvorba biofilmu byla zkoumána s koncentracemi 600 a 200 mg/l PVP u kultur JF1, MSZ, MS2, MP13 a s koncentrací 500 mg/l u kultur *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Bylo zjištěno, že u určitých kultur má polyvinylpyrrolidon prokazatelný vliv na snížení či zvýšení tvorby biofilmu, a proto byly s vybranými druhy bakterií provedeny pokusy adsorpce PVP. Z jejich výsledků vyplynulo, že buňky kultury MS2 jsou schopny adsorbovat určitý podíl PVP z roztoku.

Klíčová slova: polyvinylpyrrolidon, bakteriální biofilm, bakterie, adsorpce

ABSTRACT

The effect of the polyvinylpyrrolidone solution on the bacterial biofilm formation in selected species of bacteria was studied. The theoretical part of the work was devoted to polyvinylpyrrolidone characteristics, to its properties and to formation of biofilms, including a brief description of selected bacterial cultures.

In the practical part of the work many experiments in microtiter plates were performed to determine accurately the impact of polyvinylpyrrolidone on bacterial biofilm formation. Biofilm formation was studied with concentrations 600 and 200 mg/l PVP in JF1, MSZ, MS2, MP13 cultures and with 500 mg/l PVP in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*.

It was found that polyvinylpyrrolidone has provable effect to reduce or increase the biofilm formation in certain cultures, so that the PVP adsorption trials in some cultures were done. Their results showed that PVP may be partially adsorbed to the cells of the MS2 strain.

Keywords: polyvinylpyrrolidone, bacterial biofilm bacteria, adsorption

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucímu své bakalářské práce doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, za ochotu a čas, který mi věnoval při zpracovávání mé bakalářské práce. Dále bych také chtěla poděkovat dalším zaměstnancům Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí Fakulty technologické, UTB ve Zlíně za ochotu a rady při provádění experimentální práce. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala všem, kteří mě v průběhu studia podporovali. Zvláště rodině, která mi zajistila skvělé podmínky jak pro studium, tak pro zpracování mé bakalářské práce. Velké poděkování směřuje také mé dceři, která mi v těžkých chvílích dokázala dodat sílu a chuť jít dál.

„Nezáleží na tom, s čím si přišel, ale s čím odcházíš.“

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

OBSAH	9
ÚVOD	11
I. TEORETICKÁ ČÁST	12
1 POLYVINYLPIRROLIDON	13
1.1 ZPŮSOB VÝROBY	13
1.2 POUŽITÍ.....	14
1.3 EXPERIMENTY S PVP	14
1.3.1 Tvorba biofilmu na silikonové ušní trubici s povlakem PVP	14
1.3.2 Biomateriály potažené vrstvou PVP pro urologické použití.....	15
1.3.3 Hodnocení anti-quorum sensing aktivity stříbrných nanovláken.....	16
2 BAKTERIÁLNÍ BIOFILM	17
2.1 VZNIK, VÝVOJ A STABILIZACE BIOFILMU	18
2.2 RŮST BIOFILMU	20
2.3 KOAGREGACE, KOADHEZE	23
2.4 REGULACE TVORBY BIOFILMU	23
2.5 STRUKTURA BIOFILMU.....	24
3 FARMACEUTICKY VÝZNAMNÉ KULTURY BAKTERIÍ	26
3.1 <i>ROD STAPHYLOCOCCUS</i>	27
3.2 <i>ROD ENTEROCOCCUS</i>	29
3.3 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	30
3.4 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	31
II. PRAKTICKÁ ČÁST	32
4 MATERIÁL A METODIKA	33
4.1 SLOŽENÍ ROZTOKŮ A ŽIVNÝCH MÉDIÍ	33
Minerální médium MM1	33
Minerální médium MM2	33
4.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	35
4.3 POUŽITÉ KULTURY	36
4.4 POSTUPY POKUSŮ	36
4.4.1 Zkumavkový test	36
4.4.2 Pokusy v mikrotitračních destičkách, při koncentraci PVP 600 mg/l	37
4.4.3 Pokus v mikrotitrační destičce s MM2, při koncentraci PVP 200 mg/l	37
4.4.4 Pokusy v mikrotitrační destičce s TSB, s koncentrací PVP 500 mg/l.....	38
4.4.5 Spektrofotometrické stanovení tvorby biofilmu	38
4.4.6 Záchyt a promytí buněk po kultivaci.....	38
4.4.7 Adsorpce	39
4.4.8 Měření DOC.....	39
5 VÝSLEDKY EXPERIMENTŮ A DISKUSE	40

5.1	OVĚŘOVACÍ POKUS.....	40
5.2	TVORBA BIOFILMU ENVIRONMENTÁLNÍMI KULTURAMI	41
5.3	TVORBA BIOFILMU FARMACEUTICKY VÝZNAMNÝMI KULTURAMI BAKTERIÍ	44
5.4	POKUS ADSORPCE PVP NA BUŇKY KULTURY MS2.....	50
5.5	POKUS ADSORPCE PVP NA KULTURU <i>E. COLI</i> CCM 3988.....	52
6	ZÁVĚR.....	54
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	56
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	63
	SEZNAM OBRÁZKŮ	64
	SEZNAM TABULEK.....	65

ÚVOD

Hojně využívaný polymer díky svým vlastnostem (nízká toxicita, inertnost či rozpustnost ve vodě je polyvinylpyrrolidon. Jeho biodegradabilita je velmi nízká a je proto považován za polymer velmi těžce rozložitelný. Má však velké uplatnění ve farmaceutickém průmyslu, jako pojivo v mnoha léčivých přípravcích, vyráběných ve formě tablet. Při orálním použití tablet pak PVP působí na mikroorganismy trávicího traktu, prochází tělem a dostává se do odpadních vod, kde může dále působit na řadu organismů, včetně bakterií. PVP také tvoří komplex s jodem, který má desinfekční vlastnosti a je používán v různých roztocích, mastech, tekutých mýdlech nebo v chirurgických lázních.

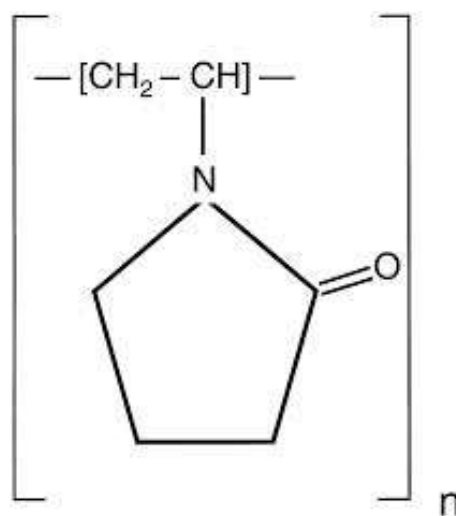
Proto je nutné zabývat se otázkou jeho působení na tvorbu biofilmu s mikroorganismy, které se v našem těle vyskytují. Zda právě jejich vliv se na tvorbě biofilmu projevuje a jakou měrou. Cílem práce je zjistit jakou měrou se PVP v roztoku podílí u zvolených mikroorganismů na zvýšení či snížení tvorby biofilmu. Byly prováděny pokusy jak s kulturami farmaceuticky významnými, tak s kulturami enviromentálními.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYVINYLPIRROLIDON

Polyvinylpyrrolidon (C_6H_9NO)_n nebo také 1-ethenyl-2-pyrrolidon, PVP, povidon atd. je sypký bílý až nažloutlý prášek, který byl poprvé syntetizován profesorem Walterem Reppem. Mluvíme o látce rozpustné ve vodě a v mnoha organických rozpouštědlech (alkoholy, fenoly, ketony, čistá kyselina octová, uhlovodíky aj.). V pevném stavu je za normálních podmínek stabilní látkou.

PVP je schopen díky své struktuře tvořit komplexy s řadou látek, kde rozpustnost těchto komplexů je většinou lepší než rozpustnost čistých léčiv. Na druhé straně se PVP může stát nerozpustným v důsledku zesíťování, které probíhá za vyšších teplot a v kombinaci se silně zásaditými látkami.



Obrázek 1 Struktura PVP [1]

Teplota skelného přechodu je 130-175°C. PVP není dráždivý a jeho akutní, subchronická a chronická toxicita jsou velmi nízké. [1, 2, 3]

1.1 Způsob výroby

Polyvinylpyrrolidon (PVP) se vyrábí roztokovou polymerací N-vinyl-2-pyrrolidonu, která může probíhat dvěma hlavními cestami:

1. Výroba PVP přes roztokovou polymeraci N-vinyl-2-pyrrolidonu v organickém rozpouštědle a následné odizolování pomocí vodní páry. Vzniká čirý vodný roztok, který je dodáván ve formě vodného roztoku nebo jako vysušený prášek.
2. Výroba PVP roztokovou polymerací monomeru N-vinyl-2-pyrrolidonu s ve vodě rozpustnými kationtovými či aniontovými monomery. Polymer je obvykle dodáván ve formě vodného roztoku, avšak v některých případech je vysušen rozprašováním, aby mohl být dálkově přepravován. Tekuté PVP je však v tomto případě jednodušší k rozpuštění, ale horší na přepravu než pevné PVP. [4]

PVP se vyrábí v různých molekulových hmotnostech od 2500 po 75000 g/mol. Vzniklé polymery se podle jejich molekulové hmotnosti označují K-hodnotou, kterou lze vypočítat z relativní viskozity PVP ve vodě. Toto označení nalezneme jako součást obchodního názvu výrobku (např. K-30, K-15). [1]

1.2 Použití

PVP se začal používat již v první polovině 20. století jako náhrada krevní plazmy. Později našel využití v mnoha odvětvích průmyslu, jako jsou potravinářství, farmacie, kosmetika aj. PVP je povrchově aktivní látka, která se obvykle používá jako potahovací činidlo tablet nebo také jako pojivo do tablet ve farmacii (tyto tablety vykazují vysokou míru rozpouštění léků, což je využíváno u přípravků s prodlouženým uvolňováním).[1, 2, 3]

Kopolymery 1-vinyl-2-pyrrolidonu s vinylacetátem lze využít jako filmtvorné činidla ve vlasových sprejích, voscích a to vzhledem k jejich afinitě ke keratinu. V kosmetice jsou žádány i jako zahušťovadla. Dále je PVP využíván jako pomocná látka při zpracování textilu, jako lepidla, ochranné koloidy a zahušťovadla. PVP vytváří v alkalickém prostředí za zvýšené teploty příčné vazby, takto provázaný PVP je pak hůře rozpustný ve vodě i v jiných rozpouštědlech a používá se jako povrchová sloučenina u pilulek nebo také ke stabilizaci a vyčeření piva, vína, rostlinných extraktů a ovocné šťávy. [1]

PVP v komplexu s jodem má úlohu germicidu v antibakteriálních mýdlech, čistících a desinfekčních přípravcích. V potravinářském průmyslu je PVP pojivem pro vitamínové tablety a stabilizátor kapalných vitamínů či minerálních koncentrátů (zabraňuje krystalizaci).[2, 3]

1.3 Experimenty s PVP

1.3.1 Tvorba biofilmu na silikonové ušní trubici s povlakem PVP

Zde bylo zjišťováno, zda bude tvorbě biofilmu v silikonové ušní trubici zabráněno povlakem PVP. Silikonová ušní trubice byla vystavena lidské krvi či fosfátovému pufru a kultivována s patogenními bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Po čtyřech dnech byla přidána antibiotika, která měla za úkol zničit planktonické bakterie. Tvorba biofilmu byla hodnocena kvantitativním počtem bakterií a snímána elektronovým mikroskopem.

V předchozích experimentech bylo prokázáno, že PVP hydrogelová vrstva snižuje přilnutí bakterií v první fázi tvorby biofilmu o více než 90%. Silikonová ušní trubice s povlakem PVP je tedy běžně dostupná. Cílem této studie bylo tedy zjistit, zda běžně dostupná silikonová trubice s povlakem

PVP je schopna snížit tvorbu biofilmu patogenů, jako jsou *S. aureus* nebo *P. aeruginosa*, které se vyskytují v ušním výtoku.

Tento pokus byl prováděn po dobu čtyř dní, kdy se na silikonové ušní trubici s povlakem PVP a bez povlaku PVP, vložené do kultury *S. aureus* nebo *P. aeruginosa* vytvořil zralý biofilm. Povlak PVP na ušní trubici měl významný vliv na tvorbu biofilmu kultury *P. aeruginosa*. Tento efekt byl více zřetelný po vystavení trubice fosfátovému pufru nebo krvi. Celkově však nebyl pozorován rozdíl mezi trubicí vloženou do fosfátového pufru a trubicí vloženou do krve. *S. aureus* neukázal také významný rozdíl mezi trubicí vystavenou krvi a trubicí, která byla vystavena fosfátovému pufru. Avšak povlak PVP na trubici vystavené krvi, silně podporoval rozvoj biofilmu *S. aureus*. PVP vrstva na silikonové ušní trubici poskytuje rezistenci na tvorbu biofilmu u kultury *P. aeruginosa*. Klinický dopad PVP na silikonové ušní trubici může být způsoben stykem s krví, ale toto zjištění vyžaduje další klinickou studii. [5]

1.3.2 Biomateriály potažené vrstvou PVP pro urologické použití

Byly zkoumány vlastnosti povrchu polyuretanu, na němž byla vrstva hydrofilního PVP, a jeho vhodnost pro použití jako biomateriálu do močových cest. Byla také porovnána jeho kluzkost a schopnost odolávat bakteriím, ve srovnání s nepotaženým polyuretanem a silikonem.

Bylo zjištěno, že polyuretan potažený PVP je významně hydrofilní, více kluzký oproti nepotaženému polyuretanu a silikonu. Přilnavost hydrofilní testovací kultury (izolátu) *E. coli* na polyuretan s PVP a bez PVP byla dost podobná, ale významně menší než její přilnavost na silikon. Oproti *E. coli* autoři zjistili, že přilnavost hydrofobní kultury *Enterococcus faecalis* na polyuretan s PVP a silikon byla podobná, ale významně menší než přilnavost na polyuretan nepotažený PVP-em.

Dále bylo prokázáno, že je nutné zabránit vývoji biofilmu na ureterálních protézách a katetrech, které jsou ve styku s močí, neboť tyto biofilmy mohou vést k obstrukci toku moči. V tomto ohledu je použití hydrofilního hydrogelového povlaku výhodné, neboť činí povrch materiálu neatraktivním pro bakterie. Na základě těchto informací Kristinnson prohlásila, že na polyuretanovém katetru potaženém hydromerem a PVP na bázi hydrogelů ulpívá menší množství bakterií. Stejně tak i Bridgett označila silikon s vrstvou hydromeru, za materiál snižující přilnavost pěti kmenů *S. epidermidis* a jednoho kmene *S. aureus*. [6]

1.3.3 Hodnocení anti-quorum sensing aktivity stříbrných nanovláken

Byla syntetizována stříbrná nanovlákná (SNW) pomocí etylenglykolu (redukční činidlo) a PVP (uzavírací činidlo). Získaná nanovlákná měla 200-250 nm v průměru a 3-4 μm délku, ale nebyla prokázána antibakteriální aktivita proti *Bacillus subtilis* NCIM 2063 a *Escherichia coli* NCIM 2931. Na druhé straně nanovlákná ukázala silné vlastnosti proti systému *quorum sensing* (QS), které vedly k inhibici tvorby biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* a k inhibici syntézy violaceinu u *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472.

Stříbrné ionty a sloučeniny na bázi stříbra jsou vysoce toxické pro bakterie. Je nutné hledat řešení pro rostoucí hrozbu rezistence u patogenních mikroorganismů. Důležitým aspektem mnoha patogenních organismů v průběhu jejich progresu (např. v syntéze biofilmu) je kooperativní chování díky systému QS. QS je schopnost bakteriální populace koordinovat společné chování díky chemickým procesům v buňkách, a díky buněčné signalizaci zprostředkované difuzí signálních molekul.

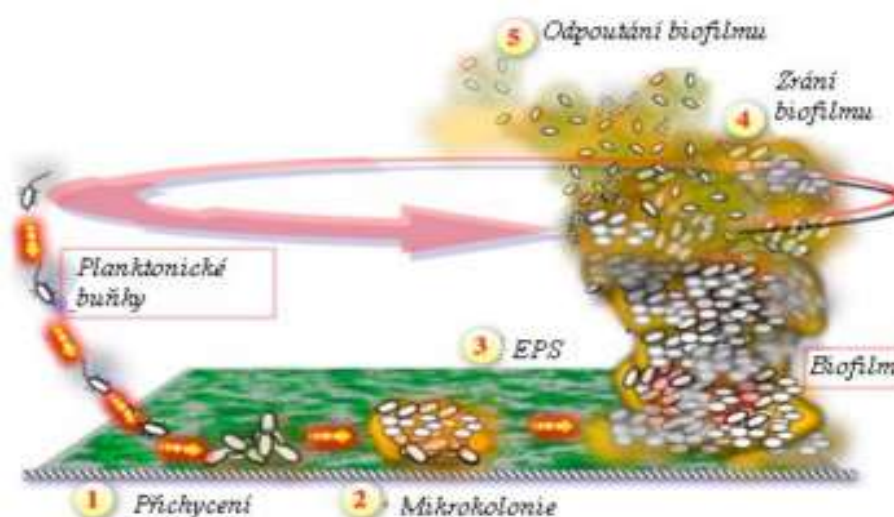
Biofilmy odhadem způsobí 80% a více všech mikrobiálních infekcí u lidí. Kovové nanovlákná byla navržena vzhledem k jejich vynikajícím elektrickým, tepelným, optickým a katalytickým vlastnostem v kombinaci s jejich stabilitou pro různé využití. [7]

2 BAKTERIÁLNÍ BIOFILM

Bakterie přírodních populací mají přirozenou tendenci nasedat na nejrůznější typy povrchů. Existence bakterií v biofilmu je výhodnější a ve většině případů je základním způsobem jejich výskytu. Biofilm poskytuje bakteriálním buňkám ochranu, udržuje určitý stupeň homeostázy a vytvořená biofilmová vrstva, která obklopuje buňky, představuje bariéru izolující bakterie od okolí. Buňky v biofilmu mají také navíc např. vyšší odolnost vůči toxickým látkám, UV záření, mechanickému poškození, bakteriofágům nebo predátorům. [8, 10]

Biofilmy se vyskytují nejen v přírodním prostředí, ale i v prostředí humánním. Zde způsobují četné problémy, neboť znečišťují povrchy, kde se tvoří, mohou je poškozovat korozi, ale také mohou být zdrojem patogenních infekcí. Patogenní biofilmy se tvoří u řady bakteriálních rodů, jako jsou např. *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Streptococcus* a *Staphylococcus*. [9]

Biofilm je definován jako přisedlé společenstvo mikroorganismů, charakterizované tím, že buňky, které jsou ireverzibilně přichycené k podkladu nebo jedna k druhé, jsou zapuštěné v matici extracelulárních polymerních látek těmito buňkami produkovaných, které dále vykazují odlišný fenotyp s ohledem na rychlost růstu a transkripci genů. Jelikož se zaměření i pole působnosti výzkumu biofilmu v odvětvích průmyslu liší, není jeho definice pro všechny odvětví zcela totožná. Na druhé straně existuje také fakt, že se tato definice stále vyvíjí dle nových zjištěných faktů.[10]



Obrázek 2 Znárodnění tvorby biofilmu – nejprve dochází k adhezi buněk a tvorbě mikrokolonií, to je doprovázeno produkcí EPS. Následuje tvorba a zrání biofilmu, nakonec se buňky z biofilmu odtrhávají. [11]

2.1 Vznik, vývoj a stabilizace biofilmu

Vznik, vývoj a stabilizace biofilmu probíhá v několika krocích, které lze popsat jako:

1. Transport a adsorpce organických molekul na povrch nosiče („*conditioning*“),
2. Transport mikrobiálních buněk k povrchu nosiče, transformace těchto buněk z reverzibilních na irreverzibilní adsorpci,
3. Desorpce reverzibilně adsorbovaných buněk,
4. Růst irreverzibilně adsorbovaných buněk a eroze nebo odtrhávání buněk,
5. Zachycení mikroorganismů na povrchu, replikace sesilních buněk a produkce extracelulární matrice a dalších metabolitů,
6. Vývoj biofilmu na povrchu nosiče,
7. Odtrhávání a disperze buněk a biofilmu zpět do kapaliny. [12]

Conditioning a adheze

První fáze vývoje biofilmu se nazývá „*initial event*.“, není však jednoznačně prozkoumána. Procesy v ní zahrnuté jsou však relativně dobře známé, jsou shrnuty jako: přisednutí organických molekul na povrch („*conditioning*“), transport buněk k povrchu, transformace těchto buněk z reverzibilních na irreverzibilní adsorpci, desorpce reverzibilně adsorbovaných buněk, růst irreverzibilně adsorbovaných buněk a eroze nebo odtrhávání buněk.

Zachycení substrátových molekul na povrch nosiče je rychlý proces, který se řídí zákony adsorpce. Rozhodujícími mechanismy při transportu mikrobiálních buněk k povrchu nosiče jsou molekulární a turbulentní difuze, chemotaxe, termoforéza a sedimentace. Adheze, neboli vlastní zachycení buněk k povrchu, je poměrně složitým klíčovým krokem ke vzniku biofilmu. Zachycení probíhá ve dvou fázích:

- a) Reverzibilní adsorpce,
- b) Permanentní (irreverzibilní) zachycení, [12, 13, 14]

Obě fáze jsou zprostředkovány třemi typy interakcí bakterií vůči okolí (van der Waalsovy síly, hydrofobní interakce, elektrostatické interakce), nespecifickými chemickými vazbami (kovalentní polární vazby, vodíkové můstky) a specifickými interakcemi mezi bakteriálními receptory a receptory hostitele.

Adheziny jsou specifické bakteriální sloučeniny; jde o povrchově aktivní molekuly

(např. bílkoviny, glykopeptidy, polysacharidy...), které četné druhy bakterií používají k adhezi [15] Adheze je zprostředkována interakcemi mezi specifickými adheziny na mikrobiálním povrchu a receptory na hostitelské tkáni. Iniciální adheze bakteriálních buněk na (kondicionovaný) povrch je náhodným procesem. Po přichycení k povrchu se buňky začínají dělit, akumulovat a produkují „primární biofilm“, na který se mohou přichytávat další buňky (tzv. sekundární biofilm). Během svého růstu vykazují buňky primárního biofilmu určitou prodlevu („surface associated lag time“), která je důsledkem adaptace na podmínky přisedlého růstu a fenotypických změn přisedlých buněk. Buňky sekundárního biofilmu rostou rychleji než buňky biofilmu primárního. [16, 17]

Ve fázi dotyku s povrchem se aktivuje tvorba bičků, avšak v biofilmu se jejich tvorba snižuje nebo úplně ustává. Adhezi napomáhají další buněčné struktury, jako jsou např. fimbrie, které na povrchu buňky tvoří husté kartáčky a při styku s povrchem jich vzniká velké množství. Po doteku s povrchem následuje celá řada dalších syntéz, jako je třeba syntéza polysacharidové matrice.

Výhodnější je pro úvodní iniciální fázi adheze na hydrofobní povrch, i přestože je většina bakteriálních buněk hydrofobní. Hydrofobní povrch pomáhá buňkám překonat elektrostatický odpor nosiče, díky tomu je adheze rychlejší. Fimbrie obsahující hydrofobní aminokyseliny zvyšují hydrofobitu buněčného povrchu. Bičky a schopnost pohybu mikroorganismů zajišťují překonání odpudivých sil v blízkosti nosiče. [18,10]

Vývoj biofilmu je složitým procesem, působí na něj celá řada faktorů. Jedním z nejdůležitějších jsou povrch nosiče a okolní prostředí. Materiály vhodné pro adhezi jsou i ty, které mají porézní strukturu s póry, neboť jejich velikost je vhodná pro formování biofilmu. Póry totiž poskytují buňkám ochranu potřebnou ke správné adhezi a růstu. Dalším neméně důležitým faktorem, který souvisí s rychlostí růstu biofilmu, je množství nutrientů v médiu. Na nutričně bohatším médiu se biofilm rychleji formuje, naopak při nízkém obsahu nutrientů se spouští systém odbourávání buněk z povrchu. Druhá příslušnost bakterií a poměry dusíku, uhlíku a fosforu také neméně ovlivňují způsob adheze. [19, 20, 21]

Fyziologie, metabolismus a organizace biofilmů silně závisí na typu povrchu, který kolonizují a na fyzikálně-chemických podmínkách prostředí. Biofilmy se tedy mohou nacházet na třech typech povrchů:

1. Rozhraní pevné a vzdušné fáze: z pevné fáze získává biofilm živiny a vlhkost, kyslík se získává ze vzduchu (vzniká opačný gradient živin a kyslíku v biofilmu).
2. Rozhraní inertní pevné a tekuté fáze: z tekutého prostředí získává biofilm potřebný kyslík i dostupné živiny (gradient klesá s rostoucí hloubkou biofilmu).
3. Rozhraní pevné živné a tekuté fáze: z pevné nebo tekuté fáze je získáván kyslík i živiny (vznikají rozmanité fyzikálně-chemické gradienty v biofilmu). [22]

2.2 Růst biofilmu

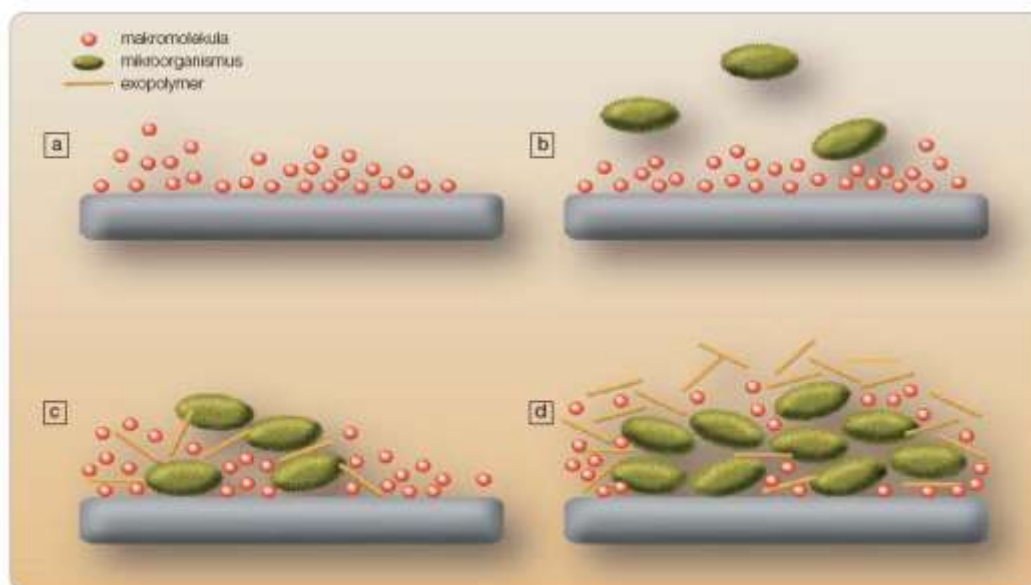
Bakterie přichycené na povrch mění své vlastnosti z počátku jen na úrovni regulace genů. Probíhá aktivace genů, které produkují polysacharidy a polymery důležité pro vznik biofilmu. Mikroorganismy rostoucí ve formě biofilmu se od planktonických forem liší transkripční odlišných genů, mají proto odlišné fyziologické vlastnosti a vzniká zde tzv. biofilmový fenotyp. V různých podmínkách se využívají různé genetické cesty. [9, 23, 24, 25, 26]

Geny potřebné pro tvorbu biofilmu se dělí do dvou skupin:

- a) Geny odpovědné za tvorbu bičíků, fimbrií, proteinových adhezínů a exopolysacharidů:
Tyto geny umožňují pohyb, přichycení bakterií a konstruktivní vztah mezi buňkou a povrchem.
- b) Geny s ovlivněnou expresí vnějšími vlivy nebo bakteriálními signálními molekulami:
Tyto geny ovlivňují tvorbu struktury biofilmu.[27]

Změnu regulace činnosti genů vyvolávají zevní podmínky v tvořícím se biofilmu (zvýšený osmotický tlak, snížený obsah kyslíku, rostoucí hustota populace ...) Prostorová organizace biofilmu je silně závislá na aktivitě specifických genů. [28, 29]

Před přilnutím se aktivuje celá řada genů, která je odpovědná za zvýšenou pohyblivost buněk. Při dotyku jsou uplatňovány bičíky, jejichž tvorba se zvyšuje. Dále pohybu a přichycení bakteriálních buněk napomáhají proteinové povrchové struktury, jako jsou fimbrie a curli. Pohyb pomocí bičíků vytváří kontakt mezi buňkou a povrchem, oproti tomu pohyb pomocí pil čtvrtého typu vytváří prvotní strukturu biofilmu při tvorbě mikrokolonií. [30, 27, 31,32,33]



Obr. 2 Vznik biofilmu na povrchu implantátu:

a) sorpce makromolekul z okolního prostředí; b) transport mikroorganismů k povrchu implantátu; c) počáteční adheze a následující ukotvení mikroorganismů v důsledku produkce exopolymerů; d) růst mikroorganismů a vznik odolného biofilmu.

Obrázek 3 Růst biofilmu na povrchu implantátu [34]

Přenos genů

V biofilmu dochází k vyššímu stupni genetické výměny, neboť buňky v biofilmu spolu metabolicky spolupracují. Mezi buňkami bakterií dochází často k výměně genetické informace, jde zde hlavně o konjugaci a přenos plazmidů. Tímto způsobem se poměrně rychle šíří mezi jednotlivými populacemi v biofilmu (např. plazmidy nesoucí geny, které kódují rezistenci k antibiotikům).

[24,35, 36]

Konjugace potřebuje, aby živé, aktivní buňky dárce a příjemce byly při přenosu genu ve vzájemném kontaktu. Díky tomu je konjugace nejvýznamnějším mechanismem přenosu genů v přírodě. Dalším procesem příjmu genů bakteriálními buňkami je transformace, tedy příjem volné DNA, která je uvolněná do prostředí lyzí jiných buněk nebo exkrecí. V případě mimobuněčné volné DNA, je uvolnění DNA a následná transformace částí biofilmového cyklu, kde uvolněná DNA stabilizuje biofilmovou strukturu.[36, 37]

Extracelulární polymerní matrice

Ve srovnání biofilmů s planktonními populacemi je odlišnost v tom, že buňky jsou zanořeny do extracelulární polymerní matrice (EPM). Je známo, že EPM produkují bakterie, případně eukaryoty v biofilmu, a dále vytvářejí extracelulární matici, kde jsou bakterie fixovány. Biofilmová matrice je dynamický systém, kde mikrobiální buňky dosahují homeostáze. Tyto buňky jsou poté organizovány tak, aby mohly využít dostupných živin. Tato matrice však způsobuje většinu ekonomických problémů, které jsou spojovány s tvorbou biofilmu.[35,38, 39]

Kombinace vnitřních faktorů, což je genotyp přisedlých buněk, s vnějšími faktory, které v tomto případě zahrnují okolní fyzikálně-chemické prostředí a povahu kolonizovaného substrátu, vede ke složení matrice. Základ pro matici tvoří voda, dále se skládá z anorganických a organických látek, kdy významnou součástí struktury jsou polysacharidy. Kromě základních skupin makromolekul (proteiny, RNA, DNA, polysacharidy) zde najdeme i peptidoglykany, lipidy, fosfolipidy aj. Za hlavní strukturní složku jsou považovány exopolysacharidy, které tvoří kostru pro komplexní biofilm. [39, 40, 41]

Tabulka 1 Složení biofilmové matrice [39]

Složka	% matrice
Voda	Až 97
Mikrobiální buňky	2-5
Polysacharidy	1-2
Proteiny	< 1-2 (včetně enzymů)
DNA a RNA	<1-2 (z lyzovaných buněk)
Ionty	?

EPM neslouží pouze k fixaci buněk, ale napomáhá k omezení pohybu plynů, rozpuštěných solí i makromolekul z a do biofilmů. Další vlastností biofilmů je vychytávání a koncentrace nutrientů a organických látek z vody. Díky tomu mohou bakterie růst i v extrémně oligotrofních podmínkách. EPM je velmi účinnou ochranou před nepříznivými vlivy vnějšího prostředí (antibiotika, toxicita, bakteriofágy aj.).[42, 43, 44, 45]

2.3 Koagregace, koadheze

Koagregací jsou nazývány fyzikální interakce mezi suspendovanými buňkami. Naopak koadheze se vyskytuje mezi suspendovanými buňkami a přisedlými buňkami biofilmu. Jinak jsou mechanismy obou interakcí totožné. Primárním kolonizátorem je organismus, který jako první přisedne na povrch. Zde se množí a vytváří mikrokolonie. Primární kolonizace bývá zprostředkována specifickými

a nespecifickými fyzikálně-chemickými interakcemi se složkami adsorbovaného, organického filmu. Při vývoji biofilmu dochází ke změnám v oblasti prostředí, tedy ke změně jeho vlastností a substrát je pokryt bakteriemi. Dále přichází na řadu sekundární kolonizátoři, kteří mají za úkol přichytit se na kolonizátory primární a tím se začíná biofilm vyvíjet v biofilm multidruhový. Koagregace přispívá k vývoji biofilmu dvěma způsoby:

- a) Jednotlivé buňky mají schopnost v suspenzi rozeznat a přisednout na geneticky odlišnou buňku v biofilmu.
- b) Již v suspenzi sekundárního kolonizátora dochází ke koagregaci a koagregát poté přisedá na biofilm.[46, 47, 48]

2.4 Regulace tvorby biofilmu

Některé buňky mají schopnost se z kolonií odlučovat, vrátet se zpět do planktonního stavu a kolonizovat jinou část povrchu. Takové chování u buněk nastává při zvyšující se konkurenci v biofilmu. Buňky zjišťují existenci okolních buněk pomocí chemických signálů, přičemž tyto signály zabraňují přehušťování populace, neboť se zvyšující se hustotou populace se zvyšuje produkce signálních látek. Tyto signály lze prokázat i v místech, odkud již byl biofilm odstraněn. Takový způsob komunikace vně biofilmu je označována jako „*quorum sensing*“ neboli vnímání množství. [49]

Nyní je známo několik rozdílných typů signálních látek. Gramnegativní bakterie využívají jako signální molekulu, zachycovanou klíčovými proteiny LuXl a LuxR, více různých chemických látek, zejména však N-acyl-homoserinlaktony. Na druhé straně grampozitivní bakterie využívají krátkých polypeptidů, které lze přirovnat k feromonům či hormonům. Tyto signální látky grampozitivních bakterií řídí dělení buněk a také tvorbu hlenové polysacharidové matrice. Další skupina, která je jak u grampozitivních tak gramnegativních bakterií, je skupina signálních látek, které se označují jako autoinducer-2. [50, 51, 52, 53]

Quorum sensing je třífázový proces:

1. Bakterie produkují specifické signální molekuly, které vznikají zpravidla intracelulárně a jsou transportovány do zevního prostředí aktivně nebo volnou difuzí.
2. Dochází ke kumulaci signálních molekul ve vnějším prostředí kolem bakteriálních buněk
3. Při překročení prahové koncentrace signálních molekul, se signální molekuly vážou na membránový receptor na povrchu bakteriální buňky. Tím se dále aktivuje intracelulární regulátorový protein, spustí se fosforylační kaskáda a dochází k expresi řady genů.

Tímto způsobem komunikace je ovlivněna regulace exprese faktorů virulence u mnoha patogenních bakterií. Intenzivní komunikace mezi bakteriemi i mikrokoloniemi v biofilmu pomocí signálních molekul se podílí na procesu tvorby biofilmu. [54]

2.5 Struktura biofilmu

Struktura biofilmu je závislá na fyzikálních i biologických faktorech, dále také na řadě interakcí. Biofilm, který je silně limitován difuzí, má tendenci mít heterogenní a porézní strukturu. Jestliže limituje tvorbu biofilmu konverze substrátu, má biofilm tendenci být homogenní a kompaktní. Důležitou roli při tvorbě struktury zaznamenává proces odtrhávání. V systémech se silným odtrháváním je biofilm hladší, naopak při malém odtrhávání, což je odlupování po částech, se biofilm jeví jako porézní. Biofilmy rostoucí při vyšších rychlostech proudění jsou hustší než biofilmy rostoucí při nižších rychlostech. Hustší biofilm je také odolnější ke zvýšenému smykovému tření, které je právě důsledkem vyšší rychlosti proudění. Oproti tomu biofilmy s nižší hustotou rostou při nízkých rychlostech proudění a vykazují tak vysokou efektivní difuzivitu, ale ztrácí odolnost vůči vyššímu smykovému tření.

[55, 56, 57, 58, 59, 60]

Vyzrálý biofilm má pouze heterogenní strukturu, která se skládá z buněk rozptýlených v matrici, jejíž mezery a kanálky jsou naplněny vodou a jsou propojeny s okolní tekutou fází. V biofilmu jsou bakterie rozloženy nerovnoměrně, rostou v mikrokoloniích, shlucích kuželovitého nebo houbovitého tvaru. Mikrokolonie jsou spojeny spleťtými kanálky, které prochází většími mikrokoloniemi. Tyto kanálky jsou tenké a představují póry.[61]

Tloušťka a denzita biofilmu

Tloušťka biofilmu je významná charakteristika pro analýzu biofilmových procesů, neboť určuje difuzní délku a je nezbytná pro výpočet fluidního třecího odporu a odporu přenosového tepla. Přesné měření tloušťky biofilmu není až tak snadné, jeho tloušťka může totiž kolísat v závislosti na morfologických rysech a také na stáří. Tloušťku může také ovlivnit diverzita mikrobiálních druhů.

Tloušťka biofilmu v pomalu tekoucích, živinami bohatých vodách přesahuje 30 mm. Biofilmový systém je proto charakterizován několika délkovými hodnotami, které kolísají dle typu prostředí a taxonomického složení:

1. Délka buněk (1-10 μm)
2. Mezní vrstva pro přenos hmoty (10-100 μm)
3. Difuzní hloubka (10-1000 μm)
4. Tloušťka biofilmu (10-1000 μm)

Přesné měření biofilmové denzity neboli hustoty je přímo úměrné měření tloušťky biofilmu, proto musí být uváděná hustota biofilmu ve vztahu k technice měření tloušťky biofilmu. V praxi je hustota určena měřením sušiny biofilmu ze známé plochy substrátu dělené tloušťkou biofilmu. Hustota bývá také ovlivněna růstem určitého mikrobiálního druhu, nejvyšší hustota biofilmu je uvedena jako 105 kg m^{-3} a nejnižší jako 10 kg m^{-3} . [62]

3 FARMACEUTICKY VÝZNAMNÉ KULTURY BAKTERIÍ

Bakterie se obecně považují za nejstarší organismy na planetě. Doposud je popsáno cca 5000 druhů bakterií. Jedná se o prokaryotní mikroorganismus, kde je buňka schopná samostatně existovat a velikost této buňky je řádově v tisícinách milimetru. Dle jejich tvaru je dělíme do skupin:

- kulovité (koky)
- tyčinky
- vlákna
- spirály aj.

Od ostatních buněk se buňka bakterie liší tím, že genetická informace vázaná na DNA v jádře není ohraničena jadernou membránou a neobsahuje jádérko. Tyto buňky tedy nazýváme prokaryotní. Funkci jádra zde zastává pouze jeden chromozom, který nese geny, jejichž soubor se nazývá genom. Dále jsou v cytoplazmě obsaženy ribosomy, které slouží k syntéze bílkovin. Celá buňka je ohraničena cytoplazmatickou membránou a pevnou buněčnou stěnou. Na základě rozdílné struktury buněčné stěny dělíme bakterie na:

- grampozitivní bakterie: stěna je tvořena především peptidoglykanem a její tloušťka je 20 nm. S výjimkou mykobakterií, korynebakterií a nokardií neobsahuje buněčná stěna lipidy.
- gramnegativní bakterie: stěna je tvořena tenkou vrstvou peptidoglykanu, nad kterou najdeme vnější membránu. Tato membrána se skládá z fosfolipidové dvojvrstvy a bílkovin. Mezi vnější membránou a peptidoglykanem vzniká tzv. periplazmatický prostor.[63, 64]

3.1 Rod *Staphylococcus*

Rod *Staphylococcus* byl poprvé popsán skotským chirurgem Sirem Alexandrem Ogstonem jako příčina řady patogenních infekcí u lidí. Jedná se o chemoorganotrofní, grampozitivní, nesporulující, fakultativně anaerobní a nepohyblivé bakterie. Vyskytuje se jako jednotlivé buňky v párech nebo jako krátký řetězec jednotlivých buněk. Tento rod vytváří na živných půdách neprůhledné kolonie, které jsou bílé, krémové nebo žlutooranžové barvy. [63, 65, 66]

- *Staphylococcus aureus*

Je řazen mezi nejvýznamnější patogeny, produkuje látky, které umožňují napadat hostitelskou buňku a způsobovat různá onemocnění. Některé kmeny jsou schopny produkovat toxiny a také enterotoxiny, které způsobují závažné otravy z potravin. V dnešní době je známo cca 21 enterotoxinů, které jsou popsány písmeny A-V. Jsou to tepelně stabilní, ve vodě rozpustné proteiny, které mají schopnost odolávat enzymům jako je pepsin nebo trypsin. *S. aureus* se nachází v kůži, kožních žlázách a sliznici. Roste při teplotách mezi 7-45 °C a hodnota pH bývá 4-10. Optimální podmínky jeho růstu jsou při teplotě 37 °C a při neutrální hodnotě pH 6-7. Obecně přežívá za nepříznivých podmínek a je odolný vůči mrazu či sušení. Růst *S. aureus* je také velmi citlivý na konkurenci z jiných organismů, které mohou být přítomny ve směsné mikroflóře nebo v procesu fermentace potravin. *S. aureus* je schopen tvořit biofilm např. na potravinářských plochách, pracovních plochách, ale rovněž na sliznicích a na implantátech.

[63, 65, 67, 68, 69]



Obrázek 4 *Staphylococcus aureus* na krevním agaru [70]

- *Staphylococcus epidermidis*

Jedná se o grampozitivní bakterii vyskytující se jako komenzál kůže a sliznice. Pro je růst je nutný dostatečný přísun dusíku a vitamíny skupiny B. Jeho velikost je 0,5 -1,5 μm a optimální teplota kultivace je stejně jako u *S. aureus* 37°C. Tvoří biofilm, který se snadno váže na polystyren, nejčastěji jej nacházíme na implantátech. [63, 65, 71]



Obrázek 5 *Staphylococcus epidermidis* na krevním agaru [72]

3.2 Rod *Enterococcus*

Jsou to nesporeující, oválné grampozitivní bakterie. Lze je nalézt v půdě, vodě, v rostlinách či gastrointestinálním traktu. Jsou to fakultativně anaerobní bakterie, které tvoří dvojice buněk či krátké řetězce, kde jsou buňky protáhlé ve směru řetězce. Produkují hlavně mléčné kyseliny a mají vysoké nutriční požadavky a jsou odolné vůči stresovým podmínkám. Optimální pH růstu bakterie je v rozmezí 4,4 až 10,6 a optimální teplota je 37°C. *Enterococcus* je rezistentní vůči mrazu a některým antibiotikům. V dnešní době je známo okolo 40 druhů z rodu *Enterococcus*, jako jsou např. *E. camelliae*, *E. cecorum*, *E. faecalis*.

- *Enterococcus faecalis*

Přenáší rezistenci na antibiotika pomocí transpozonů, chromozomální výměnou či mutací. Hlavní mechanismus rezistence zahrnuje změnu cílového místa nebo jeho nahrazení. Rezistence je kódována specifickými geny a umožňuje *E. faecalis* růst v přítomnosti antibiotik a to při vysokých koncentracích. [73, 74, 75]



Obrázek 6 *Enterococcus faecalis* na krevním agaru [76]

3.3 *Escherichia coli*

Jedná se o fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinkovité bakterii, která je členem čeledi *Enterobacteriaceae*. Je to jeden z prvních kolonizátorů gastrointestinálního traktu. Její růst zajišťují jednoduché zdroje uhlíku, včetně glukózy a kyseliny octové. Roste nejlépe při neutrálních pH a při teplotě 37°C. Je obyvatelem střev živočichů, kde zajišťuje správný chod trávicího traktu. Používá se ke stanovení zdrojů fekálního znečištění. Některé kmeny *E. coli* mohou způsobovat zánětlivá onemocnění. Může být součástí biofilmů na dně řek, jezer a v nádržích s pitnou vodou. [73, 77, 78]

E. coli bývá někdy rezistentní na antibiotika. Nestabilita jejího genomu a výměna genů způsobuje změnu vlastností a struktury její populace. [73]



Obrázek 7 *E. coli* na krevním agaru [79]

3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Jedná se o gramnegativní, pohyblivý, nesporulující a striktně aerobní patogenní mikroorganismus. Vyskytuje se jednotlivě, v párech nebo i v krátkých řetězcích. Je to všudypřítomná bakterie se schopností produkovat enterotoxiny, ale produkuje i toxické látky, které bývají spojeny s hypoglykemií. Nalézt jí můžeme v půdě, znečištěné vodě a je citlivá na teplo či sušení. Její růst nastává i při teplotě 42°C, ale při 4°C již neroste. Její optimální teplotou pro růst je však 37°C. Nevyžaduje růstové faktory, má schopnost se množit na široké škále podkladů. Je nutričně univerzální, může produkovat celou řadu extracelulárních enzymů a rozsáhlou slizovou vrstvu, která má rezistenci vůči různým protimikrobiálním látkám a chrání bakterii proti širokému spektru problémů.

P. aeruginosa má velký chromosom, ve kterém lze pomocí plazmidů vyměnit určité úseky. *P. aeruginosa* je spojována s nemocemi z potravin a také s nemocničními nákazami. Obvykle nenapadá zdravé tkáně, ale na poškozené tkáni může způsobit vážné infekce.

Pseudomonas aeruginosa tvoří biofilm, např. v nádobách na výrobu léčiv, v nádobách s amoniiovými sloučeninami nebo na lahvích s balenou minerální vodou. [63, 73, 77, 80]



Obrázek 8 *Pseudomonas aeruginosa* na universálním agaru [81]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Složení roztoků a živných médií

Minerální médium MM1

Na přípravu 100 ml minerálního média MM1 bylo použito:

- | | |
|--|--------|
| • Roztok A (KH_2PO_4 9,07 g.l ⁻¹) | 2 ml |
| • Roztok B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 23,90 g.l ⁻¹) | 8 ml |
| • Destilovaná voda | 85 ml |
| • Roztok stopových prvků | 0,2 ml |
| • $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10g.l ⁻¹) | 1 ml |
| • $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3g.l ⁻¹) | 1 ml |
| • $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1g.l ⁻¹) | 1 ml |
| • NH_4Cl (30g.l ⁻¹) | 1 ml |
| • NaCl (50g.l ⁻¹) | 1 ml |

Minerální médium MM2

Minerální médium MM2 obsahovalo dvojnásobnou koncentraci všech složek oproti médiu MM1.

Živné médium TSB

Jedná se o tryptický a sojový bujon s glukosou (TSB). Na přípravu 100 ml bylo naváženo:

- | | |
|----------------------------|--------|
| • Trypton | 1,7 g |
| • Soja-pepton | 0,3 g |
| • NaCl | 0,5 g |
| • K_2HPO_4 | 0,25 g |
| • Glukosa | 0,5 g |

Vše bylo postupně dokonale rozpuštěno v destilované vodě a sterilizováno filtrací přes membránový filtr MILLIPORE MCE s velikostí pórů 0,22 μm do sterilních zkumavek.

Složení roztoku stopových prvků:

MnSO ₄ ·5H ₂ O.....	0,043 g
H ₃ BO ₃	0,057 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,043 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O.....	0,037 g
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O.....	0,025 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O.....	0,040 g

Navážená množství stopových prvků byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody.

33% kyselina octová

Ke stanovení tvorby biofilmu byla zředěna koncentrovaná ledová kyselina octová na 33 % roztok. Ředění bylo prováděno odpipetováním 66,6ml koncentrované ledové kyseliny octové do 250 ml odměrné baňky a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

Dále byly použity tyto roztoky:

1%-tní roztok PVP, sterilizovaný filtrací přes membránový filtr MILLIPORE MCE s velikostí pórů 0,22 μm.

10%-tní roztok PVP, sterilizovaný filtrací přes membránový filtr MILLIPORE MCE s velikostí pórů 0,22 μm.

Krystalická violet: byl použit roztok pro Gramovo barvení bakterií.

Sterilní destilovaná voda

Sterilní fyziologický roztok: roztok NaCl 8,5 g/l, sterilizovaný v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut.

Pufrovaný fyziologický roztok (PFR) - 500 ml: 450 ml fyziologického roztoku (8,5 g NaCl/l) bylo smícháno s 10 ml roztoku A (KH₂PO₄) a 40 ml roztoku B (Na₂HPO₄·12H₂O). Roztok byl sterilizovaný v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut.

Roztok PVP v PFR – 1200 mg/l, 100 ml: 120 mg PVP bylo rozpuštěno v 90 ml PFR, po rozpuštění byl objem doplněn na 100 ml PFRem. Roztok byl sterilizovaný v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut.

Roztok PVP v PFR – 1000 mg/l, 100 ml: 100 mg PVP bylo rozpuštěno v 90 ml PFR, po rozpuštění byl objem doplněn na 100 ml PFRem. Roztok byl sterilizovaný v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut.

4.2 Použité přístroje a pomůcky

- Biologický termostat nastaven na 25°C
- Biologický termostat nastaven na 37°C
- Laboratorní váhy
- Laminární aseptický box TELSTAR BIO-II-A
- Pipety
- Kádinky
- Mikrotitrační destičky a víčka
- Petriho misky
- Destičkový spektrofotometr TECAN SUNRISE
- Vratná laboratorní třepačka
- Vortex
- Centrifuga
- Magnetické míchadlo
- Kyvety
- Automatický analyzátor na měření uhlíku Shimadzu 5000A
- Vzorkovnice pro stanovení DOC

4.3 Použité kultury

V práci byly jednak použity environmentální kultury, získané v předcházejících pracích mikrobiologické laboratoře ÚIOŽP FT a dlouhodobě uložené při -80°C , a jednak sbírkové kultury, získané z České sbírky mikroorganismů Brno (CCM).

Environmentální kultury: MSZ, MS2, JF1, MP10, MP11, MP13

Kultury sbírkové:

G+: *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221, *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418, *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Staphylococcus aureus* CCM 2022, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Enterococcus faecalis* CCM 7000, *Enterococcus faecalis* CCM 2665

G-: *Escherichia coli* CCM 3954, *Escherichia coli* CCM 3988, *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Pseudomonas aeruginosa* FT 1 až 4

4.4 Postupy pokusů

4.4.1 Zkumavkový test

Vysterilizované MM1 bylo dále rozděleno na dvě minerální média A, B po 50 ml. Do minerálního média A byl asepticky přidán N-methyl-2-pyrrolidon (NMP) 100 mg/l (tj. 50 μl 10%-tního roztoku NMP). Do minerálního média B byl asepticky přidán NMP 100 mg/l a PVP 600 mg/l (tj. 50 μl 10%-tního roztoku NMP + 300 μl 10%-tního roztoku PVP). Z každého média bylo připraveno 14 zkumavek po 3 ml. Pro každou z kultur byla zhotovena suspenze ve sterilním fyziologickém roztoku (2.st. McFarlandovy stupnice) a naočkována do dvou zkumavek ze série A a do dvou zkumavek ze série B po 20 μl . Zbylé zkumavky sloužily jako kontrola. Tyto zkumavky byly inkubovány při 25°C na vratné laboratorní třepače a vizuálně kontrolovány po dvou a třech dnech.

4.4.2 Pokusy v mikrotitračních destičkách, při koncentraci PVP 600 mg/l

Byly připraveny suspenze vybraných kultur o hustotě 2. stupně McFarlandovy stupnice.

Do 98 ml minerálního média MM2 byly asepticky přidány 2 ml sterilního 10 % roztoku NMP. Poté bylo do sterilní mikrotitrační destičky nadávkováno:

- a) Do všech jamek sloupců 1,2-4,5-7,8-10,11 bylo nadávkováno 100 μ l MM2 s NMP.
- b) Do všech jamek sloupců 1,4,7,10 bylo nadávkováno 80 μ l sterilní destilované vody (bez PVP).
- c) Do všech jamek sloupců 2,5,8,11 bylo nadávkováno 12 μ l sterilního 1 %-tního roztoku PVP a 68 μ l sterilní destilované vody (PVP 600mg/l).
- d) Jamky sloupců 1 a 2 byly naočkovány po 20 μ l suspenze kultury MS2.
- e) Jamky sloupců 4 a 5 byly naočkovány po 20 μ l suspenze kultury MSZ.
- f) Jamky sloupců 7 a 8 byly naočkovány po 20 μ l suspenze kultury JF1.
- g) Jamky sloupců 10 a 11 byly naočkovány po 20 μ l suspenze kultury MP13.

Mikrotitrační destička byla přikryta víčkem a byla ponechána v klidu v biologickém termostatu na inkubaci při 25°C. Po inkubaci 4 dnů byla spektrofotometricky stanovena intenzita tvorby biofilmu.

4.4.3 Pokus v mikrotitrační destičce s MM2, při koncentraci PVP 200 mg/l

Byl zopakován stejný postup jako při pokusu v mikrotitrační destičce s MM2, při koncentraci PVP 600 mg/l. Do sterilní mikrotitrační destičky bylo ale nadávkováno:

- a) Do všech jamek sloupců 1,2-4,5-7,8-10,11 bylo nadávkováno 100 μ l MM2 s NMP.
- b) Do všech jamek sloupců 1,4,7,10 bylo nadávkováno 80 μ l sterilní destilované vody (bez PVP).
- c) Do všech jamek sloupců 2,5,8,11 bylo nadávkováno 4 μ l sterilního 1 %-tního roztoku PVP a 76 μ l sterilní destilované vody (PVP 200 mg/l).
- d) Jamky sloupců 1 a 2 byly naočkovány po 20 μ l suspenze kultury MS2.
- e) Jamky sloupců 4 a 5 byly naočkovány po 20 μ l suspenze kultury MSZ.
- f) Jamky sloupců 7 a 8 byly naočkovány po 20 μ l suspenze kultury JF1.
- g) Jamky sloupců 10 a 11 byly naočkovány po 20 μ l suspenze kultury MP13.

Mikrotitrační destička byla přikryta víčkem a ponechána v klidu v biologickém termostatu na inkubaci při 25°C. Po inkubaci 4 dnů byla spektrofotometricky stanovena intenzita tvorby biofilmu.

4.4.4 Pokusy v mikrotitrační destičce s TSB, s koncentrací PVP 500 mg/l

Do jamek 2 sloupců mikrotitrační destičky asepticky napipetováno po 170 μ l sterilního TSB. Do jamek jednoho sloupce bylo asepticky napipetováno po 10 μ l sterilní destilované vody a do jamek druhého sloupce bylo asepticky napipetováno po 10 μ l sterilního 1%-tního roztoku PVP. Do všech jamek obou sloupců bylo naočkováno po 20 μ l suspenze vybrané kultury. Inkubace destičky byla dva dny při 37°C, poté byla spektrofotometricky stanovena intenzita tvorby biofilmu.

4.4.5 Spektrofotometrické stanovení tvorby biofilmu

Obsah jamek mikrotitrační destičky byl po inkubaci vylit a jamky byly 3krát promyty fyziologickým roztokem, po 250 μ l, při důkladném proklepávání. Do každé jamky bylo dále poté napipetováno 200 μ l roztoku krystalové violeti, která se nechala působit po dobu 1 minuty. Pak byla violeť vylita a destička byla promyta 3krát destilovanou vodou a sušena vysoko nad plamenem kahanu. Na rozpuštění barviva na biofilmu byla použita 33%-tní kyselina octová, která byla přidána do každé jamky, po 200 μ l, a nechala se 10 minut působit. Destička pak byla vložena do destičkového spektrofotometru TECAN a byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm.

4.4.6 Záchyt a promytí buněk po kultivaci

Suspenze buněk byla rozdělena 4x po 35 ml do 4 kyvet a centrifugována 12 minut při 4°C, při 10 000 g. Supernatant byl opatrně slit z každé kyvety a buňky byly resuspendovány v 25 ml PFR. Znovu byla provedena centrifugace 12 minut při 4°C, při 10 000g, supernatant byl opatrně slit a buňky byly opět resuspendovány v 25 ml PFR. Třetí centrifugace byla také 12 minut při 4°C, při 10 000g. Slitím supernatantu byly již buňky promyty a byly resuspendovány v 10 ml PFR. Takto resuspendované buňky byly přelity do odměrného válce. Dále byla každá kyveta ještě propláchnuta 5 ml PFR a vše bylo slito dohromady a objem byl doplněn na 70 ml PFRem. Byla získána resuspense promytých buněk o dvojnásobné koncentraci jako po kultivaci.

4.4.7 Adsorpce

Do 6 kádinek, předem dobře vymytých a vysušených, bylo za míchání nadávkováno:

1: 10 ml promytých buněk a 10 ml roztoku PVP v PFR

2: 10 ml promytých buněk a 10 ml roztoku PVP v PFR

3: 10 ml promytých buněk a 10 ml PFR

4: 10 ml promytých buněk a 10 ml PFR

5: 10 ml PFR a 10 ml roztoku PVP v PFR

6: 10 ml PFR a 10 ml roztoku PVP v PFR

Do kádinek byla vložena čistá magnetická míchadla, směsi byly dále pozvolna míchány na magnetických míchačkách 15 minut. Poté bylo z kádinek odebráno 10 ml, centrifugováno na centrifuze Rotanta 12 minut při 4°C, při 10 000 g. Supernatant nebyl slit, ale byl opatrně odebírán a ředěn takto:

1, 2, 5, 6: Odebrány 2 ml, přidáno 10 ml destilované vody (ředění 6x) a po promíchání vzorky nality do vzorkovnic pro stanovení rozpuštěného organického uhlíku (DOC)

3, 4: Odebráno 6 ml, neředěno a nalito do vzorkovnic pro stanovení DOC

4.4.8 Měření DOC

DOC bylo měřeno na automatickém analyzátoru, včetně DOC PFR (neředěno, ve 2 vzorkovnicích) a roztoku PVP v PFR (10 x zředěno, 1 ml PVP : 9 ml destilované vody).

5 VÝSLEDKY EXPERIMENTŮ A DISKUSE

Pro ověřovací (orientační) pokus tvorby biofilmu byla použita zkumavková metoda, kdy se biofilm u vybraných kultur pozoroval vizuálně. V dalších pokusech již byla zvolena jiná technika a to metoda pokusů v mikrotitračních destičkách, kdy byla intenzita tvorby biofilmu exaktně hodnocena z výsledků absorbance.

5.1 Ověřovací pokus

Vybrané kultury byly naočkovány na univerzální agar (TYA) a kultivovány po dobu 4 dní. Sterilní minerální médium MM1 bylo rozděleno na dvě části A, B (viz. Zkumavkový test výše), přičemž obě obsahovaly 100 mg/l NMP a část B navíc 600 mg/l PVP. Suspenze zkoumaných kultur byly naočkovány do série A i B a v průběhu inkubace při 25°C byla vizuálně pozorována tvorba vloček či případná tvorba biofilmu v obou typech médií. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2 a 3.

Tabulka 2 Vyhodnocení zkumavkového testu

Použitá kultura	JF1	MSZ	MS2
kontrola			
po 3 dnech	Stejný počet vloček v A i B	Vločky pouze v B	Bez vloček
Po 5 dnech	Více vloček v B	Vločky pouze v B	Málo vloček v A i B
Po 8 dnech	Stejný počet vloček v A i B	Vločky v A, více vloček v B	Málo vloček v A i B
po 11 dnech	Stejný počet vloček v A i B	Více vloček v B	Málo vloček v A i B

Tabulka 3 Vyhodnocení zkumavkového testu

Použitá kultura			
kontrola	MP10	MP11	MP13
po 3 dnech	Bez vloček	Málo vloček v A i B stejně	Málo vloček v A i B stejně
Po 5 dnech	Bez vloček	Málo plochých vloček v A i B stejně	Málo vloček v A i B stejně
Po 8 dnech	Velmi málo vloček v A i B stejně	Málo plochých vloček v A i B stejně	Více vloček v B než v A
po 11 dnech	Velmi málo vloček v A i B stejně	Větší počet vloček v A i B stejně	Více vloček v B než v A

U některých kultur byl v průběhu kultivace zjištěn jistý rozdíl mezi zkumavkami s PVP (B) a bez PVP (A). U kultur JF1, MSZ a MP13 bylo v určité fázi růstu pozorováno větší množství vloček, naznačující odlišné flokulační vlastnosti buněk v přítomnosti PVP. Kultura MSZ také ukázala jisté rozdíly mezi zkumavkami s PVP a bez PVP a to tak, že tvorba biofilmu byla více vizuálně pozorována u zkumavky s PVP. U kultury MS2 byl však pozorován jen velmi nepatrný rozdíl a u kultur MP10 a MP11 bylo možno hodnotit rozdíl jako zanedbatelný. Do dalšího, přesnějšího pokusu byly tedy vybrány kultury JF1, MSZ, MS2 a MP13.

5.2 Tvorba biofilmu environmentálními kulturami

Z předchozího ověřovacího pokusu byly vybrány kultury MS2, MSZ, JF1, MP13, u kterých byla v přítomnosti PVP zaznamenána zvýšená tvorba vloček. Tyto kultury byly naočkovány do jamek mikrotitrační destičky, kde byl jako růstový substrát použit NMP a polovina jamek obsahovala 600 mg/l PVP. Po uplynutí 4 dní inkubace byla stanovena tvorba biofilmu (viz. Spektrofotometrické stanovení tvorby biofilmu); absorbance spolu s průměry, směrodatnou odchylkou, rozptylem a t-testem jsou uvedeny v následující v tabulce 4.

Tabulka 4 Hodnoty absorbancí v závislosti na tvorbě biofilmu (environmentální kultury)

absorbance	MS2	MS2 +PVP	MSZ	MSZ +PVP	JF1	JF1 +PVP	MP13	MP13 +PVP
1	0,792	1,088	0,445	0,389	0,248	0,301	0,922	0,919
2	0,692	1,015	0,448	0,218	0,241	0,301	0,925	0,784
3	0,643	1,126	0,475	0,293	0,372	0,398	1,127	0,879
4	0,844	0,979	0,635	0,226	0,324	0,385	0,883	0,838
5	0,746	1,089	0,318	0,226	0,376	0,326	0,766	0,857
6	0,704	1,123	0,318	0,419	0,243	0,631	0,938	0,878
7	0,976	1,3	0,256	0,494	0,176	0,494	0,978	0,886
8	0,736	1,209	0,515	0,364	0,308	0,402	1	0,906
Průměr	0,767	1,116	0,474	0,329	0,302	0,357	0,968	0,880
směrodatná odchylka	0,1046	0,1022	0,0828	0,1035	0,0783	0,0678	0,0801	0,0487
Rozptyl	0,0109	0,0104	0,0069	0,0107	0,0061	0,0046	0,0064	0,0024
t-test	6,32		2,89		1,40		5,56	

Hodnocení výsledků bylo prováděno na základě t-testu, kde kritická hodnota na hladině významnosti 0,05 je 2, 145 [83]. Z výsledků bylo tedy patrné, že v případě kultury MS2 došlo v přítomnosti PVP k průkaznému nárůstu intenzity tvorby biofilmu, naopak, u kultury MP13 byla zjištěna opačná tendence. U kultury MSZ se také projevila snížená intenzita tvorby biofilmu jako u kultury MP13, avšak výsledek nebyl tak výrazný jako u kultury MP13. Pro srovnání byl udělán další pokus v mikrotitrační destičce u stejných kultur (MS2, MSZ, JF1, MP13), ale při koncentraci PVP 200 mg/l). Po uplynutí 4 dní byla opět stanovena tvorba biofilmu a výsledky jsou uvedeny v následující v tabulce 5.

Tabulka 5 Hodnoty absorpací v závislosti na tvorbě biofilmu (environmentální kultury)

absorbance	MS2	MS2 +PVP	MSZ	MSZ +PVP	JF1	JF1 +PVP	MP13	MP13 +PVP
1	1,525	1,488	0,827	0,449	0,318	0,303	1,511	1,273
2	1,263	1,335	0,684	0,373	0,398	0,274	1,235	1,212
3	1,278	1,363	0,596	0,213	0,665	0,276	1,186	1,231
4	1,661	1,181	0,507	0,31	0,4	0,262	1,478	1,311
5	1,769	0,821	0,659	0,271	0,472	0,247	1,471	1,405
6	1,531	1,015	0,562	0,342	0,311	0,296	1,275	1,14
7	1,083	1,157	0,57	0,382	0,507	0,259	1,564	1,413
8	1,713	1,12	0,639	0,321	0,462	0,257	1,542	1,331
Průměr	1,478	1,185	0,623	0,333	0,432	0,276	1,399	1,138
směrodatná odchylka	0,2451	0,2113	0,0923	0,0722	0,1004	0,0160	0,1603	0,0923
Rozptyl	0,0601	0,0446	0,0085	0,0052	0,0101	0,0003	0,0257	0,0085
t-test	2,39		6,55		4,07		3,73	

Z pokusu tedy vyplývá, že i nižší koncentrace PVP měla určitý vliv na výsledky tvorby biofilmů. Dle t-testu bylo vyhodnoceno, že u všech kultur má PVP vliv na tvorbu biofilmu. U kultury MS2 však byla tvorba biofilmu s přidavkem PVP o koncentraci 200 mg/l překvapivě snižena, byť hodnota t-testu jen těsně překročila kritickou mez (2,145), ačkoliv u koncentrace PVP 600 mg/l byla prokazatelně zvýšená. U kultury MSZ byla tvorba biofilmu s přidavkem PVP o koncentraci 200 mg/l výrazně snížena, kdežto s přidavkem PVP o koncentraci 600 mg/l byla intenzita tvorby biofilmu neprokazatelně snížena. U kultury JF1 se v předchozím pokusu s vyšší koncentrací PVP neprojevil jeho vliv na intenzitu tvorby biofilmu, ale naopak tomu bylo při snížené koncentraci PVP, kde se výrazně projevila snížená intenzita tvorby biofilmu. Kultura MP13 z předchozích výsledků prokazatelně snižovala tvorbu biofilmu a i při použití nižší koncentrace PVP se intenzita tvorby biofilmu snižovala.

5.3 Tvorba biofilmu farmaceuticky významnými kulturami bakterií

Farmaceuticky významné kultury byly zkoumány obdobným způsobem jako kultury environmentální, avšak pro jejich růst v mikrotitračních destičkách byl použit universální TSB bujon a tvorba biofilmu byla sledována v přítomnosti 500 mg/l PVP a bez něj. Výsledky, tj. absorbance spolu s průměry, směrodatnou odchylkou, rozptylem a t-testem jsou uvedeny v následujících tabulkách 6, 7, 8, 9, 10, 11.

Tabulka 6 Hodnoty absorbancí v závislosti na tvorbě biofilmu (farmaceutické kultury)

absorbance	<i>S. epidermidis</i> CCM 7221	<i>S. epidermidis</i> CCM 7221 +PVP	<i>S. aureus</i> CCM 3953	<i>S. aureus</i> CCM 3953 +PVP	<i>S. aureus</i> CCM 2022	<i>S. aureus</i> CCM 2022 +PVP
1	2,307	2,344	1,135	0,893	0,234	0,208
2	2,964	2,585	1,213	0,843	0,222	0,202
3	2,241	2,267	1,109	0,941	0,239	0,21
4	2,606	2,357	0,9	0,706	0,248	0,191
5	2,063	2,335	1,028	0,787	0,234	0,204
6	1,624	2,251	1,208	0,686	0,243	0,2
7	1,97	2,699	0,958	0,8	0,199	0,223
8	1,02	1,809	0,723	0,749	0,188	0,203
Průměr	2,099	2,331	1,027	0,801	0,230	0,206
směrodatná odchylka	0,5948	0,2629	0,1830	0,0886	0,0220	0,0086
Rozptyl	0,3538	0,0691	0,0335	0,0079	0,0005	0,0007
t-test	0,94		2,95		2,62	

Tabulka 7 Hodnoty absorbancí v závislosti na tvorbě biofilmu (farmaceutické kultury)

absorbance	<i>S. epidermidis</i> CCM 4418	<i>S. epidermidis</i> CCM 4418 +PVP	<i>E. faecalis</i> CCM 4224	<i>E. faecalis</i> CCM 4224 +PVP	<i>E. faecalis</i> CCM 2665	<i>E. faecalis</i> CCM 2665 +PVP
1	0,857	0,924	0,386	0,372	0,461	0,558
2	0,947	1,647	0,349	0,292	0,285	0,362
3	1,605	2,184	0,373	0,342	0,334	0,336
4	0,977	2,004	0,38	0,285	0,303	0,324
5	0,943	1,915	0,387	0,353	0,323	0,364
6	1,089	2,108	0,402	0,384	0,322	0,384
7	1,113	1,568	0,448	0,349	0,36	0,383
8	0,905	0,630	0,562	0,399	0,418	0,510
Průměr	1,055	1,623	0,411	0,347	0,351	0,403
směrodatná odchylka	0,2388	0,5680	0,0673	0,0408	0,0601	0,0847
Rozptyl	0,0570	0,3227	0,0045	0,0017	0,0036	0,0072
t-test	2,61		2,30		1,41	

Tabulka 8 Hodnoty absorbancí v závislosti na tvorbě biofilmu (farmaceutické kultury)

absorbance	<i>E. faecalis</i> CCM 7000	<i>E. faecalis</i> CCM 7000 +PVP	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> CCM 4415	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> CCM 4415 +PVP	<i>Ps.</i> <i>aeruginosa</i> CCM 3955	<i>Ps.</i> <i>aeruginosa</i> CCM 3955 +PVP
1	0,325	0,354	2,513	1,989	1,173	1,358
2	0,346	0,31	2,492	1,766	1,278	1,113
3	0,291	0,297	2	1,809	1,373	1,36
4	0,321	0,337	1,037	1,862	0,932	1,267
5	0,317	0,331	1,376	1,89	1,363	0,996
6	0,361	0,417	2,412	1,695	1,433	1,318
7	0,344	0,398				
8	0,358	0,463				
Průměr	0,333	0,363	1,972	1,835	1,259	1,235
směrodatná odchylka	0,0237	0,0574	0,6304	0,1025	0,1837	0,1488
Rozptyl	0,0006	0,0033	0,3974	0,0105	0,0338	0,0221
t-test	1,39		0,52		0,24	

Tabulka 9 Hodnoty absorbancí v závislosti na tvorbě biofilmu (farmaceutické kultury)

absorbance	<i>E. coli</i> CCM 3988	<i>E. coli</i> CCM 3988 +PVP	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>E. coli</i> CCM 3954 +PVP
1	0,73	2,362	0,173	0,202
2	0,909	1,877	0,183	0,156
3	0,646	1,78	0,164	0,129
4	0,841	2,105	0,158	0,129
5	1,851	1,464	0,147	0,147
6	1,110	1,586	0,137	0,125
průměr	1,015	1,862	0,160	0,148
směrodatná odchylka	0,4397	0,3318	0,0168	0,0291
Rozptyl	0,1934	0,1101	0,0003	0,0008
t-test	3,77		0,90	

Tabulka 10 Hodnoty absorbancí v závislosti na tvorbě biofilmu (farmaceutické kultury)

absorbance	<i>Ps. aeruginosa</i> FT 1	<i>Ps. aeruginosa</i> FT 1 +PVP	<i>Ps. aeruginosa</i> FT 2	<i>Ps. aeruginosa</i> FT 2 +PVP
1	0,157	0,138	0,291	0,299
2	0,144	0,137	0,322	0,269
3	0,128	0,134	0,259	0,286
4	0,155	0,138	0,262	0,262
5	0,15	0,138	0,282	0,301
6	0,146	0,144	0,284	0,334
7	0,146	0,151	0,334	0,286
8	0,210	0,156	0,371	0,399
průměr	0,155	0,142	0,301	0,305
směrodatná odchylka	0,024	0,008	0,039	0,044
Rozptyl	0,0006	0,0001	0,0015	0,0019
t-test	1,31		0,17	

Tabulka 11 Hodnoty absorbancí v závislosti na tvorbě biofilmu (farmaceutické kultury)

absorbance	<i>Ps. aeruginosa</i> FT 3	<i>Ps. aeruginosa</i> FT 3 +PVP	<i>Ps. aeruginosa</i> FT 4	<i>Ps. aeruginosa</i> FT 4 +PVP
1	0,293	0,260	0,041	0,04
2	0,26	0,213	0,055	0,049
3	0,251	0,252	0,134	0,049
4	0,267	0,269	0,061	0,046
5	0,254	0,298	0,046	0,045
6	0,243	0,319	0,047	0,042
7	0,28	0,292	0,266	0,041
8	0,275	0,274	0,049	0,083
průměr	0,265	0,272	0,087	0,049
směrodatná odchylka	0,016	0,032	0,078	0,014
Rozptyl	0,0003	0,0010	0,0061	0,0002
t-test	0,49		1,27	

Hodnocení výsledků bylo prováděno na základě t-testu, kde kritická hodnota na hladině významnosti 0,05 je 2, 145 [83]. Dle t-testu bylo vyhodnoceno, že u kultur *S. aureus* CCM 3953, *S. aureus* CCM 2022, *S. epidermidis* CCM 4418, *E. faecalis* CCM 4224 a *E. coli* CCM 3988 má PVP v koncentraci 500 mg/l vliv na tvorbu biofilmu. U kultur *S. epidermidis* CCM 4418 a *E. coli* CCM 3988 byla tvorba biofilmu s přidavkem PVP zvýšena a naopak u kultury *S. aureus* CCM 3953, *S. aureus* CCM 2022, *E. faecalis* CCM 4224 byla tvorba biofilmu s přidavkem PVP snížena.

U ostatních kultur nebyl vliv PVP na tvorbě biofilmu průkazný. Kultura *E. coli* CCM 3988 byla díky své zvýšené tvorbě biofilmu s přidavkem PVP vybrána k dalšímu pokusu a to k adsorpci.

5.4 Pokus adsorpce PVP na buňky kultury MS2

Bylo připraveno 200 ml minerálního média MM1, které bylo rozplněno po 70 ml do dvou sterilních 500 ml lahví. 24-hodinová kultura MS2 byla zaočkována kličkou do média. Kultivace probíhala 48 hodin při 25°C na vratné laboratorní třepačce. Dále byl proveden záchyt a promytí buněk (viz. Záchyt promytých buněk po kultivaci) a následně byla provedena adsorpce PVP na buňky; při adsorpci byla koncentrace PVP 600 mg/l (viz. Adsorpce). Po odstředění buněk bylo formou stanovení DOC zjišťováno, zda nastal úbytek PVP ze supernatantu. Výsledky pokusu jsou uvedeny níže, včetně výsledků kontrolních vzorků.

Tabulka 12 Výsledky DOC supernatantu po adsorpci a odstranění buněk (MS2)

	Naměřené DOC [mg/l]	DOC po přepočtu ředění [mg/l]	Průměr [mg/l]
PVP + buňky	51,75	310,50	315,54
PVP + buňky	53,43	320,58	
PFR + buňky	6,25	6,25	5,64
PFR + buňky	5,02	5,02	
PVP+PFR	54,77	328,62	332,85
PVP+PFR	56,18	337,08	
PFR	1,84	1,84	1,57
PFR	1,30	1,30	
PVP v PFR	65,19	651,90	651,90

DOC (PVP) bez buněk: $328,62 - 1,57 = 327,05$ mg DOC/l

$337,08 - 1,57 = 335,51$ mg DOC/l

Průměr: 331,28 mg DOC/l

DOC (PVP po sorpci na buňky): 310,50- 5,64 = 304,86 mg DOC/l
320,58- 5,64 = 314,94 mg DOC/l
Průměr: 309,9 mg DOC/l

DOC buňky v PFR: 5,64-1,57 = 4,07 mg DOC/l

327,05 - 304,86 = 22,19 mg DOC/l

335,51 - 314,94 = 20,57 mg DOC/l

Průměr: **21,38 mg DOC/l**

Výsledky tohoto pokusu ukázaly, že při kontaktu buněk kultury MS2 s roztokem PVP skutečně došlo k jisté interakci mezi buňkami a molekulami PVP, neboť hodnoty DOC ukázaly, že z adsorpční směsi ubylo 21,38 mg/l uhlíku PVP z výchozí hodnoty 331,28 mg/l, což odpovídá 6,5%. Toto zjištění naznačuje, že by bylo velmi zajímavé zhodnotit adsorpci PVP na buňky kultury MS2 podrobnějšími testy, a to formou sestavení adsorpčních izoterem.

5.5 Pokus adsorpce PVP na kulturu *E. coli* CCM 3988

Byl zopakován stejný postup jako při adsorpci PVP na buňky kultury MS2. Místo minerálního média bylo ke kultivaci použito 200 ml TSB a následná adsorpce byla provedena s roztokem PVP v PFR tak, aby při adsorpci byla koncentrace PVP 500 mg/l. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 13, včetně kontrolních měření.

Tabulka 13 Výsledky DOC supernatantu po adsorpci a odstranění buněk (*E. coli* CCM 3988)

	Naměřené DOC [mg/l]	DOC po přepočtu ředění [mg/l]	Průměr [mg/l]
PVP + buňky	62,52	375,12	361,17
PVP + buňky	57,87	347,22	
PFR + buňky	20,76	20,76	20,35
PFR + buňky	19,93	19,93	
PVP+PFR	56,14	336,84	330,81
PVP+PFR	54,13	324,78	
PFR	2,65	2,65	1,85
PFR	1,04	1,04	
PVP v PFR	56,12	561,20	565,00
PVP v PFR	56,88	568,80	

DOC (PVP) bez buněk: $336,84 - 1,85 = 334,99$ mg DOC/l
 $324,78 - 1,85 = 322,93$ mg DOC/l
 Průměr: $328,96$ mg DOC/l

DOC (PVP po sorpci na buňky): $375,12 - 20,35 = 354,77$ mg DOC/l
 $347,22 - 20,35 = 326,87$ mg DOC/l
 Průměr: $340,82$ mg DOC/l

DOC buňky v PFR: $20,35 - 1,85 = 18,5$ mg DOC/l

$334,99 - 354,77 = -19,78$ mg DOC/l

$322,93 - 326,87 = -3,94$ mg DOC/l

Průměr: **-11,86 mg DOC/l**

Výsledky adsorpce ukázaly, že při kontaktu buněk kultury *E. coli* CCM 3988 s roztokem PVP nedošlo k adsorpci molekul PVP na buňky. Hodnoty DOC ukázaly záporný výsledek, který částečně mohl být způsoben experimentální nepřesností zvolené metody, ale který by také mohl naznačit jisté působení PVP na kulturu, neboť doposud není známo, jakým způsobem může PVP buňky *E. coli* ovlivnit. Pokus však ukázal, že dříve prokázané zvýšení intenzity tvorby biofilmu u dané kultury není dáno adsorpcí PVP na její buňky, a že podstata jevu bude složitější. Navíc výsledek tohoto pokusu zvýraznil výsledek předchozího pokusu adsorpce s kulturou MS2.

6 ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala studiem vlivu roztoků polyvinylpyrrolidonu na tvorbu biofilmu u zvolených bakteriálních kultur. V rámci práce byla jako první metoda, které byla pouze orientační, zvolena zkumavková metoda. Ta ukázala na určitý vliv PVP na některé použité environmentální kultury, které byly vybrány z předchozích diplomových prací. Tento pokus byl však sledován pouze vizuálně a sloužil k ověření, zda se biofilm díky roztoku PVP vytvořil či ne.

Další použité metody byly vybrány k podrobnějšímu studiu vlivu roztoku PVP nejen na environmentální kultury, ale byly také prozkoumány vybrané farmaceuticky významné bakteriální kultury. Byly tedy zvoleny pokusy v mikrotitračních destičkách, kde u environmentálních kultur bylo jako růstové médium zvolené minerální médium s N-methyl-2-pyrrolidon jako substrátem a u farmaceuticky významných kultur bylo jako růstové médium zvolen tryptický sojový bujon. Environmentální kultury byly také studovány s rozdílnými koncentracemi PVP a to 600 a 200 mg/l PVP, které se po srovnání výsledků projeví různě. U kultury MS2 byl při koncentraci PVP 600 mg/l zjištěn průkazný nárůst intenzity tvorby biofilmu, naopak při koncentraci 200 mg/l PVP byla intenzita tvorby biofilmu snížena, i když dle t-testu jen těsně překročila kritickou mez. Kultura MP13 projevila jinou tendenci, při obou koncentracích PVP byla tvorba biofilmu snížena. Dále také kultura MSZ prokazatelně snižovala svou tvorbu biofilmu při koncentraci PVP 200 mg/l. Kultura JF1, u které se při koncentraci PVP 600 mg/l jeho vliv neprojevil, však ukázala výrazně sníženou hodnotu tvorby biofilmu u koncentrace 200 mg/l.

Vybrané farmaceutické kultury byly studovány při jednotné koncentraci PVP 500 mg/l. Jeho vliv se projevil u kultur *S. aureus* CCM 3953, *S. aureus* CCM 2022 a *E. faecalis* CCM 4224 a to snížením intenzity tvorby biofilmu. Naopak u kultur *S. epidermidis* CCM 4418 a *E. coli* CCM 3988 se přítomnost roztoku PVP projevila zvýšenou intenzitou tvorby biofilmu.

Na základě výsledků pokusů v mikrotitračních destičkách bylo rozhodnuto o použití další metody, a to adsorpce. Tato metoda byla z časových důvodů použita pouze u environmentální kultury MS2 a u farmaceuticky významné kultury *E. coli* CCM 3988. Výsledky adsorpcí byly velmi rozdílné. Při kontaktu buněk kultury MS2 s roztokem PVP došlo k interakci mezi buňkami a molekulami PVP, neboť hodnoty DOC ukázaly, že z reakční směsi ubylo adsorpcí 21,38 mg/l uhlíku PVP, z výchozí hodnoty 331,28 mg/l, což odpovídá 6,5%. Pro podrobnější prozkoumání tohoto jevu by proto bylo zajímavé zhodnotit adsorpci PVP na buňky kultury MS2 sestavením adsorpčních izoterem. *E. coli* CCM 3988 se však projevila velmi rozdílně, výsledky stanovení DOC ukázaly, že k adsorpci PVP na její buňky nedošlo, dokonce byla výsledná hodnota DOC záporná a to -11,86 mg/l. Tento výsledek velmi

podtrhl výsledek u kultury MS2 a určitě by bylo další prozkoumání mechanismu zvyšování tvorby biofilmu u kultury *E. coli* CCM 3988 velmi potřebné.

Celkově tedy práce ukázala, že PVP má biologické účinky na řadu bakteriálních kultur a že nejde o látku biologicky inertní.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ENDRES, H.-J., SIEBERT-RATHS, A. (2011): *Engineering Biopolymers - Markets, Manufacturing, Properties and Applications*. Hanser Publishers. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpEBMMPA02/engineering-biopolymers/engineering-biopolymers>
- [2] MĚRKOVÁ, M. (2014): *Biodegradace syntetických polymerů bakteriemi rodu Sphingomonas*. Diplomová práce. Zlín. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
- [3] KŘÍŽEK, K. (2012): *Studium bakterií rozkládajících strukturní analogy vinylpyrrolidonu*. Diplomová práce. Zlín. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
- [4] BURRIDGE, E. (2005): PVP. *European Chemical News*. 83. 2173. ProQuest s. 42
- [5] TUNNEY, M.M., GORMAN S.P. (2002): Evaluation of a poly(vinyl pyrrolidone)- coated biomaterial for urological use. *Biomaterials* 23: 4601-4608
- [6] ANTONELLI, P. J., SAMPSON, E. M., OJANO-DIRAIN, C. (2011): Biofilm formation on silicone tympanostomy tubes with polyvinylpyrrolidone coating. *Arch otolaryngol head neck surg.* č. 137. Dostupné z: www.archfoto.com
- [7] WAGH, M. S., PATIL, R. H., THOMBRE, D. K., KULKARNI, M. V., GADE, W. N., KALE, B. B. (2012): Evaluation of anti-quorum sensing activity of silver nanowires. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 3593-3601. DOI 10.1007/s00253-012-4603-1
- [8] WIMPENNY, JWT. (2003): Togetherness – not just a biofilm thing. s. 319-340. V: McBain A, Allison D, Brading M, Rickard A, Verran J, Walker J (eds.): *Biofilm communities: Order from chaos?* BioLine, Cardiff
- [9] HALL-STOODLEY, L., STOODLEY, P. (2002): Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 228-233
- [10] DONLA, RM., CORSTERTON, JW. (2002): Biofilms: survival mechanism of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167-193
- [11] Dostupné z: <http://biomikro.vscht.cz/cz/research/groups/rokoska/projects.php>
- [12] MUELLER, RF., CHARACKLIS, WG., JONES, WL., SEARS, JT. (1992): Charakterization of initial events in bacteria surface colonization by two Pseudomonas species using image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 39: 1161-1170
- [13] GRISTINA, AG., SHIBATA, Y., GIRIDHAR, G., KREGER, A., MYRVIK, QN. (1994): The glycocalyx, biofilm, microbes and resistant infection. *Semin. Arthroplasty* 5:160-170

- [14] VON EIFF, C., JANSEN, B., KOHNEN, W., BECKER, K. (2005): Infections associated with medical devices: Pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs* 65: 179-214
- [15] NEU, TR. (2006): Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* 60:151-166
- [16] KELLY, CG., TODRYK, S., KENDAL, HL., MUNRO, GH., LEHNER, T. (1995): T-cell, adhesion, and B-cell epitopes of the cell-surface streptococcus-mutans protein antigen I/II. *Infect Immun.* 63. 3649-3658
- [17] RICE, AR., HAMILTON, MA., CAMPER, AK. (2000): Apparent surface associated lag time in growth of primary biofilm cells. *Microb. Ecol.* 41: 8-15
- [18] CERCA, N., PIER, GB., VILANOVA, M., OLIVEIRA, R., AZEREDO, J. (2005): Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Res. Microbiol.* 156: 506-514
- [19] CHARACKLIS, WG., MCFETERS, GA., MARSHALL, KC. (1990): Physiological ecology in biofilm system. s. 67-72. V: Characklis WG, Marshall KC (eds.): *Biofilms*. John Wiley and Sons, New York, 796 pp.
- [20] LINDSAY, D., VON HOLY, A. (2006): What food safety professionals should know about bacterial biofilms. *Br. Food J.* 208: 27-37
- [21] THOMSON, LJ., GRAY, V., LINDSAY, D., VAN HOLY, A. (2006): Carbon: nitrogen: phosphorus ratios influence biofilm formation by *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*. *J. Appl. Microbiol.* 101: 1105-1113
- [22] GILBERT, P., ALLISON, DG. (1993): Laboratory methods for biofilm production. s. 29-49. V: Denyer, SP, Gormann SP, Sussman M (eds.) (1993): *Microbial biofilms: Formation and control*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 336 pp.
- [23] PRATT LA, KOLTER R (1999): *Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: role of flagella, motility, chemotaxis and type I pili*. *Mol. Microbiol.* 30:285-293
- [24] O'TOOLE, G., KAPLAN, HB., KOLTER, R. (2000): Biofilms formation as microbial development. *Ann. Rev. Microbiol.* 54: 49-79
- [25] STOODLEY, P., SAUR, K., DAVIES, DG., COSTERTON, JW. (2002): Biofilms as complex differentiated communities. *Ann. Rev. Microbiol.* 56: 187-209
- [26] BELOIN, C., GHIGO, J-M. (2005): Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends Microbiol.* 13,1: 16-19

- [27] O'TOOLE, G., KOLTER, R. (1998): The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28: 449-461
- [28] SCHINDLER, J. (2001): Mikrobiální biofilm: Jak žijí bakterie v přirozeném prostředí. *Vesmír* 80, 4: 203-206
- [29] BOMCHIL, N., WATNICK, P., KOLTER, R. (2003): Identification and characterization of a *Vibrio cholerae* gene *mbaA* involved in the maintenance of biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 185: 1384-1390
- [30] VIDAL, O., LONGIN, R., PRINGENT-COMBARET, C., DOREL, C., HOOREMAN, M., LEJEUNE, P. (1998): Isolation of an *Escherichia coli* mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increase curli expression. *J. Bacteriol.* 180: 2442-2449
- [31] FLETCHER, M. (1996): Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies. s. 1-24. V: Fletcher M (ed.): *Bacterial adhesion : Molecular and ecological diversity*. John Wiley and Sons, Inc., New York, 361 pp.
- [32] DE FLAUN, MF., OPPENHEIMER, SR., STREGER, S., CONDEE, CW., FLETCHER, M. (1999): Alterations in adhesion, transport, and membrane characteristics in an adhesion- deficient pseudomonad. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 759-765
- [33] DE FLAUN, MF., MARSHALL, BM., KULLE, EP., LEVY, SB. (1994): Tn5 insertion mutants of *Pseudomonas fluorescens* defective in adhesion to soil and seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2637-2642
- [34] DVOŘÁČKOVÁ, K., MASTEIKOVÁ, R., CHALUPOVÁ, Z., BERNATONIENÉ, J. (2008): Implantáty jako lékové transportní systémy-teoretické aspekty implantátů obsahujících léčivo. *Remedia* (18. 3.): 253.
Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Images/Articles/Main/vtextu20081020073458.jpg>
- [35] COSTERTON, JW., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, DE., KORBER, DR., LAPPINSCOT, HM. (1995): Microbial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 49: 711-745
- [36] HAUSER, M., WUERTZ, S. (1999): High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3710-3713
- [37] HENDRICKX, L., HAUSER, M., WUERTZ, S. (2003): Natural genetic transformation in monoculture *Acinetobacter* sp. Strain BS413 biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1721-1727
- [38] SUTHERLAND, IW. (2001): Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 149: 1095-1102

- [39] SUTHERLAND, IW. (2001): The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9,5: 222-227
- [40] WIMPENNY, J., MANZ, W., SZEWZYK, U. (2000): Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 661-671
- [41] FLEMMING, HC. (1995): Sorption sites in biofilms. *Wat. Sci. Tech.* 32,8: 27-33
- [42] PAERL, HW., PINCKNEY, JL. (1996): A mini-review of microbial consortia: their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microb. Ecol.* 31: 225-247
- [43] KORBER, DR., LAWRENCE, JR., LAPPIN-SCOTT, HM., COSTERTON, JW. (1995): Growth of micro-organisms on surface. s. 15-45. V: Lappin-Scott HM, Costerton JW (eds.): *Microbial biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge.
- [44] STOREY, RG., FULTHORPE, RR., WILLIAMS, DD. (1999): Perspectives and predictions on the microbial ecology of the hyporheic zone. *Freshwat. Biol.* 41: 119-130
- [45] ELASRI, MO., MILLER, RV. (1999): Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65,5: 2025-2031
- [46] WHITTAKER, CJ., KLIER, CM., KOLEBRANDER, PE. (1996): Mechanism of adhesion by oral bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 50: 513-552
- [47] BOS, R., VAN DER MEI, HC., MEINDERS, JM., BUSSCHER, HJ. (1994): A quantitative method to study co-adhesion of microorganisms in a parallel plate flow chamber: basic principles of the analysis. *J. Microbiol. Methods* 20: 289-305
- [48] RICKARD, AH., GILBERT, P., HIGH, NJ., KOLEBRANDER, PE., HANDLEY, PS. (2003): Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 11,2: 94-100
- [49] SINGH, PK., SCHAEFER, AL., PARSEK, MR., MONINGER, TO., WELSH, MJ., GREENBERG, EP. (2000): Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407: 762-763
- [50] DECHO, AW., NORMAN, RS., VISSCHER, PT. (2009): Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats. *Trends Microbiol.* 18,2: 73-80
- [51] FUQUA, C., GREENBERG, EP. (1998): Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 183-189
- [52] BASSLER, BL. (1999): How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 582-587

- [53] PLATT, TG., FUQUA, C. (2010): What's in a name? The semantics of quorum sensing. *Trends Microbiol.* 18,9: 383-387
- [54] PODBIELSKI, A., KREIKEMEYER, B. (2004): Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int J. Infec. T Dis.* 8: 81-95
- [55] VAN LOOSDRECHT, MCM., HEIJNEN, JJ., EBERL, H., KREFT, J., PICIOREANU, C. (2002): Mathematical modelling of biofilm structures. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 81: 245-256
- [56] GANTZER, CJ., RITTMAN, BE., HERRICKS, EE. (1991): Effect of longterm water velocity changes on streambed biofilm activity. *Water Res.* 25: 15-20
- [57] PEYTON, BM. (1996): Effects of shear stress and substrate loading rate on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm thickness and density. *Water Res.* 30: 29-36
- [58] OHASHI, A., HARADA, H. (1994): Adhesion strenght of biofilm developed in an attached growth reaktor. *Water Sci. Technol.* 29: 281-288
- [59] OHASHI, A., TAKASHI, K., KAZUAKI, S., HARADA, H. (1999): A novel Metod for evaluation of biofilm tensile resisting erosion. *Water Sci. Technol.* 39: 261-268
- [60] BEYENAL, H., LEWANDOWSKI, Z. (2002): Internal and external mass transfer in biofilms grown at various flow velocities. *Biotechnol. Prog.* 18: 55-61
- [61] DE BEER, D., SRINIVASAN, R., STEWART, PS. (1994): Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4339-4344
- [62] CHRISTENSEN, BE., CHARAKLIS, WG. (1990): *Physical and chemical properties of biofilms.* s. 93-130. V: Charaklis WG, Marshall KC (eds.): *Biofilms.* John Wiley and Sons, New York.
- [63] HRUBANOVÁ, M. (2013): *Monitoring tvorby biofilmu u bakterií izolovaných z potravin a potravinářských provozů.* Diplomová práce. Zlín. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
- [64] MARÁKOVÁ, M. (2012): *Antimikrobní vlastnosti koloidního polyanilinu.* Bakalářská práce. Zlín. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
- [65] ADAMS, M. R., MOSS, M. O. (2008): *Food Microbiology.* 3. vydání. Royal Society of Chemistry. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFME00011/food-microbiology-3rd/food-microbiology-3rd>

[66] (2006): *Waterborne Pathogens - Manual of Water Supply Practices, M48*. 2. vydání. American Water Works Association (AWWA).

Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpWPMWSPMC/waterborne-pathogens/waterborne-pathogens>

[67] LAWLEY, R., CURTIS, L., DAVIS, J. (2012): *Food Safety Hazard Guidebook*. 2. vydání. Royal Society of Chemistry. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFSHGE005/food-safety-hazard-guidebook/food-safety-hazard-guidebook>

[68] SURAK, J. G., WILSON, S. (2007): *Certified HACCP Auditor Handbook*. American Society for Quality (ASQ). Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpCHACCPA1/certified-haccp-auditor/certified-haccp-auditor>

[69] BLACKBURN, C., DE W. MCCLURE, PETER J. (2009): *Foodborne Pathogens - Hazards, Risk Analysis and Control*. 2. vydání. Woodhead Publishing. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFPHRACE7/foodborne-pathogens-hazards/foodborne-pathogens-hazards>

[70] SABALETE, T.: *Staphylococcus aureus*.

Dostupné z: http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Staphylococcus_aureus.html

[71] *Miniatlas mikroorganismů. Staphylococcus epidermidis* [online]. [cit. 2013-03- 21]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/staphepi.htm>

[72] ANDERSON, T. (2008): *Biofilms*.

Dostupné z: http://www.awma.com.au/publications/2008_tas_tara_anderson_biofilms.pdf

[73] SADOWSKY, M., WHITMAN, J., RICHARD, L. (2011): *Fecal Bacteria*. American Society for Microbiology (ASM). Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFB000001/fecal-bacteria/fecal-bacteria>

[74] WAREING, P., FELICITY, S., RHEA, F. (2010): *Micro-Facts - The Working Companion for Food Microbiologists*. 7. Vydání. Royal Society of Chemistry. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMFTWCFM1/micro-facts-working-companion/micro-facts-working-companion>

[75] MOTARJEMI, Y. M., GERALD TODD, E. (2014): *Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpEFS00001/encyclopedia-food-safety/encyclopedia-food-safety>

[76] *Enterococcus faecalis*. Dostupné z:

<http://www.microbiologyinpictures.com/bacteria%20photos/enterococcus%20faecalis%20photos/enterococcus%20faecalis%2001.html>

[77] ROBINSON, R.K. (2000): *Encyclopedia of Food Microbiology*. vydání 1-3. Elsevier. Dostupné z:

<http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpEFMV0004/encyclopedia-food-microbiology/encyclopedia-food-microbiology>

[78] FERMANDES, R. (2009): *Microbiology Handbook - Meat Products*. 2 vydání. Royal Society of

Chemistry. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMHMPE002/microbiology-handbook-2/microbiology-handbook-2>

[79] *E. coli*. Dostupné z: <http://www.tierklinik.de/medizin/infektionskrankheiten/bakterielle-infektionen/escherichia-coli-colibacillose>

[80] WHITE, D. (2007): *Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*. 3 vydání. Oxford University

Press. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpPBPE0001/physiology-biochemistry/physiology-biochemistry>

[81] CORREA, D., RODRIGUEZ, D. (2014): *Pseudomonas aeruginosa*. *Mrs. Rojas Biology class*, č: 3.

Dostupné z: <http://sahsrojas.pbworks.com/w/page/3691540/Pseudomonas%20aeruginosa%20Project>

[82] HENDL, J.(2009): *Přehled statistických metod. Analýza a metaanalýza dat*. 3., přepracované

vydání, Portál Praha

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PVP	polyvinylpyrrolidon
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
TEOS	tetraethylorthosilikát
PS	polystyren
AA	kyselina akrylová
SNW	syntetizované stříbrné nanovlákná
QS	Quorum sensing
EPS	extracelulární polymerní látky
EPM	extracelulární polymerní matrice
NMP	N-methyl-2-pyrrolidon
CCM	Česká sbírka mikroorganismů Brno
MM1	minerální médium 1
MM2	minerální médium 2
TSB	tryptický sojový bujon s glukosou
PFR	pufrovaný fyziologický roztok
UIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí (FT UTB)
FT	Fakulta technologická
DOC	koncentrace rozpuštěného organického uhlíku
TYA	univerzální tryptický agar s kvasničným extraktem

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Struktura PVP [1].....	13
Obrázek 2 Znázornění tvorby biofilmu – nejprve dochází k adhezi buněk a tvorbě mikrokolonií, to je doprovázeno produkcí EPS. Následuje tvorba a zrání biofilmu, nakonec se buňky z biofilmu odtrhávají. [11]	17
Obrázek 3 Růst biofilmu na povrchu implantátu [34]	21
Obrázek 4 <i>Staphylococcus aureus</i> na krevním agaru [70].....	27
Obrázek 5 <i>Staphylococcus epidermidis</i> na krevním agaru [72]	28
Obrázek 6 <i>Enterococcus faecalis</i> na krevním agaru [76]	29
Obrázek 7 <i>E. coli</i> na krevním agaru [79]	30
Obrázek 8 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na universálním agaru [81]	31

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Složení biofilmové matrice [39].....	22
Tabulka 2 Vyhodnocení zkumavkového testu.....	40
Tabulka 3 Vyhodnocení zkumavkového testu.....	41
Tabulka 4 Hodnoty absorbancí v závislosti na tvorbě biofilmu (environmentální kultury)	42
Tabulka 5 Hodnoty absorbancí v závislosti na tvorbě biofilmu (environmentální kultury)	43
Tabulka 6 Hodnoty absorbancí v závislosti na tvorbě biofilmu (farmaceutické kultury)	44
Tabulka 7 Hodnoty absorbancí v závislosti na tvorbě biofilmu (farmaceutické kultury)	45
Tabulka 8 Hodnoty absorbancí v závislosti na tvorbě biofilmu (farmaceutické kultury)	46
Tabulka 9 Hodnoty absorbancí v závislosti na tvorbě biofilmu (farmaceutické kultury)	47
Tabulka 10 Hodnoty absorbancí v závislosti na tvorbě biofilmu (farmaceutické kultury).....	48
Tabulka 11 Hodnoty absorbancí v závislosti na tvorbě biofilmu (farmaceutické kultury).....	49
Tabulka 12 Výsledky DOC supernatantu po adsorpci a odstranění buněk (MS2).....	50
Tabulka 13 Výsledky DOC supernatantu po adsorpci a odstranění buněk (<i>E. coli</i> CCM 3988)....	52

