UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

PŘEHLED METODICKÝCH PŘÍSTUPŮ VEDOUCÍCH KE KVALITATIVNÍMU A KVANTITATIVNÍMU HODNOCENÍ MIKROBIÁLNÍCH BIOFILMŮ

PAVLÍNA HOLMANOVÁ

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2019

Poděkování

Velké poděkování za vedení práce, odborné rady, poskytnuté materiály, ochotu při konzultacích i pomoc s experimentální částí této práce patří RNDr. Kláře Konečné, Ph.D. Také velice děkuji své rodině za všeobecnou podporu při studiu a zázemí, které mi poskytuje.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 7. 5. 2019

Pavlína Holmanová

1. OBSAH

1. OBSAH 4

2. ABSTRAKT 6

3. ABSTRACT 7

4. ÚVOD A CÍL PRÁCE 8

5. TEORETICKÁ ČÁST 9

5.1 Charakteristika biofilmu 9

5.1.1 Formování biofilmu 10

5.2 Studium a hodnocení biofilmu 12

5.2.1 Metodické přístupy pro studium extracelulární polymerní substance 12

5.2.2 Biofilmová biomasa a její životaschopnost 16

5.2.3 Studium počátečních kroků formování biofilmu 19

5.2.4 Využití fyzikálních metod pro studium biofilmů 20

5.2.5 Využití chemických metod pro studium biofilmů 20

5.2.6 Využití mikroskopických metod pro studium biofilmů 29

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 33

6.1 Optimalizace barvení preparátů s mikrobiálními biofilmy pro fluorescenční mikroskopii 33

6.1.1 Pomůcky a materiál 33

6.1.2 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii – vizualizace bakteriálních a kvasinkových biofilmů pomocí Syto 9/propidium jodid a doplňkově kalkofluorovou bělobou 34

6.1.3 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii – vizualizace kvasinkových biofilmů pomocí konjugátu konkavalin A-fluorescein isothiokyanát/kalkofluorová běloba 37

6.1.4 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii – vizualizace mikrobiálních biofilmů pomocí konjugátu konkavalin A-fluorescein isothiokyanát a Hoechst 33342 39

7. VÝSLEDKY A DISKUSE 42

7.1 Optimalizace barvení preparátů s mikrobiálními biofilmy pro fluorescenční mikroskopii 42

7.1.1 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii – vizualizace bakteriálních a kvasinkových biofilmů pomocí Syto 9/propidium jodid a doplňkově kalkofluorovou bělobou 42

7.1.2 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii – vizualizace kvasinkových biofilmů pomocí konjugátu konkavalin A-fluorescein isothiokyanát/kalkofluorová běloba 49

7.1.3 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii – vizualizace mikrobiálních biofilmů pomocí konjugátu konkavalin A-fluorescein isothiokyanát a Hoechst 33342 52

8. ZÁVĚR 57

9. POUŽITÉ ZKRATKY 58

10. SEZNAM OBRÁZKŮ 59

11. POUŽITÁ LITERATURA 61

2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Zdravotní laborant

Autor: Pavlína Holmanová

Školitel: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Název bakalářské práce: Přehled metodických přístupů vedoucích ke kvalitativnímu a kvantitativnímu hodnocení mikrobiálních biofilmů

Cíl práce: Cílem této práce bylo zpracovat přehled metodických přístupů vedoucích ke kvalitativnímu a kvantitativnímu hodnocení mikrobiálních biofilmů. Dále pak provést optimalizaci metodiky vedoucí k přípravě preparátů s biofilm-formujícími mikroorganismy hodnocenými prostřednictvím epifluorescenční, případně konfokální laserové skenovací mikroskopie.

Metody: Optimalizace metodiky barvení mikrobiálních biofilmů pro následné hodnocení epifluorescenční mikroskopií. Formování mikrobiálních biofilmů – kultivace mikroorganismů v různých kultivačních mediích v mikrotitrační destičce, příprava roztoků s fluorescenčními barvivy. Pozorování barevných dispergovaných biofilmů fluorescenčním mikroskopem.

Výsledky: Pomocí fluorescenční mikroskopie byly ověřeny optimální cílové koncentrace fluorescenčních barviv v různých kombinacích. Pro určení viability mikrobiálních buněk formujících biofilm se osvědčila kombinace barviv Syto 9 (SYTO™ 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain) a propidium jodidu. Pro detekci biofilm-formujících kvasinek a biofilmové cukernaté matrice se osvědčila kombinace barev fluorescein-isothiokyanátu (FITC) konjugovaného ke konkavalinu A (ConA), (FITC-ConA) spolu s kalkofluorovou bělobou. Pro studium bakteriálních biofilmů pomocí mikroskopie se osvědčila kombinace barev FITC-ConA spolu s Hoechst 33342.

Závěry: V rámci teoretické části této práce byl zpracován stručný přehled metodických přístupů využívaných ke studiu mikrobiálních biofilmů. V experimentální části jsou popsány metodické úkony, které vedly k úspěšnému pořízení snímků z fluorescenční mikroskopie prokazující přítomnost mikrobiálních biofilmů.

Klíčová slova: mikrobiální biofilm, biofilm-formující mikroorganismy, kvantifikace adherujících mikrobů, kvantifikace biofilmové matrice

3. ABSTRACT

Charles Univerzity

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Study program: Medical Laboratory Technician

Author: Pavlína Holmanová

Supervisor: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Title of bachelor thesis: Overview of methodological approaches leading to qualitative and quantitative microbial biofilm evaluation

Background: The aim of this work was to compose an overview of methodical approaches leading to qualitative and quantitative evaluation of microbial biofilms. To optimize the methods leading to preparation of mounts with biofilm-forming microorganisms evaluated by epifluorescence or confocal laser scanning microscopy.

Methods: Optimization of microbial biofilm staining procedures for subsequent evaluation by epifluorescence microscopy. Formation of microbial biofilms – cultivation of microorganisms in various cultivation media in a microtiter plate, preparation of solutions with fluorescent dyes. Observation of coloured, dispersed biofilms by fluorescence microscope.

Results: Using fluorescence microscopy, optimal target concentrations of fluorescent dyes in various combinations were verified. The combination of Syto 9 (SYTO™ 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain) and propidium iodide was confirmed to be effective for the determination of viability of biofilm-forming microbial cells. The combination of fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated to concavalin A (ConA), (FITC-ConA) together with calcofluor white was confirmed to be effective for the detection of biofilm-forming yeast and biofilm polysaccharide matrix. For the study of bacterial biofilms by microscopy the combination of FITC-ConA and Hoechst 33342 was effective.

Conclusions: In the theoretical part of this work a brief overview of methodical approaches used for the study of microbial biofilms was included. The methodical approaches that led to the successful fluorescent microscopic evidence of microbial biofilms are described in the experimental part of this work.

Key words: microbial biofilm, biofilm-forming microorganisms, quantification of adherent microbes, quantification of biofilm matrix

4. ÚVOD A CÍL PRÁCE

V přírodě se mikroorganismy mohou vyskytovat buď v podobě volně plovoucích buněk, v tzv. planktonické formě, nebo v podobě heterogenních mnohobuněčných struktur zvaných biofilm. Soužití v biofilmu přináší jednotlivým mikroorganismům řadu výhod, jako je například zvýšení odolnosti vůči vlivu nepříznivých podmínek, kde jednou z nich může být vliv antimikrobních látek.

Na druhou stranu pro lidskou společnost může být tato schopnost mikroorganismů značnou nevýhodou. Ve zdravotnické klinické praxi biofilmy souvisejí s řadou infekčních onemocnění. Například v případě bakteriálních infekcí se udává, že biofilmy se pojí s infekčním onemocněním u člověka až z 80 %.

Schopnost mikroorganismů formovat biofilm je tedy aktuálním problémem. Pro studium biofilmů bylo zapotřebí vyvinout nové metody, které se pojí s jeho kultivací *in vitro* a také metodickými přístupy, umožňujícími jejich kvalitativní a kvantitativní hodnocení.

Teoretická část této práce je zaměřena především na úvod do problematiky týkající se mikrobiálních biofilmů a přehled metod využívaných k jejich kvalitativnímu i kvantitativnímu hodnocení.

Experimentální část je zaměřena na optimalizaci barvení mikrobiálních biofilmů pro fluorescenční mikroskopii za použití různých fluorescenčních barviv.

5. TEORETICKÁ ČÁST

5.1 *Charakteristika biofilmu*

V přírodě se mikroorganismy vyskytují ve dvou formách. Jednobuněčné organismy mohou být v prostředí v podobě volně plovoucí, jedná se o planktonickou formu života, nebo mohou být přisedlé k pevnému povrchu, vytvářet shluky a tím tvořit strukturu nazývanou biofilm. Mezi těmito formami mohou mikroorganismy během života volně přecházet. V planktonické formě osidlují nová prostředí, zatímco tvorba biofilmu poskytuje buňkám větší odolnost [1].

Mikroorganismy mohou kolonizovat prakticky každé prostředí. Například půdu, vodu, rozhraní mezi vzduchem a kapalinou nebo i živé tkáně, jako je třeba zubní sklovina, plíce či střední ucho. Na Obrázku č. 1 je znázorněn biofilm kolonizující zubní sklovinu – zubní plak [1].

Obrázek č. 1: Biofilm kolonizující zubní sklovinu.

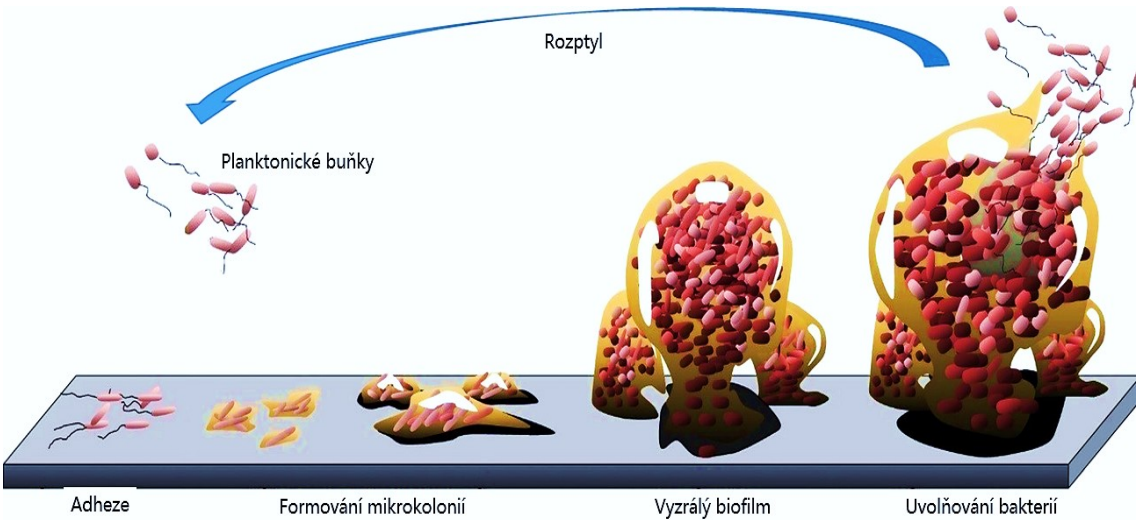
Převzato z: https://www.livescience.com/57295-biofilms.html [2].

Každé prostředí disponuje odlišnými fyzikálně-chemickými podmínkami. Mikroorganismy, jakožto nejstarší reprezentativní linie živých organismů, jsou schopny se rychle přizpůsobit těmto podmínkám. Jelikož jsou podmínky pro jejich život mnohdy nepříznivé až téměř drastické, naučily se mikroorganismy žít společně v dobře organizovaném společenství, biofilmu. Biofilm lze tedy definovat jako společenství organizovaných mikroorganismů vázané k inertnímu nebo i živému substrátu obklopené extracelulární matricí, jinými slovy také extracelulární polymerní substancí (EPS, extracelullar polymeric substance), kterou si sami syntetizují [2, 3].

EPS je tvořena glykolipidy, polysacharidy, extracelulární DNA, bílkovinami, minerály a vodou. Voda zde funguje jako adhezivní látka. Umožňuje interakci jednotlivých buněk mezi sebou i mezi buňkami a substrátem. EPS je dynamická struktura, která se neustále přizpůsobuje okolnímu prostředí. Poskytuje tak mikroorganismům výhodné životní podmínky, jako je například fyzikálně-chemická stabilita architektury biofilmu [4].

5.1.1 Formování biofilmu

Formování biofilmu je vícestupňový proces zahrnující mikrobiální adhezi, následnou produkci a akumulaci EPS. Tento proces je znázorněn na Obrázku č. 2 [5].



Obrázek č. 2: Kroky formování biofilmu.

Převzato a upraveno z: CHUNG, P. Y., *et al.*, 2014. Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* [6].

Mikrobiální biofilmy tvoří trojrozměrné struktury oddělené od sebe navzájem vodnými kanálky, umožňující vstup živin a kyslíku a odvod metabolitů. Struktura biofilmu ale není vždy stejná. Závisí na konkrétních mikrobiálních kmenech, které se podílejí na tvorbě biofilmu, i na okolních podmínkách [4].

Agregace mikroorganismů a následné dozrávání biofilmu se skládá z irreversibilních i reversibilních kroků. Prvním krokem je zavedení planktonických buněk na povrch substrátu. Je to částečně náhodný proces, roli hraje také Brownův pohyb a gravitační síly ovlivněné okolními hydrodynamickými silami. Mikrobi se setkávají s přitažlivými či odpudivými silami závisejícími na dostupnosti živin, pH, iontové síle a teplotě prostředí [3, 7].

Po kontaktu mikroorganismů s povrchem následuje adheze, která je zprostředkovaná povrchovými, extracelulárně lokalizovanými adhesiny. Tato vazba je reversibilní a dynamická. Buňky se mohou oddělit a znovu se stát součástí planktonické populace. Zda se buňky oddělí, či zda vůbec adherují k povrchu, závisí na příznivosti prostředí a vlastnostech mikroorganismů [8].

5.1.1.1 Vliv prostředí a vlastností mikroorganismů na vznik biofilmu

Vlastnosti substrátu mají významný vliv na rychlost a rozsah uchycení mikroorganismů. Hrubší hydrofobní materiály budou kolonizovány rychleji. Adhezi komplikuje pokud se substrát nachází v prostředí, kde proudí kapalina (například vodovodní potrubí či cévní řečiště) [3].

Důležitou roli hrají i vlastnosti mikroorganismů. Přítomnost mikrobiálních struktur, jako jsou bičíky, pili či fimbrie, umožní, aby buňka zůstala ukotvena k povrchu i před tím, než se vytvoří permanentní připevňující mechanismy. Neméně významnou úlohu při adherenci na různé povrchy sehrávají i hydrofobní vlastnosti mikroorganismů [3].

Poté, co buňky adherují k povrchu, se začnou dělit, tvořit jednotky zvané mikrokolonie a produkovat komponenty, které tvoří extracelulární polymerní substanci. Vytvoří se heterogenní struktura biofilmu. Biofilmy zachycují různorodé částice včetně minerálů a hostitelských složek (např.: fibrin či erytrocyty). Přijímají živiny a kyslík vodnými kanálky, kterými také odvádějí metabolity. Mikrobiální buňky se

mohou z biofilmu odpoutávat jednotlivě v podobě flotujících buněk, či ve formě buněčných agregátů, které obsahují větší množství buněk [3].

5.2 *Studium a hodnocení biofilmu*

Biofilmy pro studijní účely formované *in vitro* lze získat prostřednictvím různých přístupů a zařízení. Lze je formovat přímo v jamkách mikrotitračních destiček, případně lze využít fluidních zařízení jako jsou: „Robbins device“, „Drip flow“ biofilm reaktor či rotační biofilmový reaktor. Tyto nástroje umožňují kultivaci biofilmů za reálnějších podmínek, v prostředí tekoucí kapaliny [9].

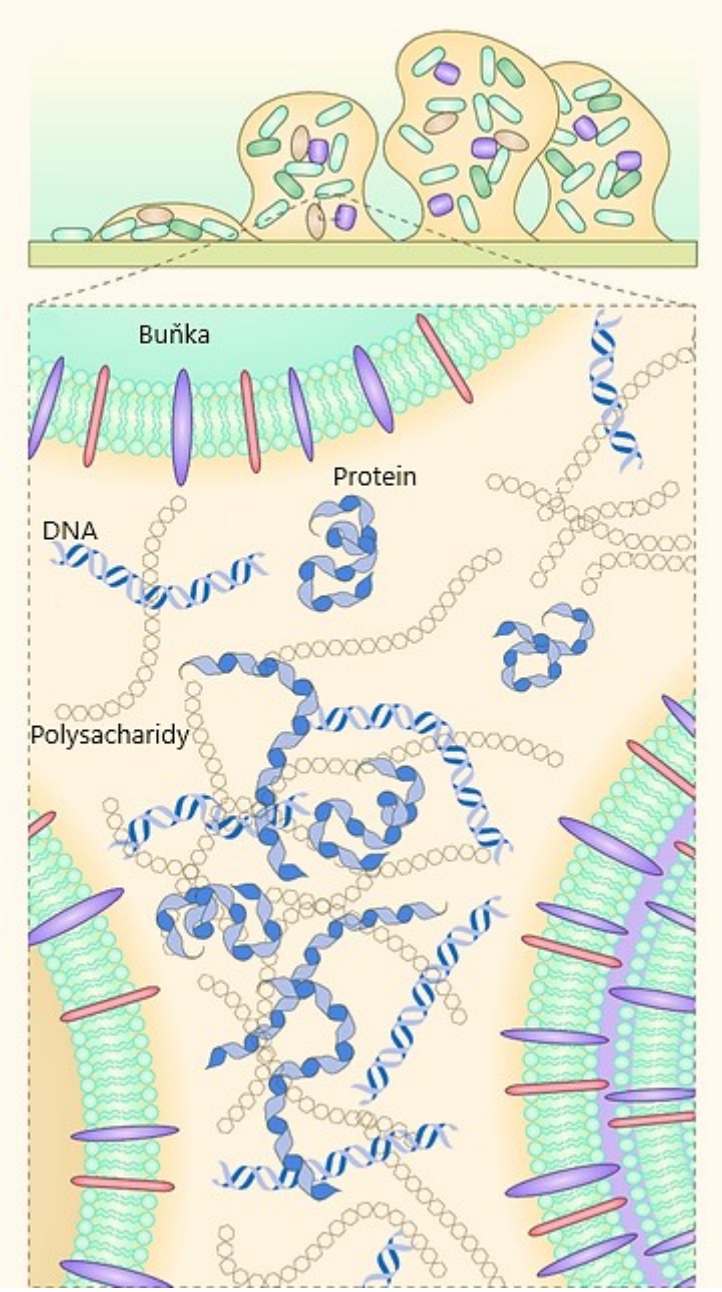
Biofilm lze studovat v různých fázích jeho vzniku. Síla adheze se měří fyzikálními metodami, jako je například mikroskopie atomárních sil či povrchová plasmonová resonance [9].

Biofilmová biomasa a její životaschopnost může být hodnocena přímými i nepřímými metodami. Nepřímými metodami lze hodnotit například buněčnou životaschopnost, buněčnou biomasu, metabolickou aktivitu a celkovou biofilmovou biomasu [9].

5.2.1 Metodické přístupy pro studium extracelulární polymerní substance

EPS se skládá především z polysacharidů, extracelulární DNA a proteinů, které vylučují buňky biofilmu. Složení a jednotlivé molekulární komponenty, které jsou součástí EPS znázorňuje Obrázek č. 3 [10, 11].

Složení EPS lze studovat metodami *in situ* nebo *ex situ*. Mezi metody *in situ* patří vizualizace biofilmů a EPS pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie a fluorescenční korelační spektroskopie. Metody *ex situ* zahrnují extrakci EPS, která může být fyzikální či chemická. Po extrakci následuje využití analytických metod k měření jednotlivých komponent EPS, jako jsou například proteiny, DNA, polysacharidy či mastné kyseliny [9].



Obrázek č. 3: Složení a jednotlivé molekulární komponenty extracelulární polymerní substance biofilmu.

Převzato a upraveno z: FLEMMING, H. C., *et al.*, 2010. The biofilm matrix [5].

5.2.1.1 Analýza extracelulární polymerní substance pomocí extrakčních metod

Při analýze EPS *ex situ* je nezbytné použít některou z extrakčních metod. Extrakce EPS jsou založeny na fyzikálních i chemických metodách. Mezi fyzikální metody patří například ultrazvuk, centrifugace či zvýšení teploty. Jako chemické reagencie se používají například ethanol, formaldehyd, formamid, NaOH či ethylendiaminotertaoctová kyselina [12, 13, 14, 15].

Druh použité metody závisí na složení biofilmu a složitosti EPS. Je ovšem obecně platné, že použití chemických látek zvyšuje výnosy EPS ve srovnání s extrakcí, kde se použijí pouze fyzikální metody [15].

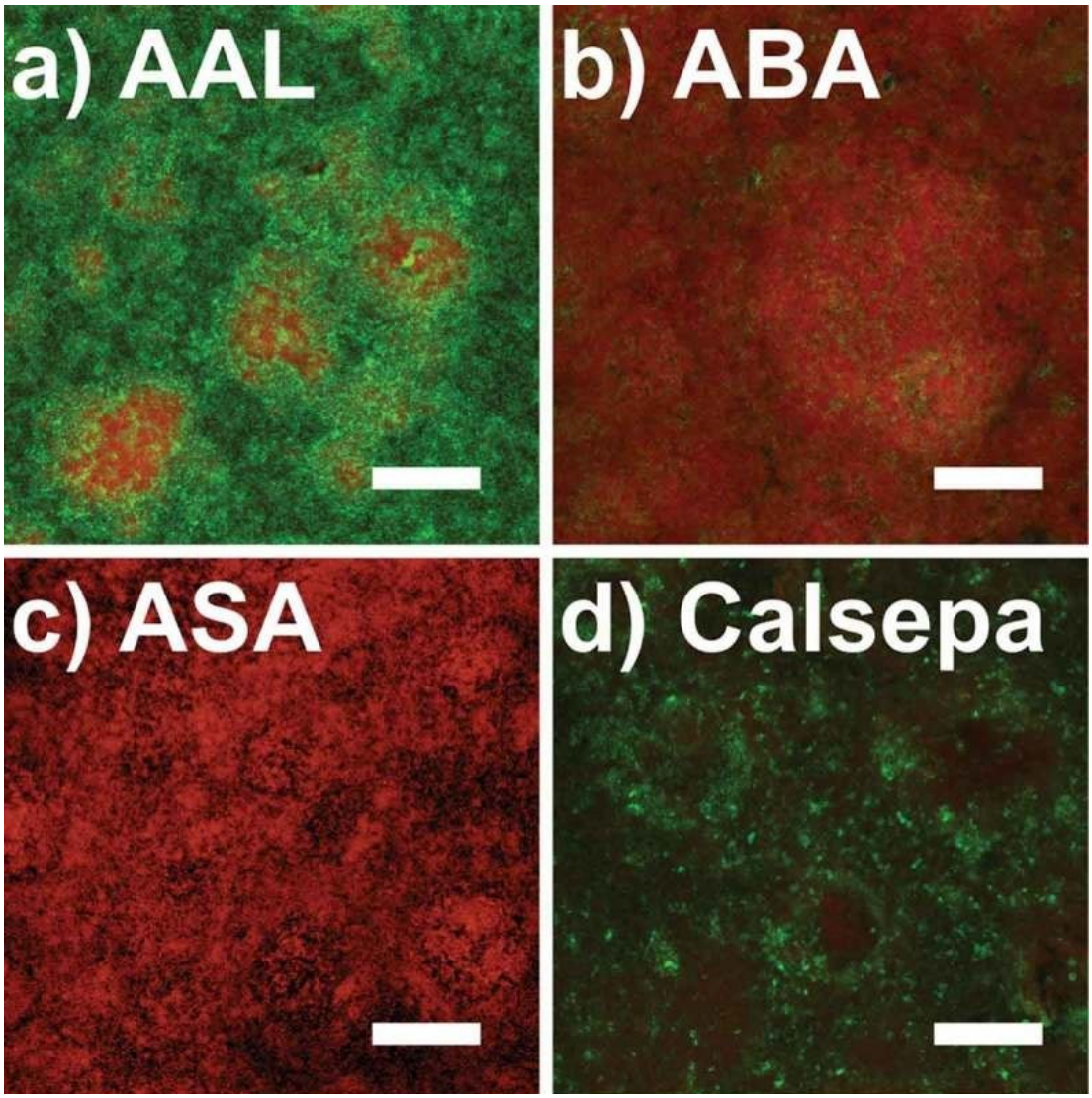
Extrakci je obvykle nutné v závislosti na jednotlivých biofilmech optimalizovat. Optimalizace zahrnuje testování kombinace chemických a fyzikálních metod tak, aby se dosáhlo co nejvyššího výtěžku EPS [14].

5.2.1.2 Přímá vizualizace extracelulární polymerní substance

Při studiu EPS *in situ* se využívá mimo jiné přímé vizualizace biofilmu prostřednictvím mikroskopických technik. EPS se spolu s dalšími faktory podílí na prostorovém uspořádání biofilmu. Vizualizace 3D mikroskopií, jako je například konfokální laserová skenovací mikroskopie (CLSM, confocal laser scanning microscopy) nebo skenovací elektronová mikroskopie, tak umožní získat informace o celkové architektuře biofilmu [16].

Cukerné složky EPS lze identifikovat pomocí analýzy fluorescenční lektinové vazby (FLBA, fluorescence lectin-binding analysis). Lektiny jsou proteiny schopné velmi specifické vazby k polysacharidům. Jelikož jsou polysacharidy jednou z hlavních součástí EPS, využívá se toho při její analýze. Lektiny lze izolovat ze široké škály přírodních zdrojů, jako jsou například rostliny či nižší živočichové. Na lektin je uměle navázaná fluorescenční barva a tento komplex se poté specificky váže na cukernou složku EPS. Takto fluorescenčně značené lektiny jsou využity k vizualizaci i kvantifikaci specifických glykokonjugátů v biofilmu. FLBA lze použít pro hodnocení architektury biofilmové matrice v environmentálních, průmyslových i lékařských biofilmech. Příkladem nejpoužívanějších lektinů pro konjugaci s fluorescenčními próbami mohou být lektiny izolované z vřeckovýtrusných hub, *Aleuria aurantia*, *Agaricus bissporus*,

Allium sativum či *Calystega sepiem*. Snímky z CLSM za použití těchto lektinů a jejich vazby k biofilmům tvořených na lidské dásni jsou uvedeny na Obrázku č. 4 [16, 17, 18, 19].



Obrázek č. 4: Snímky z konfokální laserové skenovací mikroskopie mikrobiálních biofilmů tvořených na lidské dásni, značené různými lektiny.

A) Biofilm značený konjugátem *Aleuria aurantia*-FITC. B) Biofilm značený *Agaricus bissporus*-FITC. C) Biofilm značený *Allium sativum*-FITC. D) Biofilm značený *Calystega sepiem*-FITC. FITC – fluorescein isothiokyanát, emise zelené barvy. Bakteriální buňky jsou značeny |SYTO®60 – červená emise. Stupnice měřítka = 25 µm.

Převzato z: TAWAKOLI, P. N., *et al*., 2017. Visualizing the dental biofilm matrix by means of fluorescence lectin-binding analysis [19].

Vlastnosti cukernaté matrice biofilmu, jako je viskozita a pórovitost se hodnotí pomocí fluorescenčně značené sondy detekované fluorescenční korelační spektroskopií (FCS, fluorescence correlation spectroscopy). Aby se mohly získat 3D obrazy EPS musí být analýzy FLBA a FCS spojeny s analýzami CLSM a specifickými buněčnými fluorescenčními sondami. Další složky matrice mohou být zobrazeny pomocí CLSM za použití specifického značení, jako je například fluorescein isothiokyanát (FITC) [20, 21].

5.2.2 Biofilmová biomasa a její životaschopnost

Průkaz buněčné životaschopnosti lze hodnotit různými mikrobiologickými či molekulárními metodami [22, 23].

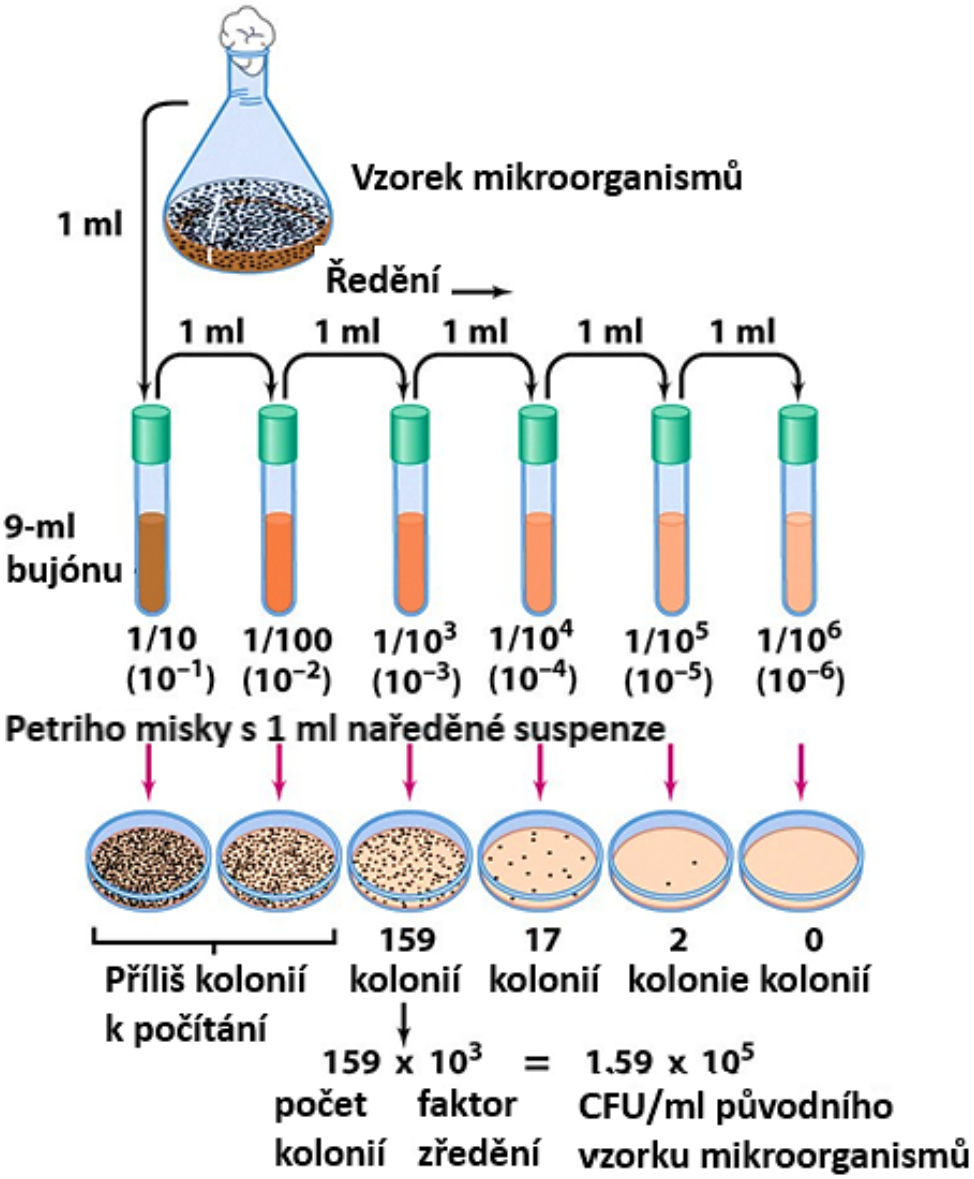
Životaschopnost buněk biofilmu lze stanovit pomocí výsevové metody, stanovením kvantity jednotek tvořících kolonie (CFU, colony forming units) nebo například průtokovou cytometrií za použití vhodných fluoroforů [22, 23].

Buněčnou životaschopnost lze hodnotit na základě změny integrity buněčných membrán. Živé buňky mají integritu membrán zachovalou, na rozdíl od poškozených a mrtvých, které ji mají porušenou. Existují ale i výjimky, kdy integritu membrány mohou udržovat i mrtvé buňky. Na druhou stranu, pokud se buňky nacházejí v prostředí bohatém na živiny, dochází k rychlému exponenciálnímu růstu, při čemž může dojít k porušení integrity membrán i u plně životaschopných buněk. To znamená, že vnější prostředí má vliv na životaschopnost a barvení buněk. Tyto vlivy ale mohou vést k nesprávným závěrům [24].

5.2.2.1 Určení počtu životaschopných buněk dle stanovení počtu jednotek tvořících kolonie

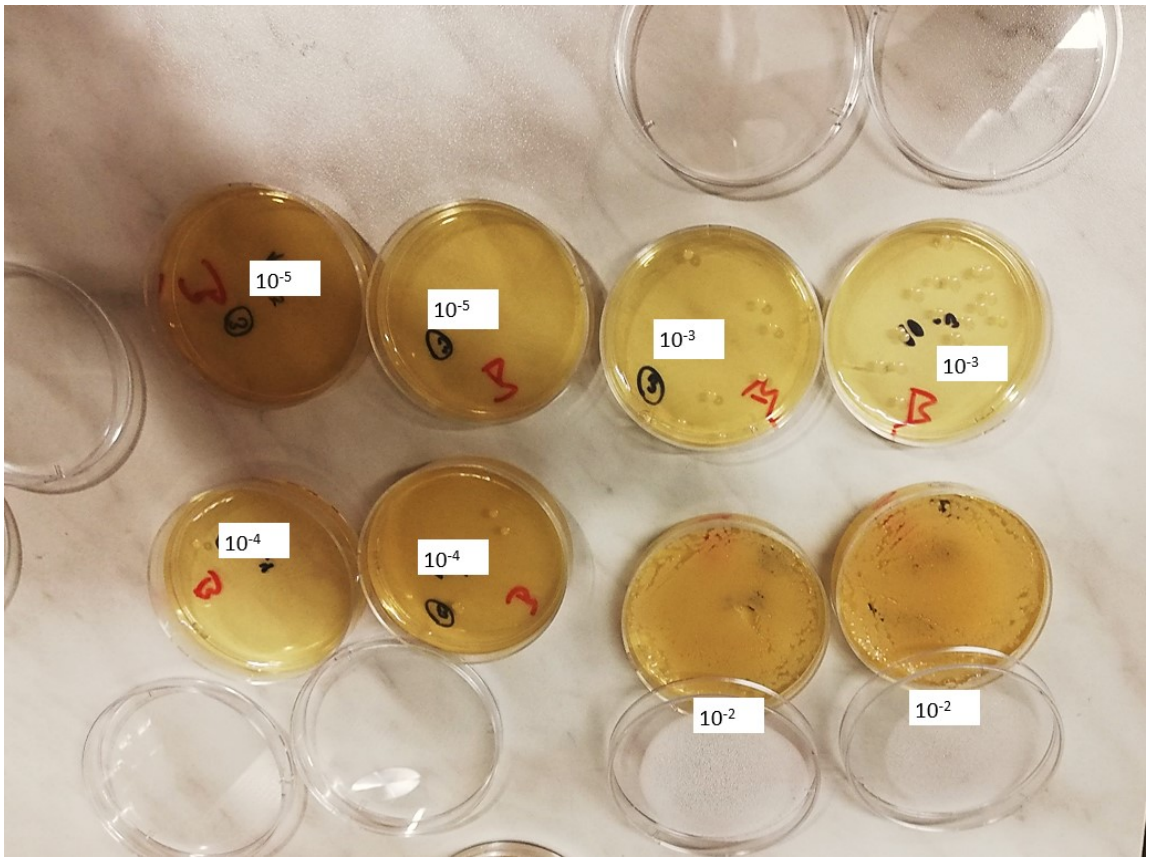
Stanovení počtu životaschopných buněk, kolonie tvořících jednotek (KTJ) nebo také z anglického jazyka převzaté zkratky CFU, spočívá v přímé kvantifikaci bakterií výsevovou metodou. Vzorky obsahující mikroorganismy o různém ředění se vysévají na vhodná kultivační média a po inkubaci se odečítají jednotky CFU [25].

Schématické znázornění kroků vedoucích ke stanovení počtu CFU v 1 ml vzorku znázorňuje Obrázek č. 5. Na Obrázku č. 6 je zobrazen výsledek určení počtu bakterií *Staphylococcus aureus*, kmen MRSA pomocí výsevové metody (25).



Obrázek č. 5: Schéma kroků vedoucích ke stanovení počtu kolonie tvořících jednotek.

Převzato a upraveno z: NEU, T. R., *et al.,* 2014. Investigation of Microbial Biofilm Structure by Laser Scanning Microscopy [25].



Obrázek č. 6: Stanovení počtu kolonie tvořících jednotek výsevovou metodou.

Staphylococcus aureus, kmen MRSA, Soyabean agar.

Snímek laskavě poskytla RNDr. K. Konečná, Ph.D.

5.2.3 Studium počátečních kroků formování biofilmu

5.2.3.1 Metody vedoucí k hodnocení mikrobiální adheze

Mikrobiální adheze se *in vitro* hodnotí pomocí několika systémů. V těchto systémech lze nastavit kontrolovatelné a reprodukovatelné podmínky podobné podmínkám přírodním. Nejrozšířenější postupy zahrnují užití mikrotitračních destiček [26].

K hodnocení mikrobiální adheze se také využívá průtokových komor. V porovnání s mikrotitrační destičkou mají nižší kapacitu, ale není zde potřeba provádět promývací kroky k odstranění neadherovaných buněk. Nejrozšířenější průtokovou komorou je paralelní průtoková komora. V tomto zařízení lze adhezi mikrobů studovat v kontrolovaných hydrodynamických podmínkách, což umožní hodnocení v reálném čase i prostředí [26, 27].

Vizualizaci adherovaných buněk k povrchu lze provést pomocí mikroskopických metod. Pokud je povrch průhledný, lze využít světelnou mikroskopii, ale také i konfokální mikroskopii s fluorescenčně značenými próbami. Pokud je povrch s adherovanými mikroorganismy neprůhledný, využívá se epifluorescenční mikroskopie, která funguje na základě barvení speciálními fluorochromy [28, 29].

Jsou známé i systémy pro kvantifikaci počáteční adheze *in situ* za různého průtoku. J. Szlavik, *et al.* (2012) popsala systém založený na mikroskopovacích sklíčkách s průtokovou perfúzní komorou [29].

Tento systém umožňuje pozorování a kvantifikaci adherovaných buněk v reálném čase prostřednictvím inverzního mikroskopu. Výhodou tohoto systému je možnost sledovat a kvantifikovat adhezi buněk v reálném čase. Nevýhodou tohoto systému je citlivost k objemným molekulám (např. tukové micely) a neschopnost pozorovat buňky adherované na neprůhledném povrchu [28, 29].

5.2.3.2 Měření adheze na molekulární úrovni

Adhezivní vlastnosti na úrovni jedné buňky lze měřit mikroskopií atomárních sil. Tato metoda umožňuje analýzu molekulárních funkcí buněčného povrchu. Detekce probíhá na základě meziatomové přitažlivosti pomocí zkoumacího hrotu, který se pohybuje nad vzorkem. Lze tak mapovat a kvantifikovat interakční síly jednotlivých molekul. Této metody lze využít například při studiu mikrobiálních adhezinů a jejich příspěvku v rámci kroku adherence [9, 10].

5.2.4 Využití fyzikálních metod pro studium biofilmů

Celková biofilmová biomasa může být stanovena měřením hmotnosti suchého či vlhkého biofilmu, což je například uvedeno v autorské práci M. G. Trulear, *et al.* (1982). Biofilmovou biomasu lze spočítat jako rozdíl hmotnosti mezi sklíčkem s vysušeným biofilmem a čistým suchým sklíčkem bez vytvořeného biofilmu. Použití zobrazovacích technik, jako je například rentgenová počítačová tomografie či nukleární magnetická rezonance, umožní získat informace o velikosti, tvaru nebo tloušťce biofilmu [9, 30].

5.2.5 Využití chemických metod pro studium biofilmů

Chemické metody využívají barviva či fluorochromy schopné vazby na složky biofilmu. Jedná se o nepřímé metody a mohou být použity jak ke kvalitativnímu tak i ke kvantitativnímu hodnocení celkové biofilmové biomasy, nebo pouze ke kvalitativnímu či kvantitativnímu hodnocení specifických složek biofilmu, jako je například EPS [11, 31].

5.2.5.1 Krystalová violeť

Barvení pomocí krystalové violeti (CV, crystal violet) poprvé popsal D. G. Christensen, *et al*. (1985). Tento metodický přístup byl od té doby již několikrát modifikován, což umožnilo zvýšení přesnosti. Jedná se o nejčastěji používanou metodu pro kvantifikaci biofilmu v mikrotitračních destičkách. Obarví se živé i mrtvé buňky i některé součásti biofilmové matrice. Jelikož je CV schopna obarvit prakticky celý biofilm, používá se pro kvantifikaci celkové biofilmové biomasy [11, 31, 32].

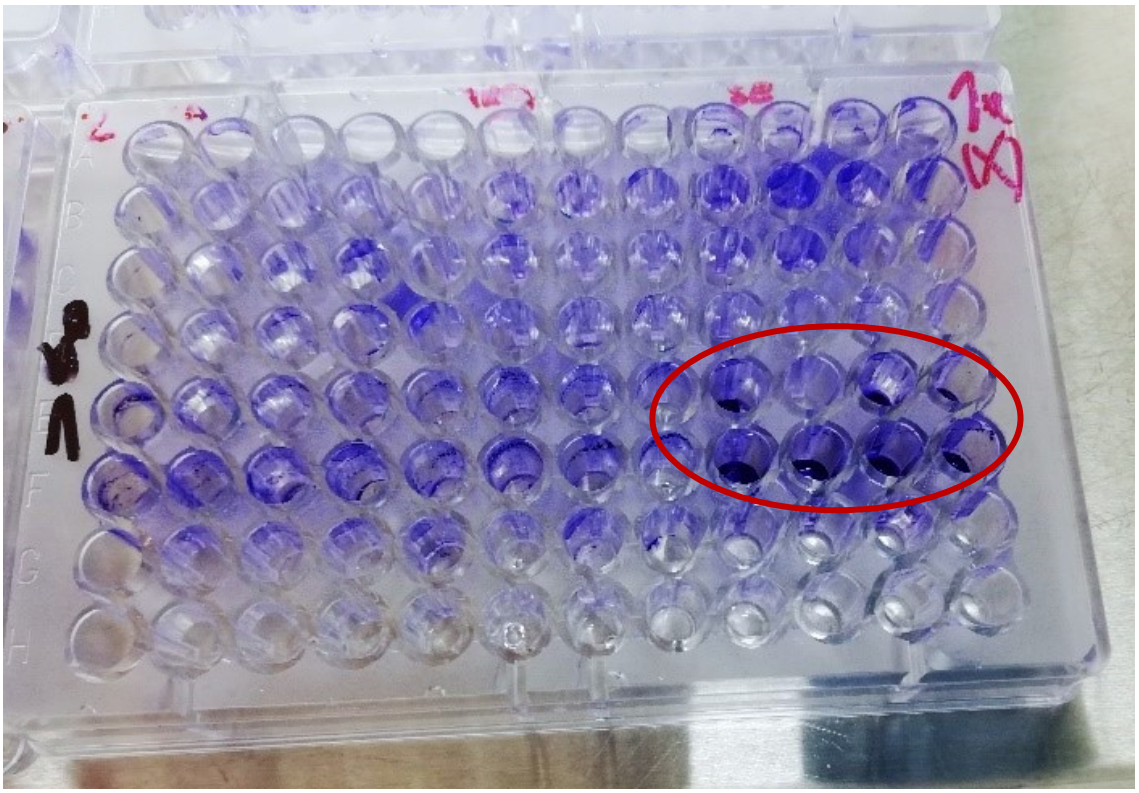
Nevýhodou krystalové violeti je vysoká karcinogenita a klasifikace jako toxický odpad. Jako vhodná náhrada se jeví safranin, neboť je netoxický a má podobné barvící vlastnosti jako CV. Pro kvantifikaci biofilmové biomasy je ale méně rozšířen. Barvení safraninem je méně citlivé k detekci malých množství biofilmu. Nicméně nebylo zjištěno, že by metodický přístup využívající safranin byl méně přesný než přístup, ve kterém se volí CV [33].

5.2.5.1.1 Metoda kvantifikace biofilmu formovaného v jamkách mikrotitrační destičky

Krystalové violeti se využívá také v rámci metody formování a následné kvantifikace formovaného biofilmu v mikrotitračních destičkách. V anglickém jazyce se pro tuto metodu využívá označení „tissue culture plate metod“, kterou prvně popsal D. G. Christensen, *et al*. (1985) [31].

Mikrobiální kmeny, jejichž biofilmový fenotyp se má určit, se očkují do média obsaženého v jamkách mikrotitrační destičky a inkubace se provádí do stacionární fáze při teplotě 37°C. Po inkubaci se odstraní tekutý obsah jamek a jamky se promyjí sterilním fyziologickým roztokem, aby se odstranily volně plovoucí bakterie [34, 35].

Biofilm, skládající se ze sesilních bakterií, se poté fixuje octanem sodným a obarví krystalovou violetí. Přebytečná nenavázaná barva se odstraní promytím deionizovanou vodou a mikrotitrační destičky se nechají uschnout na vzduchu. Optická denzita jamek se může odečíst přímo spektrofotometricky, nebo se nejdříve provede extrakce navázané barvy a optická denzita je měřena následně. Míra absorbance určuje kvantitu biofilmu. Na Obrázku č. 7 je znázorněna mikrotitrační destička s CV, ve které lze na základě rozdílu optické denzity eluované CV kategorizovat slabé, středně silné a silné mikrobiální producenty biofilmu, případně odlišit kmeny, které biofilm netvoří [34, 35].



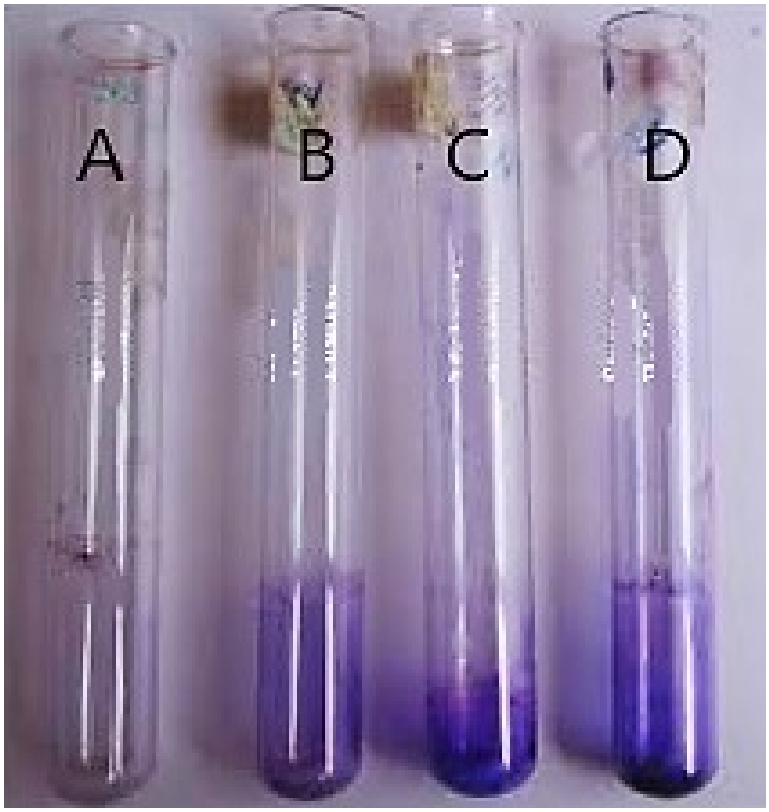
Obrázek č. 7: Metoda kvantifikace biofilmu formovaného v jamkách mikrotitrační destičky pomocí barvení krystalovou violetí.

Zobrazení kroku promytí a vysušení destičky před vlastní extrakcí krystalové violeti. Již na základě intenzity navázané krystalové violeti lze pouhým okem předběžně vyhodnotit, které kmeny budou zřejmě kategorizovány do skupiny silných biofilmových producentů, viz. červenou elipsou vyznačené jamky.

Snímek laskavě poskytla RNDr. K. Konečná, Ph.D.

5.2.5.1.2 Metoda kvantifikace formovaného biofilmu ve zkumavkách

Další metodou, ve které se využívá krystalové violeti pro kvantifikaci formovaného biofilmu, je tzv. zkumavková metoda, v originále označovaná jako „tube method“. Mikroorganismy se naočkují do zkumavek obsahujících bujón a inkubují se 24 hodin při 37°C. Poté se provede dekantace, zkumavky se promyjí fyziologickým roztokem s fosfátovým pufrem a vysuší se v obrácené pozici. Po vysušení se zkumavky barví krystalovou violetí. Přebytečná barva se odstraní a zkumavky se promyjí deionizovanou vodou a nechají se vyschnout. Tvorba biofilmu je považována za pozitivní, pokud se barva zachytí na dno a vnitřní stěnu zkumavky. Jako negativní (nedošlo k tvorbě biofilmu) se zkumavka hodnotí v případě, že se vytvoří pouze prstenec na rozhraní voda-vzduch, tzv. „liquid-air interface“. Výsledek tohoto testu zobrazuje Obrázek č. 8 [34, 35].



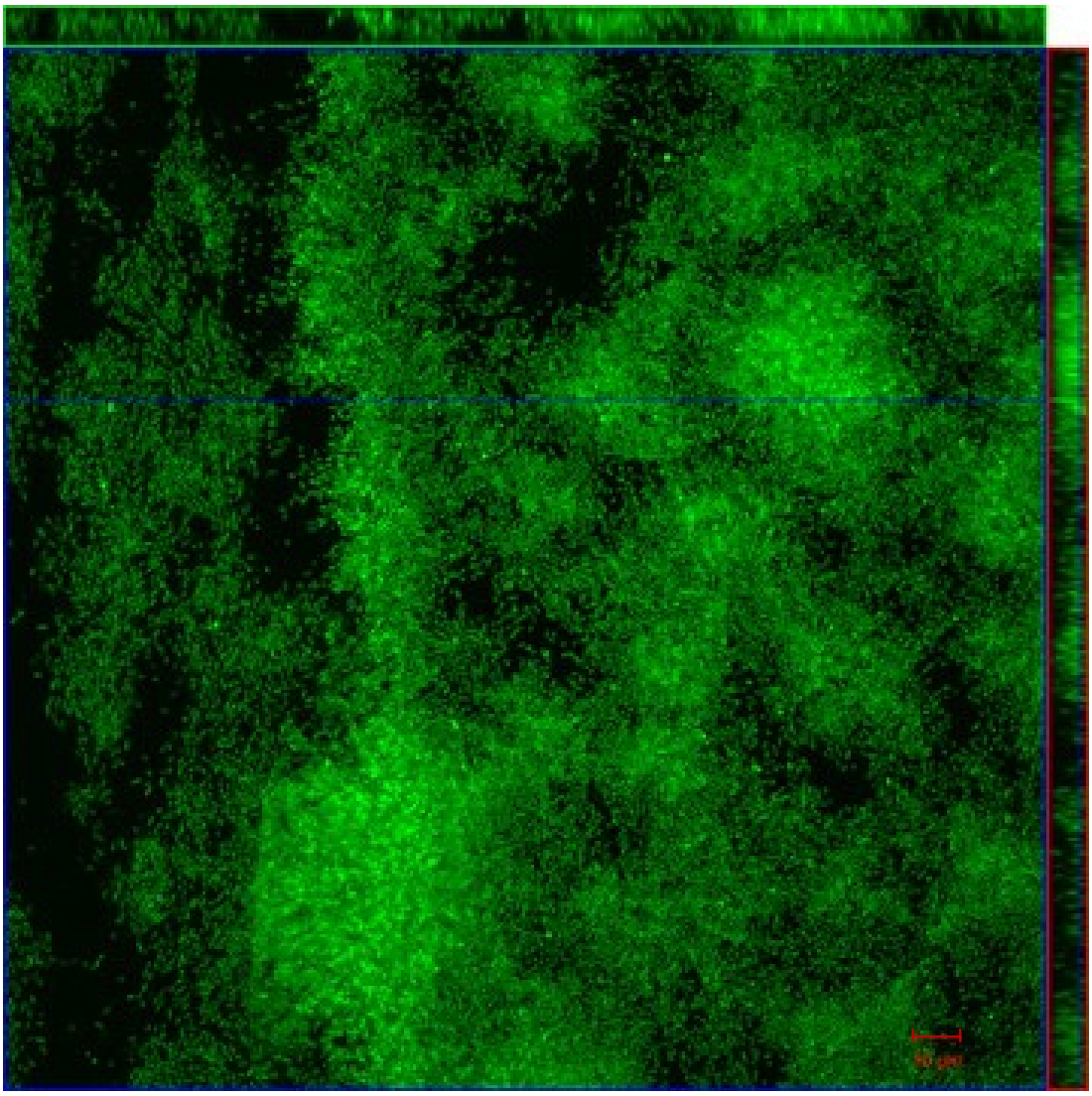
Obrázek č. 8: Metoda kvantifikace biofilmu ve zkumavkách.

A) Negativní výsledek – nedošlo k tvorbě biofilmu. B) Slabá tvorba biofilmu (pozitivita). C) Střední tvorba biofilmu. D) Silná tvorba biofilmu.

Převzato a upraveno z: TRIVEDA, L., *et al.,* 2016. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Enterococci: An evaluation of three different screening methods [36].

5.2.5.2 Detekce biofilmu pomocí barviva Syto 9

Syto 9 je fluorogenní barvivo, které pasivně difunduje přes buněčné membrány a váže se na DNA živých i mrtvých buněk. Jelikož je DNA součástí i EPS, barvení pomocí Syto 9 poskytuje informace o celkové biomase biofilmu. Detekce se provádí pomocí fluorescenční mikroskopií či CLSM. Obrázek č. 9 znázorňuje bakterii *Vibrio cholerae* obarvené Syto 9 - snímek z CLSM [24].



Obrázek č. 9: Snímek z konfokálního laserového skenovacího mikroskopu, biofilm bakterie Vibrio cholerae, barvený pomocí Syto 9.

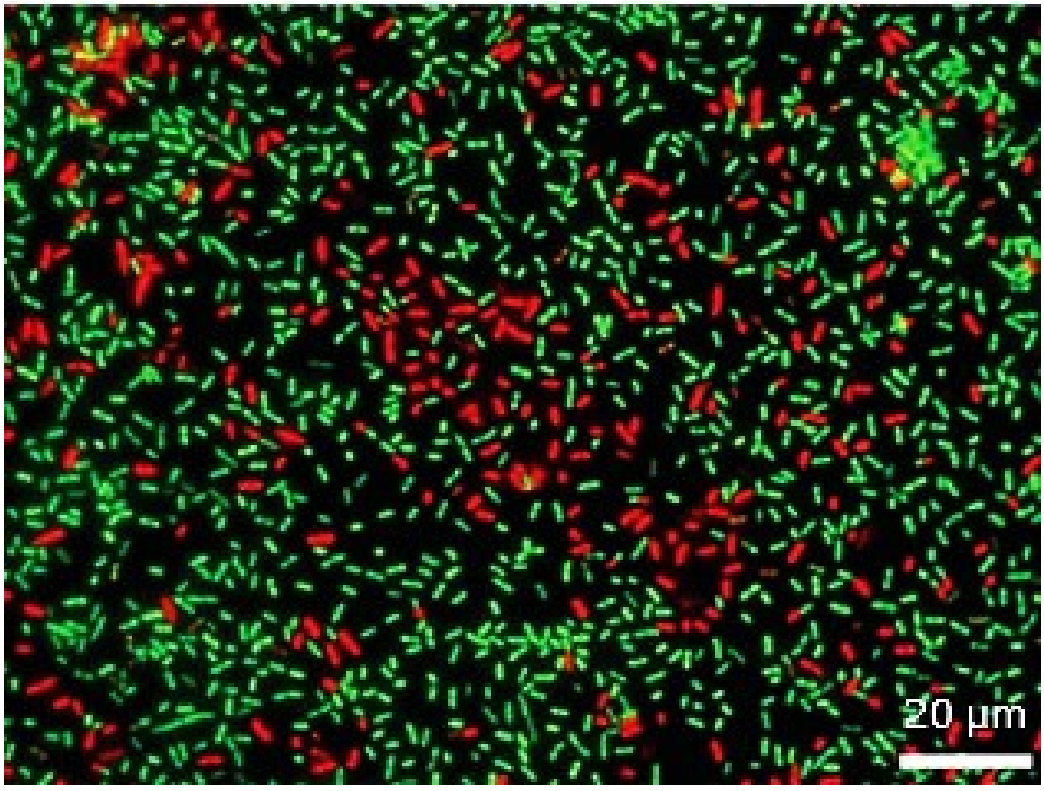
Stupnice měřítka = 10 µm

Převzato z: http://www.appstate.edu/~karatane/vibrio_biofilms.html [37].

5.2.5.2.1 Detekce biofilmu pomocí kombinace barviv Syto 9 a propidium jodidu

Barvivo Syto 9 lze použít i v kombinaci s jinými barvivy, například v kombinaci s propidium jodidem (PI, propidium iodide), ke studiu životaschopnosti bakterií [24, 38].

Červená fluorescenční barva PI pronikne pouze do buněk s poškozenými membránami, což znamená, že se váže pouze na DNA mrtvých buněk, nikoliv na DNA buněk životaschopných. Oproti tomu barvivo Syto 9 se váže na DNA živých i mrtvých buněk. Do mrtvé buňky tedy mohou vstoupit obě tato barviva. PI ale vykazuje silnější afinitu k nukleovým kyselinám než Syto 9, proto je v mrtvých buňkách, které byly nejdříve obarveny Syto 9, toto barvivo následně nahrazeno PI. Vzorky lze poté vyhodnotit pomocí epifluorescenční mikroskopie, CLSM či průtokové cytometrie. Na Obrázku č. 10 je snímek pořízený pomocí fluorescenčního mikroskopu, na kterém je znázorněna bakterie *Klebsiella pneumoniae* obarvená pomocí Syto 9/PI [24, 38].



Obrázek č. 10: Snímek pořízený pomocí fluorescenčního mikroskopu, bakterie Klebsiella pneumoniae barvená pomocí Syto 9/PI.

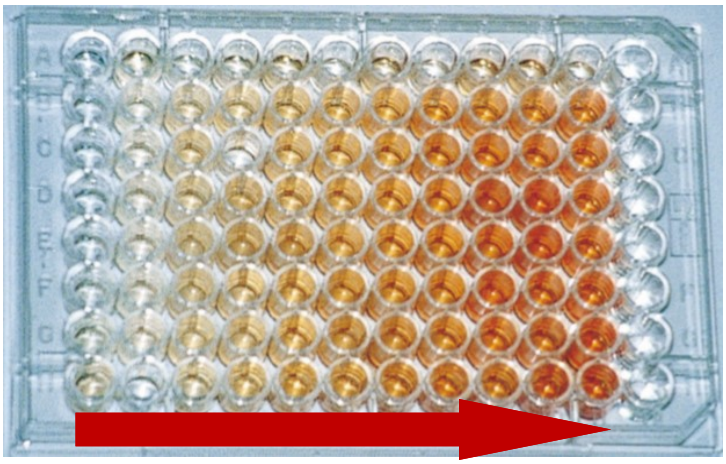
Zelené buňky – živé, červené buňky – mrtvé.

Převzato z: JENKINS, J., *et al., 2018.* Characterisation of bactericidal titanium surfaces using electron microscopy [39].

5.2.5.3 Studium metabolické aktivity biofilm-formujících mikroorganismů s využitím tetrazoliových solí

Testy využívající tetrazoliové soli, konkrétně 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-5-[(fenylamino) karbonyl]-2H-tetrazoliumhydroxid (XTT) či 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT), jsou založeny na redukci barviva metabolicky aktivními buňkami. V případě XTT je výsledný produkt ve vodě rozpustný a oranžový, což znázorňuje Obrázek č. 11. Při použití MTT je výsledný ve vodě nerozpustný produkt modrý až fialový, Obrázek č. 12 [32].

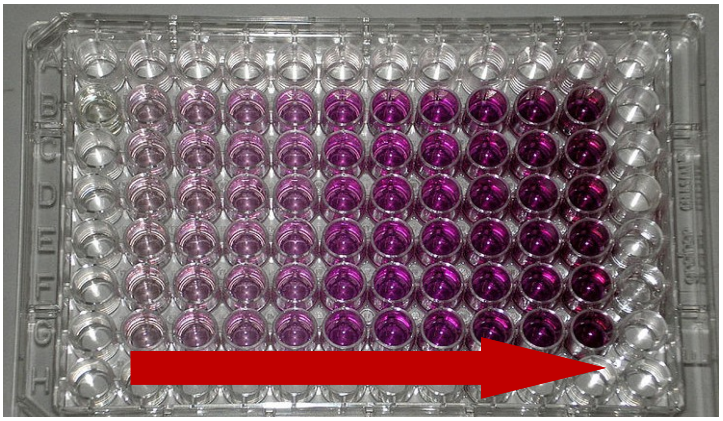
Tyto testy se používají pro kvantifikaci životaschopných buněk v planktonických kulturách a pro kvantifikaci životaschopných mikrobiálních buněk tvořících biofilm. Spektrofotometricky se detekuje optická denzita barevné změny [32].



Obrázek č. 11: Provedení XTT testu.

Ve směru šipky stoupá míra počtu životaschopných buněk.

Převzato z: https://www.nacalai.co.jp/global/download/pdf/Cell_Count_Reagent.pdf [40].



Obrázek č. 12: Provedení MTT testu.

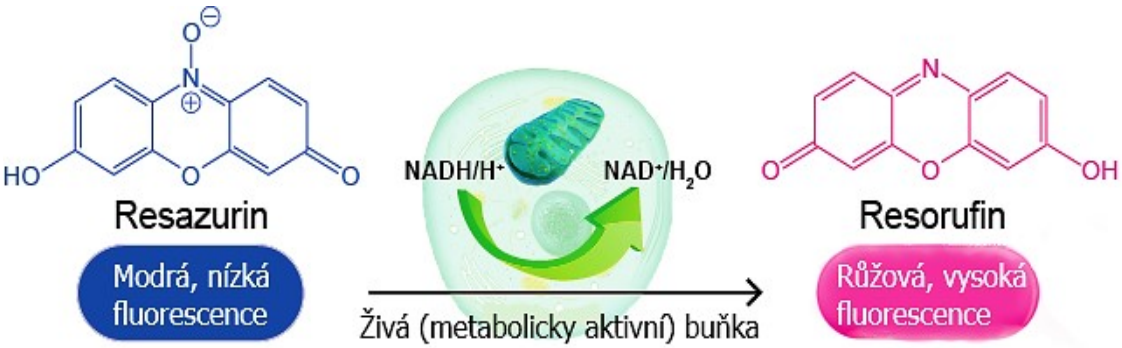
Ve směru šipky stoupá míra počtu životaschopných buněk.

Převzato z: SHOKRZADEH, M., *et al*., 2017. An overview of the most common methods for assessing cell viability [41].

5.2.5.4 Studium metabolické aktivity biofilm-formujících mikroorganismů s využitím resazurinu

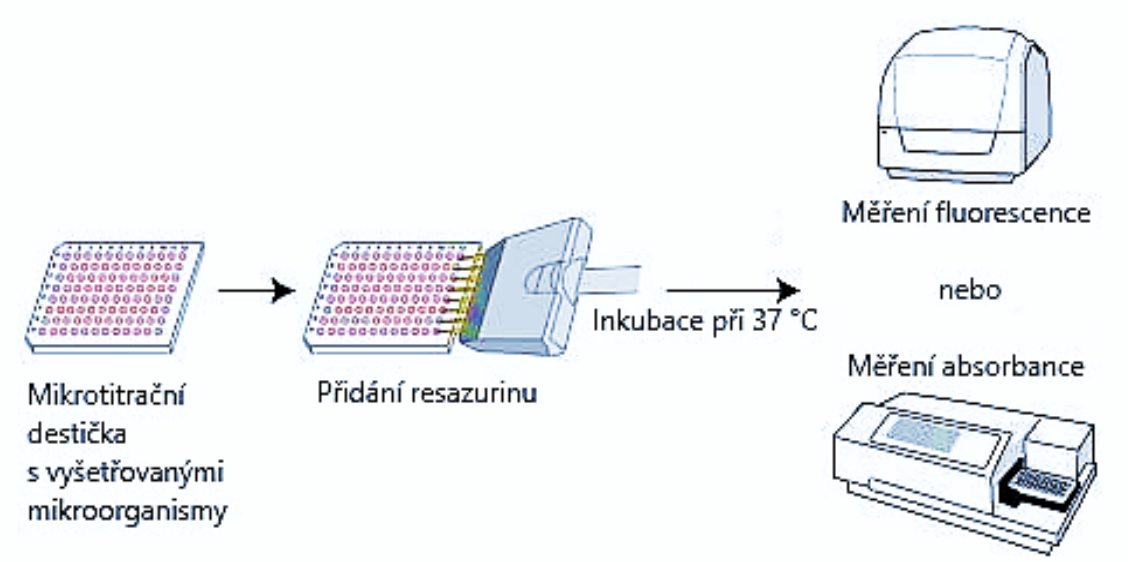
Metabolickou aktivitu mikrobů lze taktéž určit pomocí resazurinu, prostřednictvím tzv. resazurinového testu. Resazurin, rovněž komerčně vedený pod názvem Alamar Blue, je netoxickým fluorescenčním indikátorem, k jehož barevné proměně dochází v důsledku metabolické aktivity mikrobů. Resazurin je modrá sloučenina, která se po redukci mění na růžový fluorescenční rezorufin, jak je znázorněno na Obrázku č. 13. Tento produkt lze detekovat spektrofotometricky nebo spektrofluorimetricky. Resazurin se běžně používá především v testování životaschopnosti savčích buněk, dále také k testování životaschopnosti bakterií, jako jsou *Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus epidermidis* a *Streptococcus mutans*. Schématické znázornění kroků resazurinového testu znázorňuje Obrázek č. 14 [32].

Výhodou této metody je, že resazurin není toxický pro eukaryotické ani prokaryotické buňky a metoda je také méně časově náročná [32].



Obrázek č. 13: Metabolická přeměna resazurinu na resofurin.

Převzato a upraveno z: https://www.creative-bioarray.com/support/resazurin-cell-viability-assay.htm [42].



Obrázek č. 14: Schématické znázornění kroků vedoucích k hodnocení resazurinového testu.

Převzato a upraveno z: https://www.genecopoeia.com/product/cell-quant-alamarblue-cell-viability-reagent/ [43].

5.2.5.5 *Studium metabolické aktivity biofilm-formujících mikroorganismů s využitím fluorescein diacetátu*

Další možnost, jak určit životaschopnost mikrobů tvořících biofilm, poskytuje využití testu s fluorescein diacetátem (FDA), kde umí životaschopné buňky pomocí nespecifických esteráz změnit nebarevný, nefluorescenční FDA na fluorescenční žlutý fluorescein. FDA se běžně používá například k měření celkové mikrobiální aktivity v půdě [32].

5.2.5.6 *Kvantifikace biofilmové matrice s využitím dimethyl-methylenové modři*

Barvivo 1,9-dimethyl-methylenová modř (DMMB, dimethyl methylene blue) se používá ke kvantifikaci biofilmové matrice. DMMB tvoří se sulfátovými polysacharidy obsažených v EPS nerozpustný komplex. Po zbavení se nenavázané barvy se přidáním dekomplexního roztoku uvolní barvivo DMMB a provede se spektrofotometrické měření optické denzity. Ta je přímo úměrná množství sulfátových polysacharidů v biofilmové matrici [32].

5.2.6 Využití mikroskopických metod pro studium biofilmů

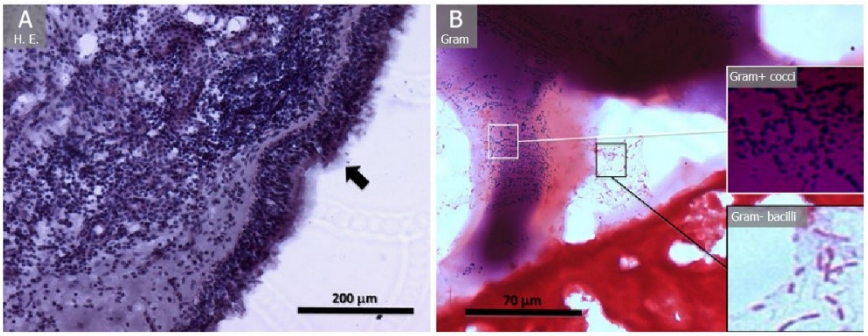
Jak již bylo zmíněno výše, nedílnou součástí hodnocení biofilmové biomasy jsou mimo jiné i mikroskopické metody. Jedná se o zobrazovací metody, které lze použít v různých modifikacích a kombinacích i s jinými metodami. Kombinovaný přístup různých technik umožňuje realističtější zobrazení biofilmu. Některé zobrazovací metody, jako je například epifluorescence či CLSM, umožňují vizualizaci, ale prostřednictvím speciálního softwaru také kvantifikaci bakteriálních biofilmů [9].

5.2.6.1 Světelná mikroskopie

Světelná mikroskopie je základní mikroskopickou technikou. K lepšímu rozlišení mikrobiálních buněk se využívá barvení, jako je například kombinace hematoxylin a eosin či barvení dle Grama, jak je znázorněno na Obrázku č. 15. Jedná se o praktické, levné a spolehlivé metody detekce bakteriálních biofilmů [44, 45, 46, 47].

Tyto barvící techniky lze použít také ke kvantitativnímu hodnocení biomasy. C. De Carvalho, *et al.* (2007) ve své studii zjistil, že míra absorbovaného světla biofilmem koreluje s jeho hmotností [48].

Výhodou využití světelné mikroskopie je relativně jednoduchá příprava mikroskopických preparátů a nízké cenové náklady. Omezením této metody ovšem je poměrně malé zvětšení a rozlišení jednotlivých buněk, což na druhou stranu umožňuje zobrazení větší části vzorku. Tento přístup vedoucí k vizualizaci biofilmů se využívá často v kombinaci s elektronovou mikroskopií, která bude zmíněna dále [43].



Obrázek č. 15: Snímky ze světelné mikroskopie, histopatologie nosního polypu.

A) Barvení hematoxylin a eosin, černá šipka ukazuje na neúplnou vrstvu biofilmu.

B) Gramovo barvení, kombinovaný bakteriální biofilm sestávající z jednotlivých kolonií Gram pozitivních koků a Gram negativních bacilů.

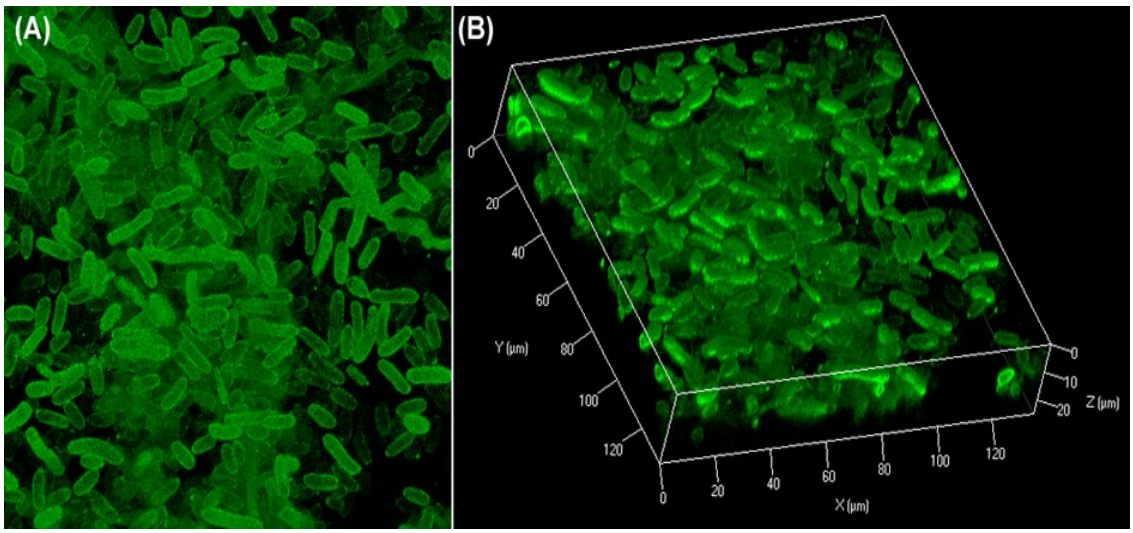
Převzato z: TÓTH, L., *et al.*, 2011. Biofilm detection in chronic rhinosinusitis by combined application of hematoxylin-eosin and gram staining [46].

5.2.6.2 Konfokální laserová skenovací mikroskopie

Konfokální laserová skenovací mikroskopie umožňuje zobrazení struktury biofilmu v 3D projekci, neboť se skenuje vzorek ve více rovinách ostrosti. Příklad snímku z CLSM je uveden na Obrázku č. 16. Díky 3D zobrazení se dají hodnotit další vlastnosti biofilmu, jako je například jeho prostorová struktura, tloušťka, drsnost i rozložení životaschopných či jinak specifikovaných buněk a komponent EPS [50].

Příprava preparátů pro CLSM vyžaduje značení fluorescenčními sondami. Řada fluorescenčních sond se specificky váže (například k nukleovým kyselinám, cytoplazmatické membráně, buněčné stěně apod.). Pomocí nich lze pak znázornit biofilm. Nejčastěji se používají například již zmíněné fluorescenční barvy Syto 9, PI či SYBR-Green [16].

Fluorescenční sondy jsou ale do jisté míry limitou CLSM, neboť neexistuje universální sonda pro biofilmovou matrici. Jednotlivé specifické sondy se vždy naváží na určitou část, díky čemuž se zviditelní. Další nevýhodou hodnocení biofilmu metodou CLSM může být interference lokálních fyzikálně-chemických vlastností biofilmu s fluorescenčními sondami či přirozenou fluorescencí samotného vzorku [9].



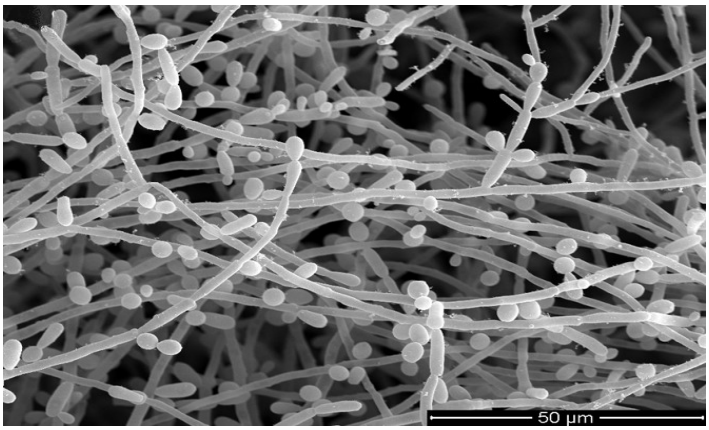
Obrázek č. 16: Snímek z konfokálního laserového skenovacího mikroskopu.
Biofilm kvasinky *Candida* sp. značený konjugátem konkavalin A – fluorescein isothiokyanát.
A) Snímek jedné roviny biofilmu. B) 3D struktura biofilmu.
Převzato z: VILA, T., *et al.* An extended analysis of the extracellular matrix of *Candida albicans* biofilms extracted during sample preparation process [51].

5.2.6.3 Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) je založena na využití tenkého svazku elektronů, který dopadá na vzorek, následně je odražen, opět zachycen a převeden na viditelný obraz. Takto vzniklé snímky mají velkou hloubku a ostrost, což poskytuje 3D zobrazení, které umožňuje vizualizaci struktury povrchu. Pro ilustraci je uveden snímek z SEM zastoupen Obrázkem č. 17 [9].

Mezi další výhody SEM patří vyšší rozlišení vizualizace a hloubka ostrosti ve srovnání s jinými zobrazovacími technikami, také široký rozsah zvětšení pro analýzu biofilmu. Nedostatečnost ovšem spočívá v časově náročné přípravě vzorku, který je nutno nejdříve zafixovat, dehydratovat a potáhnout vodivým materiálem. Tato příprava navíc může poškodit strukturu vzorku, znehodnotit EPS či způsobit výskyt artefaktů [52].

SEM lze použít v několika modifikacích, jako je například „Cryo-SEM“, „Environmental-SEM“ nebo „Focused ion beam-SEM“. „Cryo-SEM“ se využívá například ke zjištění struktury biofilmové matrice a je vhodný pro tekuté/polotekuté vzorky či vzorky citlivé na světlo. Příprava vzorku je jednodušší a rychlejší než pro klasickou SEM. Proto je zde nižší destrukce vzorků a méně artefaktů. „Environmental-SEM“ zobrazuje vzorky v jejich přirozeném stavu – *in situ* a v reálném čase. „Focused ion beam-SEM“ nachází hlavní využití ve studiu životního prostředí biofilmů [9].



Obrázek č. 17: Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu.

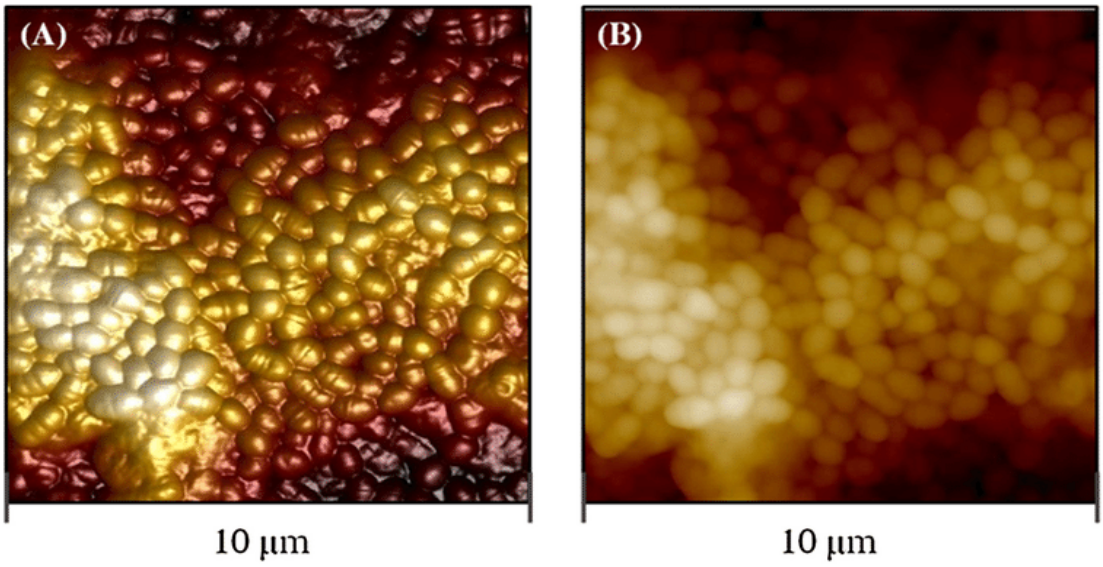
Biofilm kvasinky *Candida albicans* vytvořený *in vitro* na centrálním žilním katetru, preparát připravený chemickou fixací a dehydratací. V biofilmu nelze pozorovat žádnou extracelulární polymerní substanci.

Převzato z: VILA, T., *et al.* An extended analysis of the extracellular matrix of *Candida albicans* biofilms extracted during sample preparation process [51].

5.2.6.4 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (AFM, atomic force microscopy) je nedestruktivní technika ke zobrazení vzorků v rozmezí velikosti v nanometrech až mikrometrech. Princip metody spočívá ve vyvolání atomárních sil na povrchu vzorku a jejich následném mapování. Atomární síly jsou způsobeny přiblížením raménka s hrotem k povrchu vzorku. Vznikají tak přitažlivé (ve větších vzdálenostech vzorku a hrotu – elektrostatické, van der Waalsovy síly) či odpudivé síly (v menších vzdálenostech vzorku a hrotu – překryv elektronových oblaků), které mají za následek ohnutí raménka. Tento ohyb je poté zaznamenáván detekčním zařízením. Výsledný snímek může být buď ve 2D nebo i 3D zobrazení, jak je znázorněno na Obrázku č. 18 [53].

Výhodou AFM je analýza vodivých i nevodivých povrchů vzorků. Ke studiu biofilmů lze využít speciálního skeneru, který umožňuje práci v kapalném prostředí, díky čemuž lze zobrazit jednotlivé buňky v živném mediu. AFM se používá hlavně ke získání informací o struktuře biofilmů a mechanismech adheze. Lze ji tedy použít ke kvantifikaci míry adheze mezi živými buňkami a povrchem i mezi buňkami navzájem. Ve srovnání se SEM je u AFM méně náročná příprava vzorku. Vzorek lze hodnotit i *in situ* [9, 52, 53].



Obrázek č. 18: Snímky z mikroskopie atomárních sil.

Biofilm tvořený bakterií *Streptococcus mutans*. A) 3D zobrazení. B) 2D zobrazení.

Převzato z: LI, L., *et al.,* 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens [22].

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 *Optimalizace barvení preparátů s mikrobiálními biofilmy pro fluorescenční mikroskopii*

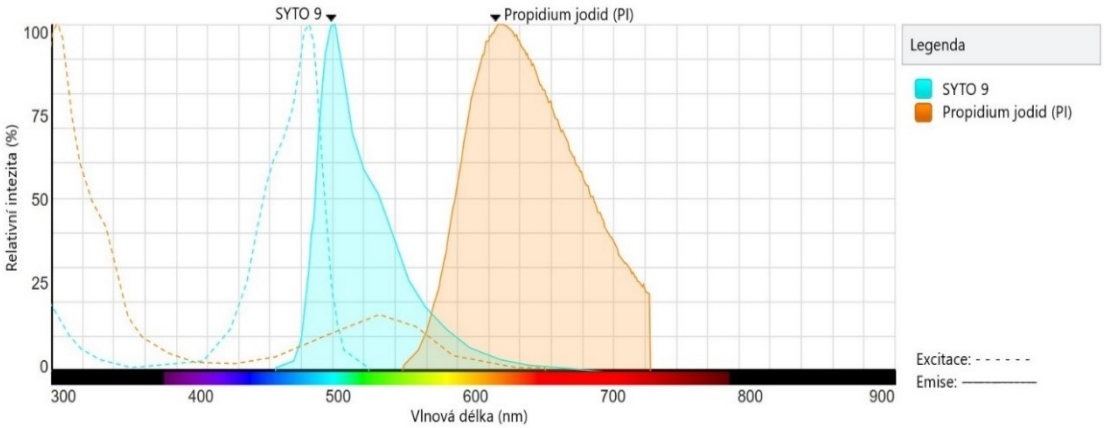
6.1.1 Pomůcky a materiál

- bakterie *Staphylococcus epidermidis* (SE) – modelový kmen ATCC 12228, CCM 784, lab. ID 205-2018
- kvasinka *Candida krusei* (CK) – modelový kmen, ATCC 6258, CCM 8271, lab. ID 169-2016
- kvasinka *Candida tropicalis* (CT) – klinický izolát, lab. ID 89-2016
- kvasinka *Candida albicans* (CA) – klinický izolát, lab. ID 16-2014
- pro bakterie: „Soyabean Casein Digest Medium“ (Soyabean medium) + Pig plasma, Sigma-Aldrich, USA (10 % suplementace)
- pro kvasinky: RPMI – 1640 Medium, suplementované 20 g L-glukózou, Sigma-Aldrich, USA + Pig plasma, Sigma-Aldrich, USA (10 % suplementace)
- Syto 9 – S34854, 5 mM solution in DMSO, Invitrogen, USA
- Propidium iodide, P4864 – 10 ml, 1 mg/ml PI in water, MW 668,39; c = 1,496 mM, Sigma-Aldrich, USA
- 18909 Calcofluor White Stain (kalkofluorová běloba), Sigma-Aldrich, USA
- Konjugát konkavalinu A s fluorescein isothiokyanátem – Concavalin A from Canvalia ensiformis (FITC conjugate, 7,4 mol/mol) – připravený zásobní roztok FITC-ConA, c = 0,016 g/ml ve fyziologickém roztoku, Sigma-Aldrich, USA Pr. No.: C 7642
- Hoechst 33342, Sigma-Aldrich, USA – připravený zásobní roztok: c = 50 mg/ml
- deionizovaná voda, fyziologický roztok, fyziologický roztok suplementovaný solemi $CaCl_2$
- běžné vybavení mikrobiologické laboratoře:
    - jednorázové očkovací kličky, Gamedium, Česká republika
    - sterilní mikrotitrační destičky s víčkem, 96 jamek, Gamedium, Česká republika
    - stojan na mikrozkumavky, Gamedium, Česká republika

- automatické pipety, špičky, mikrozkumavky, podložní a krycí sklíčka
- laminární box Esco Class II type A2, Dynex laboratories s.r.o, Česká republika
- Vortex M52 Minishaker IKA, P-LAB, Česká republika
- Kývačka MR-1 Mini Rocker-Shaker, Biosan, Litva
- Termostat Binder WTB, Fisher Scientific, Německo
- fluorescenční mikroskop Olympus Provis AX 70 s kamerou připojenou k PC s programem NIS – elements AR, Nikon, Japonsko

6.1.2 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii – vizualizace bakteriálních a kvasinkových biofilmů pomocí Syto 9/propidium jodid a doplňkově kalkofluorovou bělobou

Barvivo Syto 9 i PI jsou fluorogenní barviva vážící se na strukturu DNA. Syto 9 pronikne skrze buněčné membrány živých i mrtvých buněk, zatímco barvivo PI pronikne pouze do buněk s poškozenými membránami, tj. mrtvých. Díky tomuto barvení lze rozlišit životaschopné buňky od buněk neživých. Jelikož se emisní fluorescenční spektra Syto 9 a PI téměř nepřekrývají, jak znázorňuje Obrázek č. 19, lze použít barvení pomocí kombinace těchto barev. Barvivo Syto 9 bude emitovat v zelené oblasti spektra (emisní maximum při vlnové délce 500 nm) a PI v červené oblasti spektra (emisní maximum při vlnové délce 620 nm). Více o této kombinaci barev v kapitole 5.2.5.2.1 Detekce biofilmu pomocí kombinace barviv Syto 9 a propidium jodidu [38].



Obrázek č. 19: Fluorescenční spektrum barviva SYTO 9 a PI.

SYTO 9 má emisní maximum při vlnové délce 500 nm a PI při vlnové délce 620 nm.

Převzato a upraveno z: https://www.thermofisher.com/order/spectra-viewer [54].

Fluorogenní barvivo kalkofluorová běloba se specificky váže na polysacharidy, jako je například celulóza či chitin, které jsou mimo jiné součástí buněčné stěny kvasinek. Polysacharidy jsou ale také jednou z hlavních složek extracelulární polymerní substance biofilmu. Emisní maximum kalkofluorové běloby se pohybuje kolem vlnové délky 430 nm a ve fluorescenčním mikroskopu dochází k emisi v modrém spektru. Kombinace těchto 3 barviv by tudíž neměla být z hlediska fluorescenční mikroskopie problémem. Kombinace barviv Syto 9, PI a kalkofluorové běloby by tak mohla být vhodná pro celkovou vizualizaci biofilmu včetně rozlišení životaschopných buněk od mrtvých [55].

Postup

1. Do mikrozkumavky se napipetuje 900 µl Soyabean media a 100 µl prasečí plazmy. Poté se do této mikrozkumavky zanesou dvě kolonie *Staphylococcus epidermidis* z Soyabean agaru.
2. Do mikrotitrační destičky s 96 jamkami se do 6ti jamek v řádku A napipetuje 150 µl suspenze.
3. Do dalších třech mikrozkumavek se do každé napipetuje 900 µl RPMI média s glukózou a 100 µl prasečí plazmy. Do první mikrozkumavky se zanese inokulum kvasinky kmene *Candida krusei,* do druhé *Candida tropicalis* a do třetí *Candida albicans* (stačí jedna větší kolonie).
4. Do téže mikrotitrační destičky jako v bodě 2. se do 6ti jamek v řádku B napipetuje 150 µl z první mikrozkumavky, do dalších 6ti jamek v řádku C 150 µl z druhé mikrozkumavky a do dalších 6ti jamek v řádku D z poslední mikrozkumavky.
5. Takto připravená mikrotitrační destička se kultivuje dva dny v termostatu při 37 °C, statická kultivace
6. Po kultivaci se jamky promyjí 1x fyziologickým roztokem
7. Veškeré medium a promývací roztok se odpipetuje.
8. Připraví se barvící roztok na barvení bakteriálního biofilmu – volené cílové koncentrace fluorescenčních barviv v rámci našich experimentů vycházejí z podkladů uvedených v rámci dokumentu LIVE/DEAD BacLight Viability Kits,

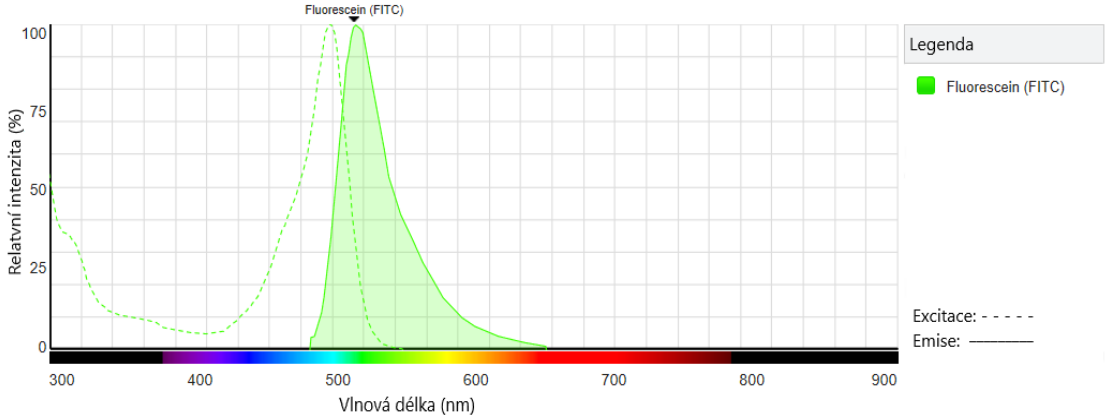
viz: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L7012?SID=srch-srp-L7012, kde je uvedena cílová koncentrace $c_{(SYTO\ 9)}$ = 5, 01 µM a $c_{(PI)}$ = 30 µM.

a) Do mikrozkumavky se napipetuje 1000 µl fyziologického roztoku a přidá se 1 µl barviva Syto 9 ze zásobního roztoku.
   Cílová koncentrace Syto 9 pak činí přibližně: 4, 995 µM.
b) Do mikrozkumavky s 1000 µl fyziologického roztoku a 1 µl barviva Syto 9 se přidá 20 µl PI.
   Cílová koncentrace PI poté činí přibližně: 29,30 µM.

9. Do promytých jamek mikrotitrační destičky se pipetuje po 100 µl barvícího roztoku připraveného v bodě 8.
10. Mikrotitrační destička se poté inkubuje 25 minut ve tmě za mírného třepání.
11. Po inkubaci se z každé jamky odpipetuje 50 µl a provede se intenzivní seškrábání přisedlého biofilmu bakteriologickou kličkou.
12. Veškerý obsah jamek se přenese do mikrozkumavek (jedna jamka – jedna mikrozkumavka) a provede se 7minutová sonikace.
13. Na odmaštěná podložní sklíčka se napipetuje po 7 µl mikrobiální suspenze z jednotlivých mikrozkumavek, 7 µl kalkofluorové běloby a promísí se to pipetovací špičkou.
14. Vzorek se překryje krycím sklíčkem, jeho okraje se oblepí lakem.
15. Takto připravený preparát se hodnotí pomocí fluorescenční mikroskopie.

6.1.3 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii – vizualizace kvasinkových biofilmů pomocí konjugátu konkavalin A-fluorescein isothiokyanát/kalkofluorová běloba

Barvivo FITC-ConA je složeno z lektinu z konkavalinu A (izolovaného z rostliny *Canavalia ensioformis*). Více o lektinech je uvedeno v kapitole 5.2.1.2 Přímá vizualizace extracelulární polymerní substance. Tento lektin je konjugován s FITC (fluorescein isothiocyanate, česky fluorescein isothiokyanát), což umožní detekci fluorescenčním mikroskopem. Jelikož jsou lektiny schopny specifické vazby k polysacharidům, mělo by se toto barvivo navázat na polysacharidy obsažené v extracelulární polymerní substanci, ale také na cukry v buněčných stěnách kvasinek. Fluorescenční spektrum je znázorněno na Obrázku č. 20, excitační maximum FITC je při vlnové délce 515 nm a ve fluorescenční mikroskopu tudíž dochází k emisi v zeleném spektru [17].



Obrázek č. 20: Fluorescenční spektrum barviva konkavalin A-fluorescein isothiokyanát. Emisní maximum při vlnové délce 515 nm.

Převzato a upraveno z: https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?SID=srch-svtool&UID=2761old_2 [56].

Jak již bylo zmíněno, fluorogenní barvivo kalkofluorová běloba se specificky váže na polysacharidy, jako je například celulóza či chitin. Tyto polysacharidy jsou obsažené v buněčných stěnách kvasinek, tudíž by se na ně tato barva měla navázat. Je ale třeba brát v úvahu, že polysacharidy se vyskytují i v EPS. Emisní maximum kalkofluorové běloby se pohybuje kolem vlnové délky 430 nm a ve fluorescenčním mikroskopu dochází k emisi v modrém spektru [55].

Postup

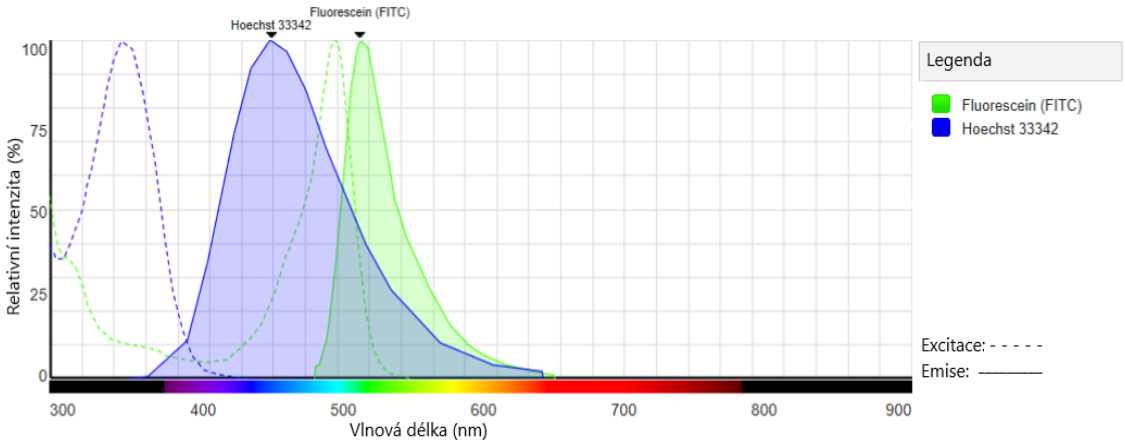
1. Připraví se 3 mikrozkumavky a popíší se CA, CK a CT. Do každé z nich se napipetuje 900 µl RPMI média a 100 µl fetálního bovinního séra.
2. Do napipetovaného média v mikrozkumavkách se zanesou dvě větší kolonie kvasinek kultivovaných na Sabouradově agaru, dle označení mikrozkumavek: CA – kvasinka *Candida albicans, CK* – kvasinka *Candida krusei, CT* – kvasinka *Candida tropicalis*
3. Do mikrotitrační destičky s 96 jamkami se postupně vždy do každé z 6ti prvních jamek v řádku A, B a C napipetuje po 150 µl suspenze z mikrozkumavky CA (řádek A), CK (řádek B) a CT (řádek C).
4. Takto připravená mikrotitrační destička se kultivuje dva dny v termostatu při teplotě 37 °C, statická kultivace.
5. Naformované biofilmy se 1x promyjí 100 µl fyziologického roztoku suplementovaného solemi $CaCl_2$.
6. Připraví se barvící roztok.
    a) Do mikrozkumavky se napipetuje 1000 µl fyziologického roztoku suplementovaného solemi $CaCl_2$.
    b) Tento fyziologický roztok s suplementuje 20, 8 µl barviva FITC-ConA. Výsledná koncentrace FITC-ConA je tak přibližně 333 µg/ml.
7. Do promytých jamek mikrotitrační destičky se pipetuje 100 µl barvícího roztoku připraveného dle bodu 6.
8. Mikrotitrační destička se poté inkubuje 40 minut ve tmě při shaking modu.
9. Po inkubaci se jamičky 1x promyjí 100 µl fyziologického roztoku suplementovaného solemi $CaCl_2$.
10. Do promytých jamek se přidá 7 µl fyziologického roztoku suplementovaného solemi $CaCl_2$ a provede se intenzivní seškrábání přisedlého biofilmu bakteriologickou kličkou.
11. Před nanesením suspenze seškrábaného biofilmu na podložní sklíčko se zředí kalkofluorová běloba v poměru podílového ředění 1:20 – tzn.: v mikrozkumavce

se smíchá 10 µl kalkofluorové běloby se 190 µl fyziologického roztoku suplementovaného solemi $CaCl_2$.

12. Na řádně odmaštěné a nepoškrábané podložní sklíčko se nanese 7 µl seškrábané suspenze a 7 µl zředěné kalkofluorové běloby. Suspenze a barvivo se promísí pipetovací špičkou.
13. Takto připravený preparát se hodnotí pomocí fluorescenční mikroskopie.

6.1.4 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii – vizualizace mikrobiálních biofilmů pomocí konjugátu konkavalin A-fluorescein isothiokyanát a Hoechst 33342

Barvivo Hoechst 33342 je schopné proniknout skrze buněčné membrány živých i mrtvých buněk a vázat se na jejich DNA. Taktéž by se mohlo vázat na DNA obsažené v extracelulární polymerní substanci. Emisní maximum vykazuje při vlnové délce 451 nm, dochází k emisi v modrém spektru. Charakteristika barviva FITC-ConA je uvedena v předchozím pokusu. Kombinace fluorescenčních spekter obou fluorescenčních barev je uvedena na Obrázku č. 21 [57].



Obrázek č. 21: *Fluorescenční spektrum barviv konkavalin A-fluorescein isothiokyanát (FITC-ConA) a Hoechst 33342.*

Emisní maximum FITC je při vlnové délce 515 nm a Hoechst 33342 je při vlnové délce 451 nm.

Převzato a upraveno z: *https://www.thermofisher.com/order/spectra-viewer* [54].

Postup

1. Do mikrozkumavky označené SE se napipetuje 1000 µl Soyabean media. Poté se do této mikrozkumavky zanesou dvě kolonie *Staphylococcus epidermidis.*
2. Připraví se další 3 mikrozkumavky a popíší se CA, CK a CT. Do každé z nich se napipetuje 900 µl RPMI média a 100 µl fetálního bovinního séra.
3. Do napipetovaného média v mikrozkumavkách se zanesou dvě větší kolonie vykultivovaných kvasinek dle označení mikrozkumavek: CA – kvasinka *Candida albicans, CK* – kvasinka *Candida krusei, CT* – kvasinka *Candida tropicalis*
4. Do mikrotitrační destičky s 96 jamkami se postupně vždy do každé z 6ti prvních jamek v řádku A, B, C a D napipetuje 150 µl suspenze z mikrozkumavky SE (řádek A), CA (řádek B), CK (řádek C) a CT (řádek D).
5. Takto připravená mikrotitrační destička se kultivuje pět dní v termostatu při 37 °C, statická kultivace.
6. Naformované biofilmy se 1x promyjí 100 µl fyziologického roztoku suplementovaného solemi $CaCl_2$.
7. Připraví se barvící roztok.
    a) Do mikrozkumavky se napipetuje 1000 µl fyziologického roztoku suplementovaného solemi $CaCl_2$.
    b) Tento fyziologický roztok se suplementuje 20, 8 µl barviva FITC-ConA. Výsledná koncentrace FITC-ConA je tak přibližně 333 µg/ml.
    c) Tento barvící roztok se suplementuje 5 µl zásobního roztoku barviva Hoechst 33342, které bylo předem naředěno takto:
        - Do mikrozkumavky se napipetuje 1000 µl fyziologického roztoku suplementovaného solemi $CaCl_2$.
        - Tento fyziologický roztok se suplementuje 10 µl barviva Hoechst 33342 (zásobní roztok, c=50mg/ml) FITC-ConA.

8. Do promytých jamek mikrotitrační destičky se pipetuje 100 µl barvícího roztoku připraveného dle bodu 7.
9. Mikrotitrační destička se poté inkubuje 40 minut ve tmě za mírného třepání.
10. Po inkubaci se jamičky 1x promyjí 100 µl fyziologického roztoku suplementovaného solemi $CaCl_2$.
11. Do promytých jamek se přidá 7 µl fyziologického roztoku suplementovaného solemi $CaCl_2$ a provede se intenzivní seškrábání přisedlého biofilmu bakteriologickou kličkou.
12. Na řádně odmaštěná a nepoškrábaná podložní sklíčka se nanese 7 µl seškrábané suspenze, překryje se krycím sklíčkem a okraje oblepí lakem.
13. Takto připravený preparát se hodnotí pomocí fluorescenční mikroskopie.

7. VÝSLEDKY A DISKUSE

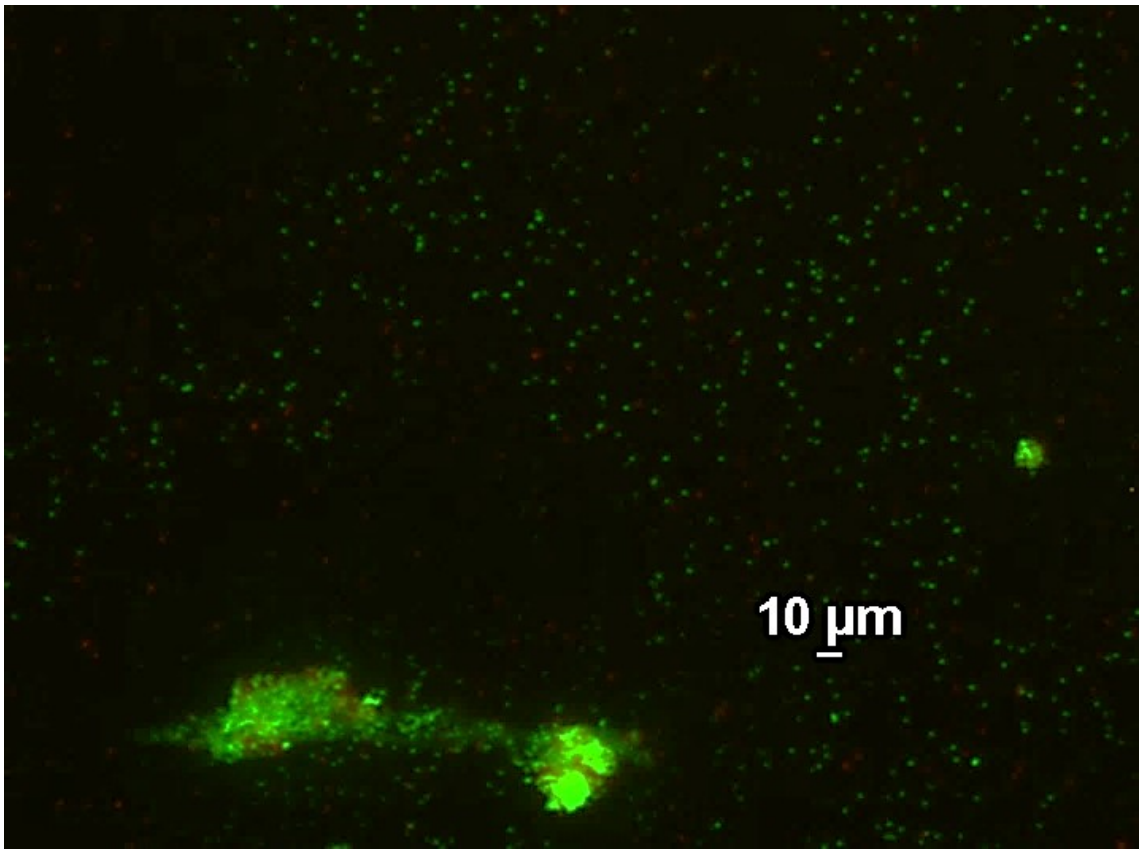
7.1 *Optimalizace barvení preparátů s mikrobiálními biofilmy pro fluorescenční mikroskopii*

7.1.1 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii – vizualizace bakteriálních a kvasinkových biofilmů pomocí Syto 9/propidium jodid a doplňkově kalkofluorovou bělobou

Barvivo Syto 9 se dle očekávání navázalo na DNA buněk biofilmu. V případě mrtvých buněk byla zelená barva vyvázána červenou – PI. Obě tato barviva se také navázala na DNA obsažené biofilmové matrici. Zvolená koncentrace barviv i postup barvení se ukázal jako ideální. Nicméně kombinace s kalkofluorovou bělobou se příliš neosvědčila. Na následujících Obrázcích č. 22 až 27 jsou přiloženy snímky pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu, mikrobiální biofilm starý 48 hodin (předpoklad vysoké životaschopnosti mikrobiálních agens).

Je ale třeba brát v úvahu, že díky metodě, kterou se vzorky připravovaly, došlo k porušení prostorové struktury EPS. Struktura EPS tedy nemůže vykazovat reálnou prostorovou konformaci, kterou by spíše odráželo využití CLSM. Nicméně pro optimalizaci barvení mikrobiálních biofilmů je epifluorescenční mikroskopie postačující.

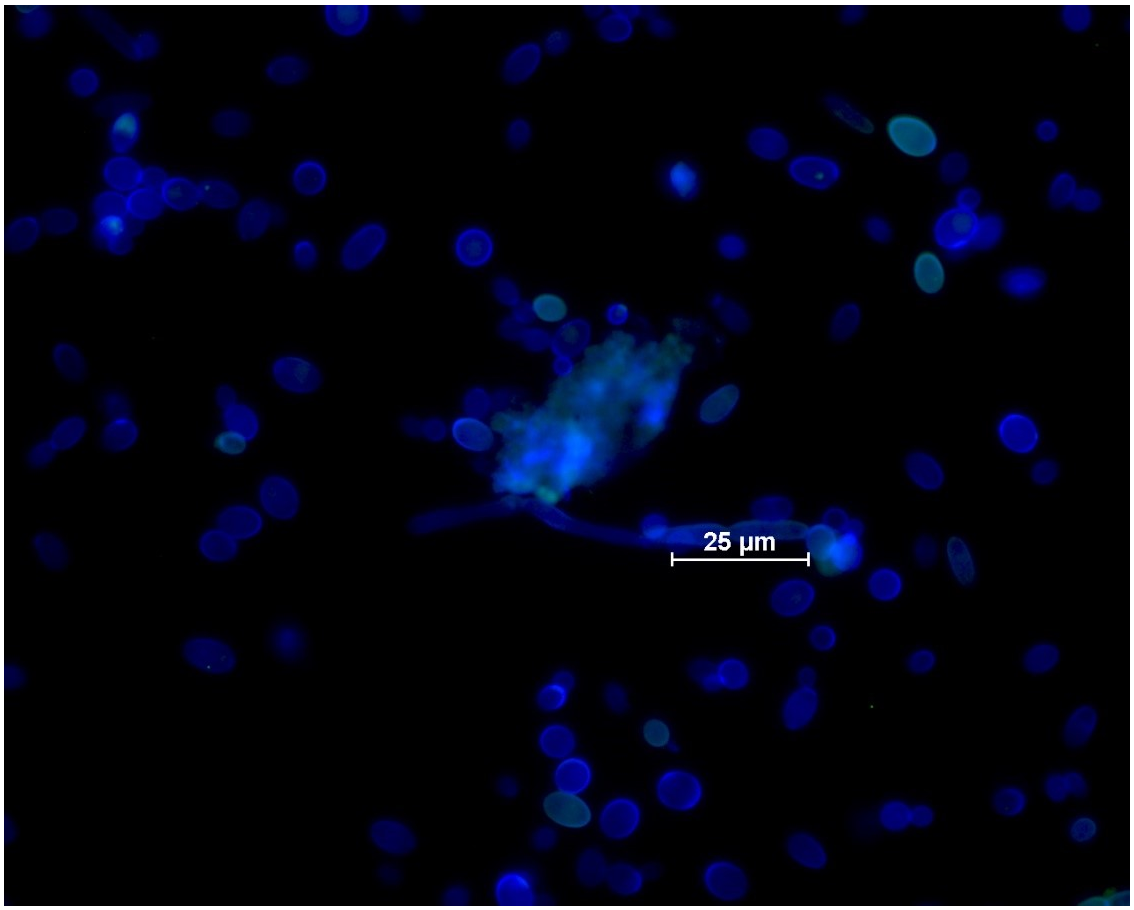
Kombinace těchto tří barviv dohromady se pro studium bakteriálních biofilmů příliš neosvědčila.



Obrázek č. 22: Snímek biofilmu bakterie Staphylococcus epidermidis pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie.

Bakteriální biofilm starý 48 hodin, značeno Syto 9/propidium jodid.

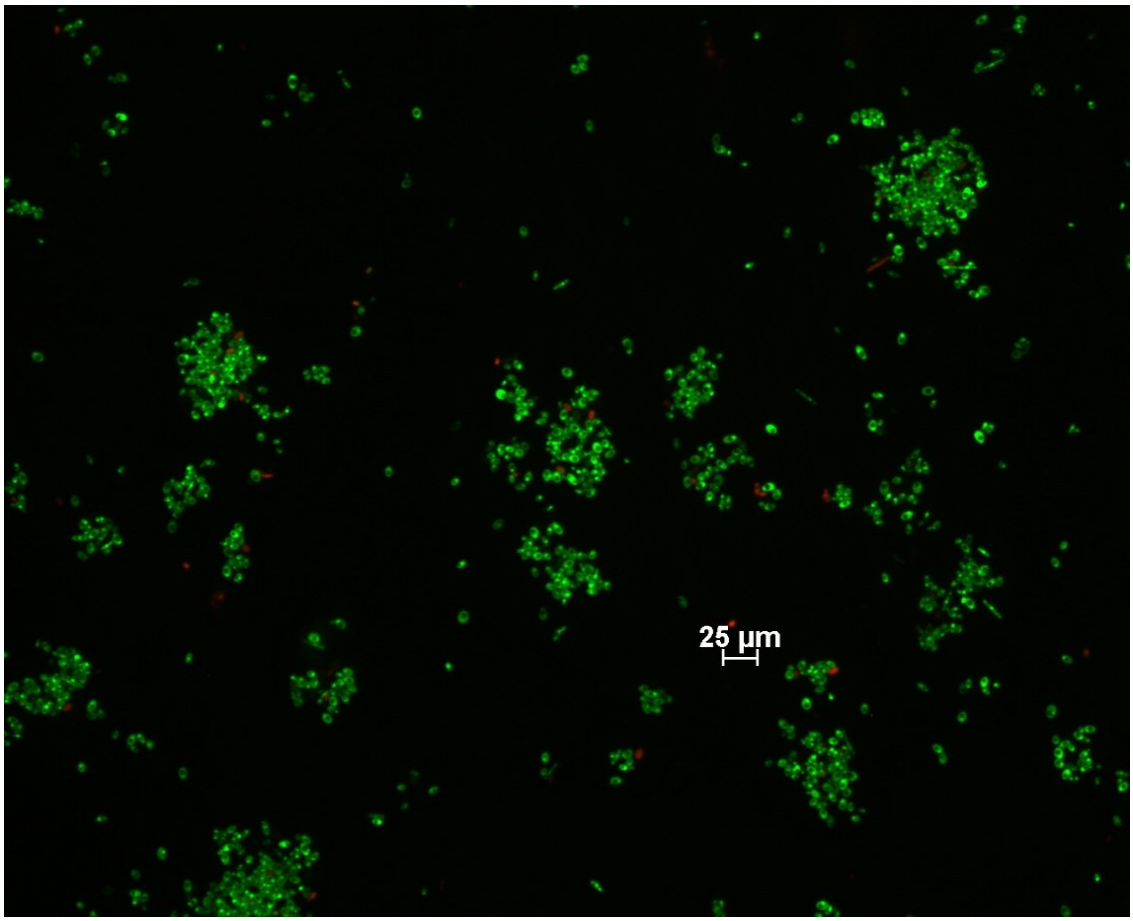
Zelené – živé buňky, červené – mrtvé buňky. Shluk ve spodní části snímku by mohl značit extracelulární polymerní substanci.



Obrázek č. 23: Snímek biofilmu kvasinky Candida krusei pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie.

Kvasinkový biofilm starý 48 hodin, značeno: Syto 9/propidium jodid/kalkofluorová běloba (ředění 1:1).

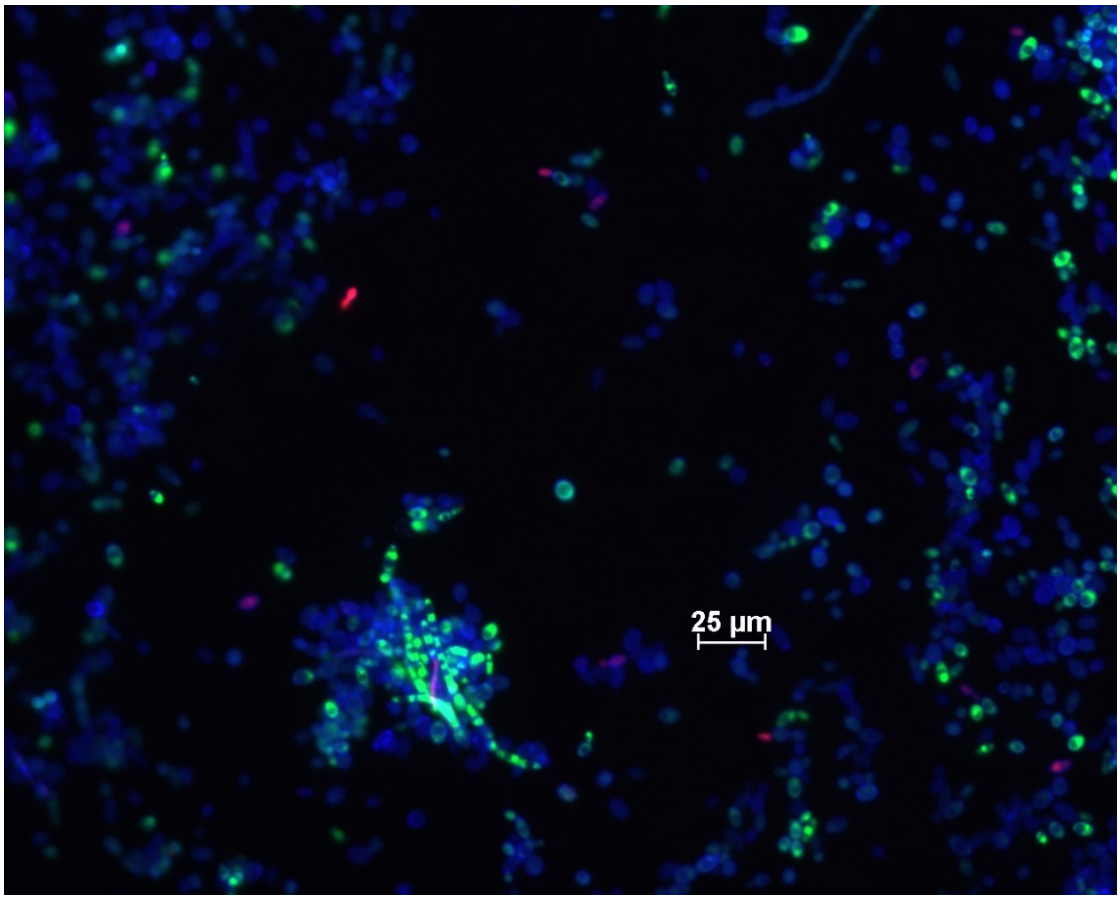
Uprostřed snímku lze pozorovat část extracelulární polymerní substance a pod ní vláknitou formu kvasinky. Kalkofluorová běloba (modrá) se navázala na polysacharidy ve stěnách kvasinek i na cukernaté komponenty v EPS. Pro přípravu preparátu byla použita kalkofluorová běloba o cílovém ředění 1:1. Na snímku nejsou zaznamenány žádné buňky značené červenou PI. Je to způsobeno buď tím, že nejsou přítomny žádné mrtvé buňky a vše je živé, nebo došlo k vytěsnění barvy PI kalkofluorovou bělobou. Jelikož ale i zelená Syto 9 je zde zastoupena pouze velice nepatrným podílem, zdá se, že kalkofluorová běloba o této koncentraci v kombinaci se Syto 9 a PI vytěsňuje obě tyto barvy.



Obrázek č. 24: Snímek biofilmu kvasinky Candida krusei pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie.

Kvasinkový biofilm starý 48 hodin, značeno: Syto 9/propidium jodid.

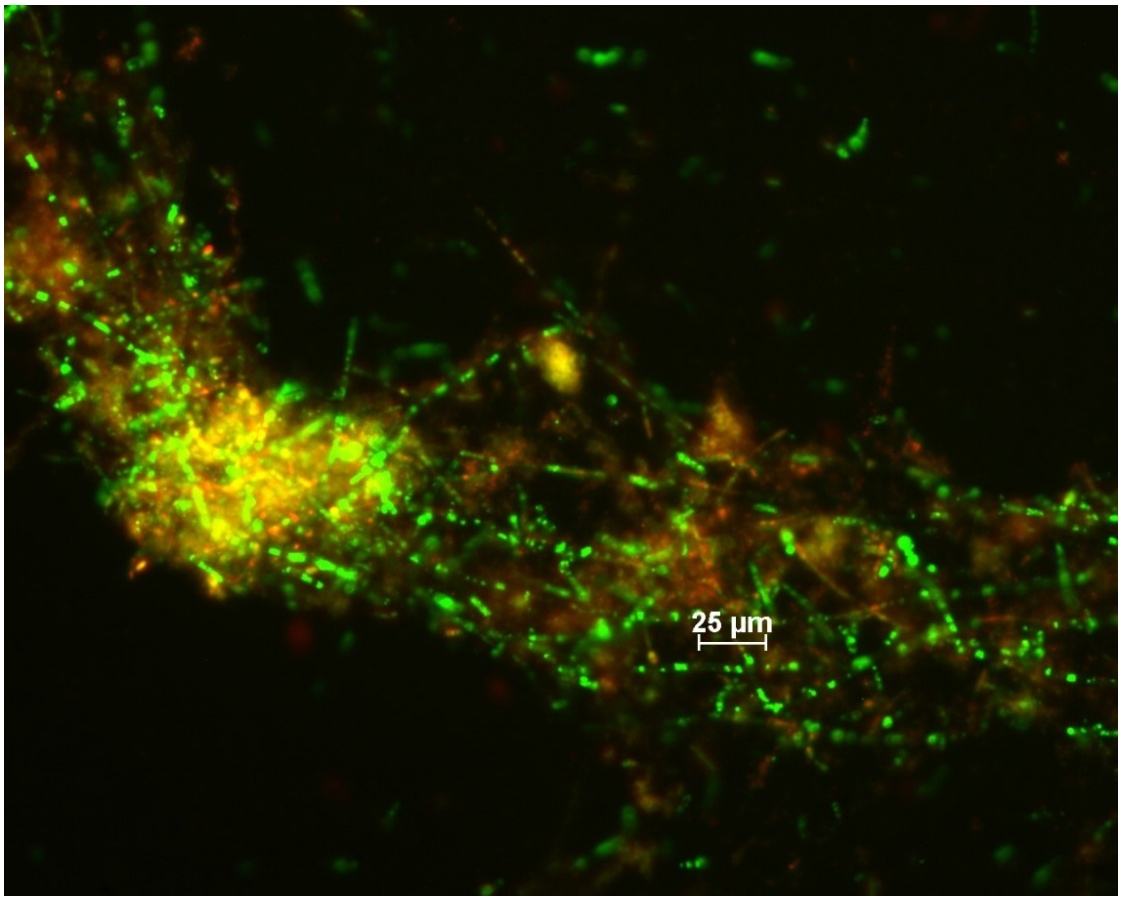
Zelené – živé buňky, červené – mrtvé buňky.



Obrázek č. 25: Snímek biofilmu kvasinky Candida tropicalis pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie.

Kvasinkový biofilm starý 48 hodin značený SYTO9/propidium jodid/kalkofluorová běloba (cílové podílové ředění 1:40).

Kalkofluorová běloba (modrá) navázaná na polysacharidy ve stěnách kvasinek i v extracelulární polymerní substanci. Zelené – živé buňky, červené – mrtvé buňky.

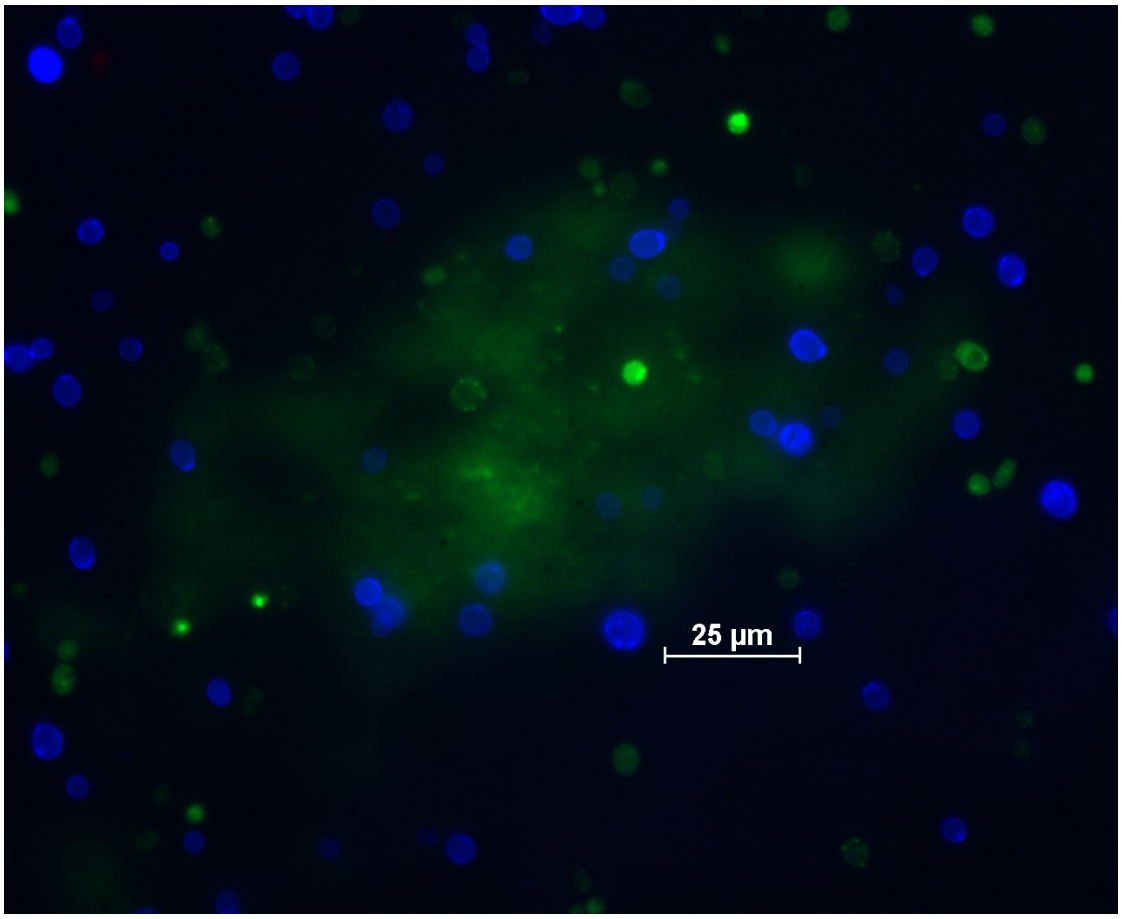


Obrázek č. 26: Snímek biofilmu kvasinky Candida tropicalis pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie.

Kvasinkový biofilm starý 120 hodin značený SYTO9/propidium jodid.

Zelené – živé buňky, červené – mrtvé buňky.

Kvasinka byla přítomna většinou ve vláknité formě. „Obláčky“ oranžové barvy svědčí o přítomnosti EPS biofilmu, konkrétně DNA obsažené v biofilmové matrici.



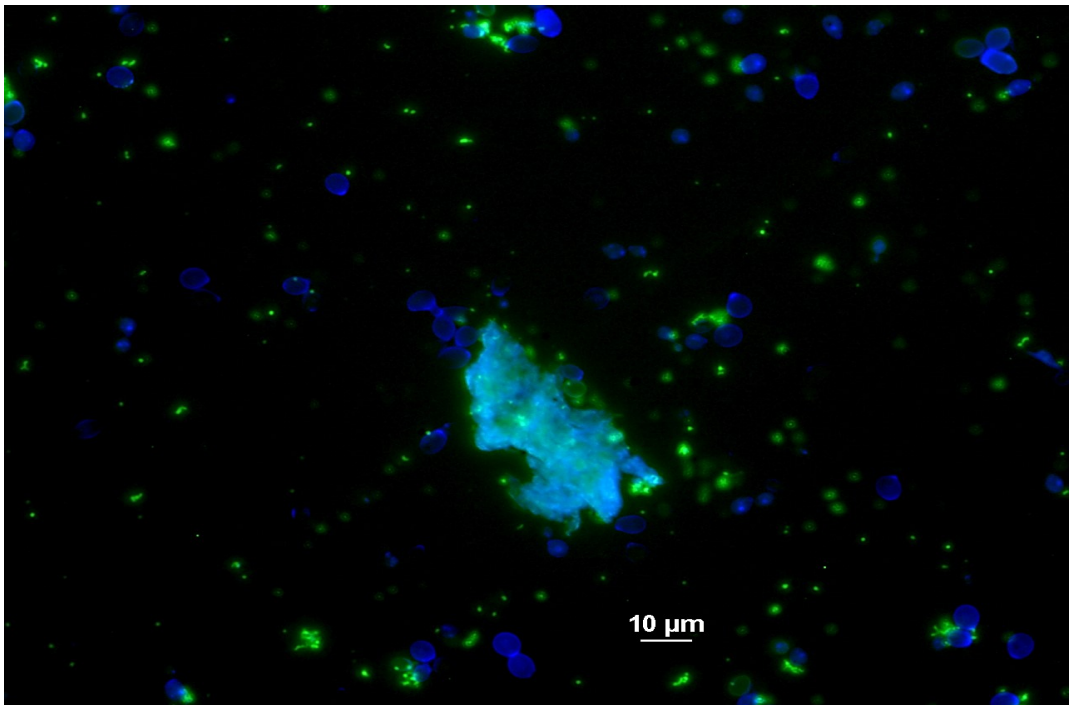
Obrázek č. 27: Snímek biofilmu kvasinky Candida albicans pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie

Kvasinkový biofilm starý 120 hodin značený SYTO9/propidium jodid/kalkofluorová běloba.

Modrá – kvasinky, zelený obláček uprostřed snímku by mohl značit DNA obsažené v extracelulární polymerní substanci biofilmu.

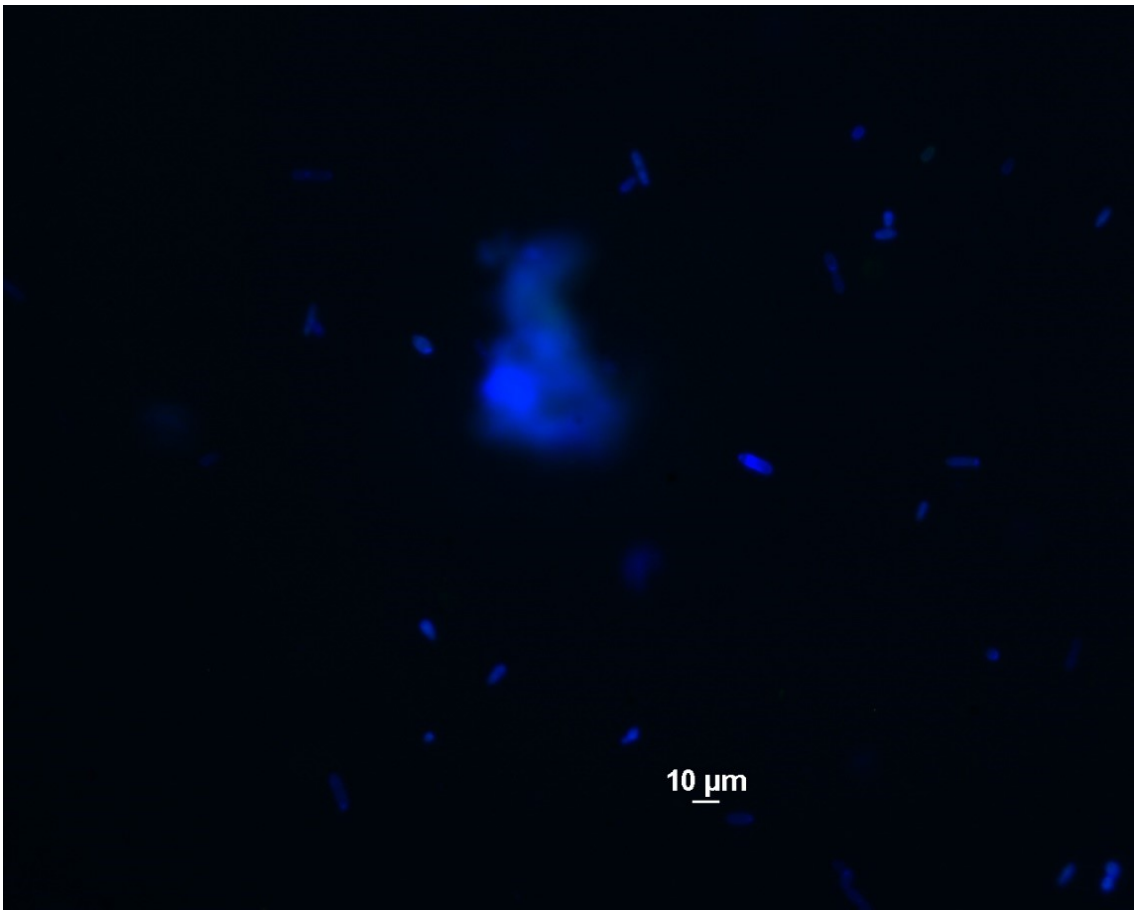
7.1.2 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii – vizualizace kvasinkových biofilmů pomocí konjugátu konkavalin A-fluorescein isothiokyanát/kalkofluorová běloba

Fluorescenční barvivo kalkofluorová běloba se navázalo především na polysacharidy obsažené v buněčných stěnách kvasinek. Díky barvivu FITC-ConA mohly být vizualizovány volné polysacharidy, které vzhledem k přípravě vzorků měly původ v extracelulární polymerní substanci, čímž lze určit, zda je daný kmen biofilm-formující. Nevýhodou tohoto barvení ale je, že FITC-ConA by ve fluorescenčním mikroskopu dávalo signál i nenavázané, tudíž bylo potřeba provést promývací kroky, aby se nenavázaná barva odmyla. A také zde je třeba brát v úvahu narušení struktury biofilmu způsobené přípravou vzorku. Nicméně kombinace těchto barviv pro barvení mikrobiálních biofilmů se zdá být optimální. Na následujících Obrázcích č. 28 až 30 jsou zobrazeny snímky z fluorescenční mikroskopie barvených kvasinkových biofilmů starých 48 hodin.



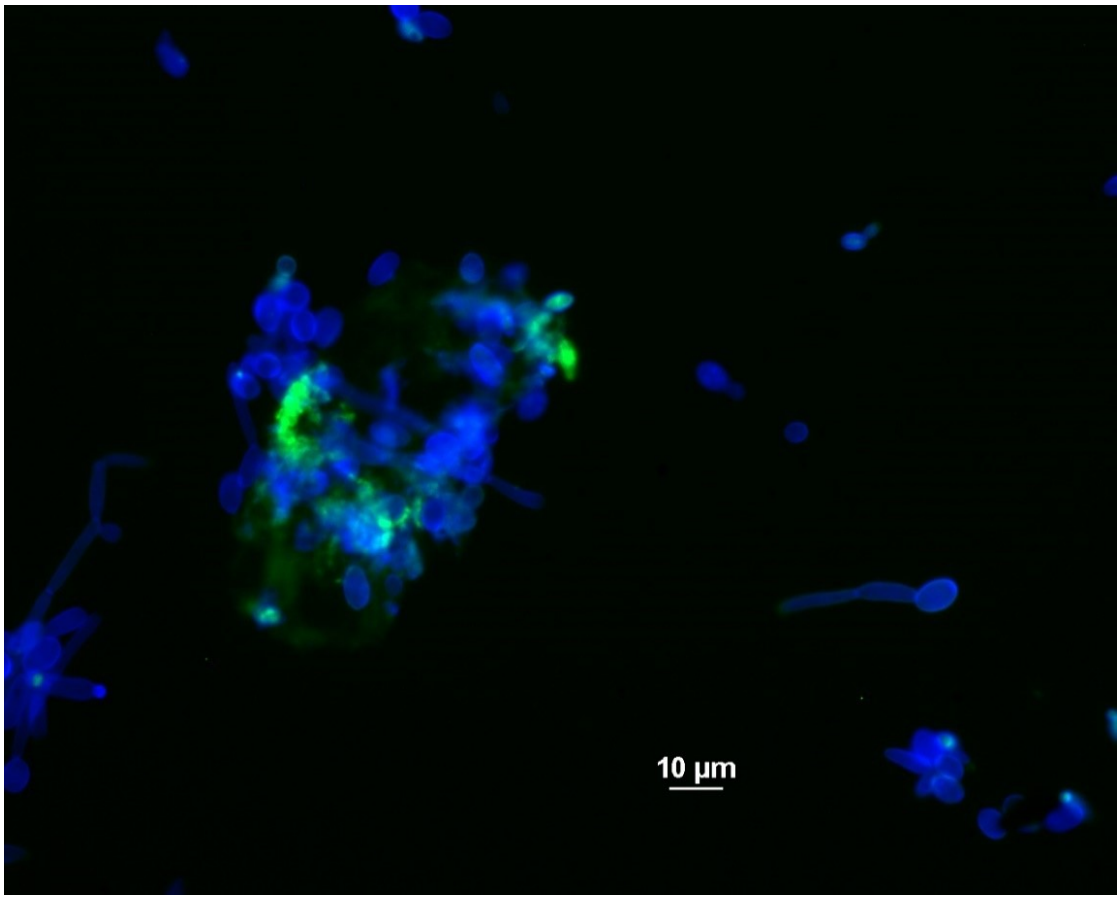
Obrázek č. 28: Snímek biofilmu kvasinky Candida albicans pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie.

Kvasinkový biofilm starý 48 hodin značený konjugátem konkavalin A-fluorescein isothiokyanát/kalkofluorová běloba (cílové poměrové ředění 1:40). Modré kuličky – kvasinky, zelená – volné polysacharidy z EPS, obláček uprostřed – extracelulární polymerní substance.



Obrázek č. 29: Snímek biofilmu kvasinky Candida krusei pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie.

Kvasinkový biofilm starý 48 hodin značený kalkofluorovou bělobou. Modrý obláček uprostřed snímku by mohl být tvořený buď shlukem kvasinek nebo i polysacharidy EPS.



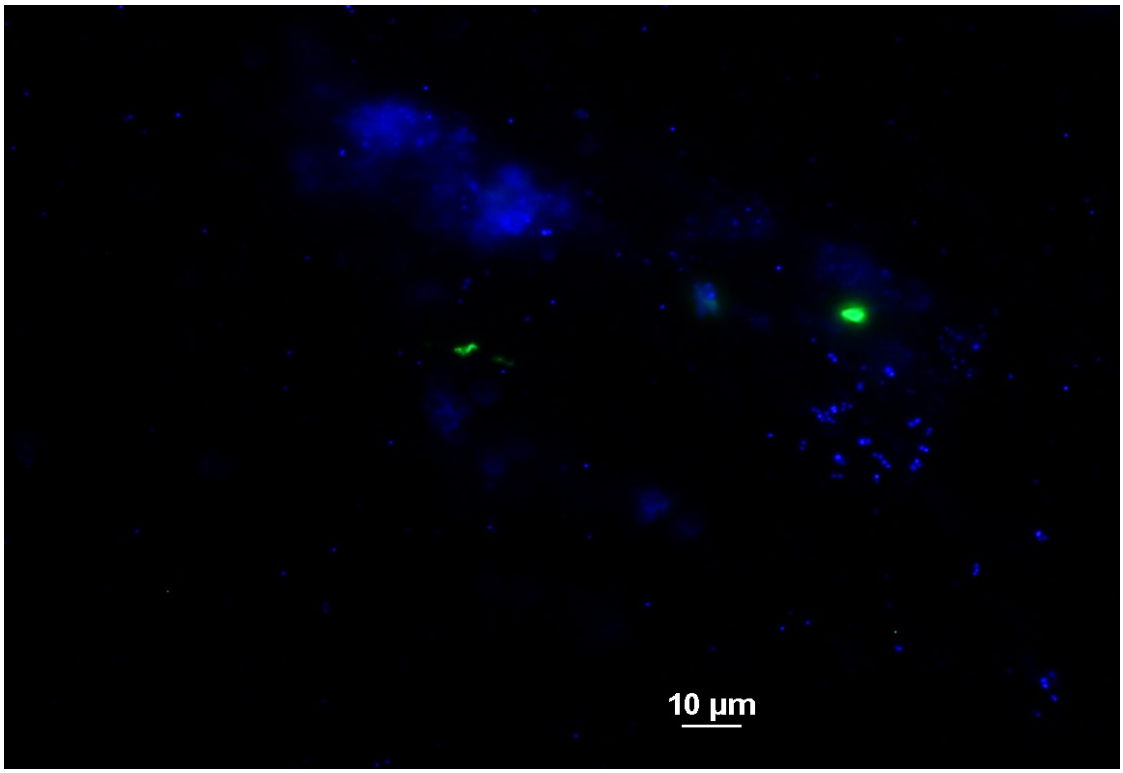
Obrázek č. 30: Snímek biofilmu kvasinky Candida tropicalis pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie.

Kvasinkový biofilm starý 48 hodin značený konjugátem konkavalin A-fluorescein isothiokyanát/kalkofluorová běloba (cílové poměrové ředění 1:40). Modré kuličky a vlákna – kvasinky, zelená – volné polysacharidy z EPS.

7.1.3 Příprava preparátů pro fluorescenční mikroskopii – vizualizace mikrobiálních biofilmů pomocí konjugátu konkavalin A-fluorescein isothiokyanát a Hoechst 33342

Barvivo FITC konjugované ke konkavalinu A se dle očekávání navázalo na polysacharidy buněčných stěn kvasinek. V kvasinkách byla dále pozorována jádra obsahující DNA, která se díky barvivu Hoechst 33342 obarvila modře. Tato barva se navázala také na DNA bakteriálních buněk *Staphylococcus epidermidis*, čímž je zviditelnila. Na polysacharidy v útržcích extracelulární polymerní substance se v tomto případě navázalo barvivo FITC-ConA.

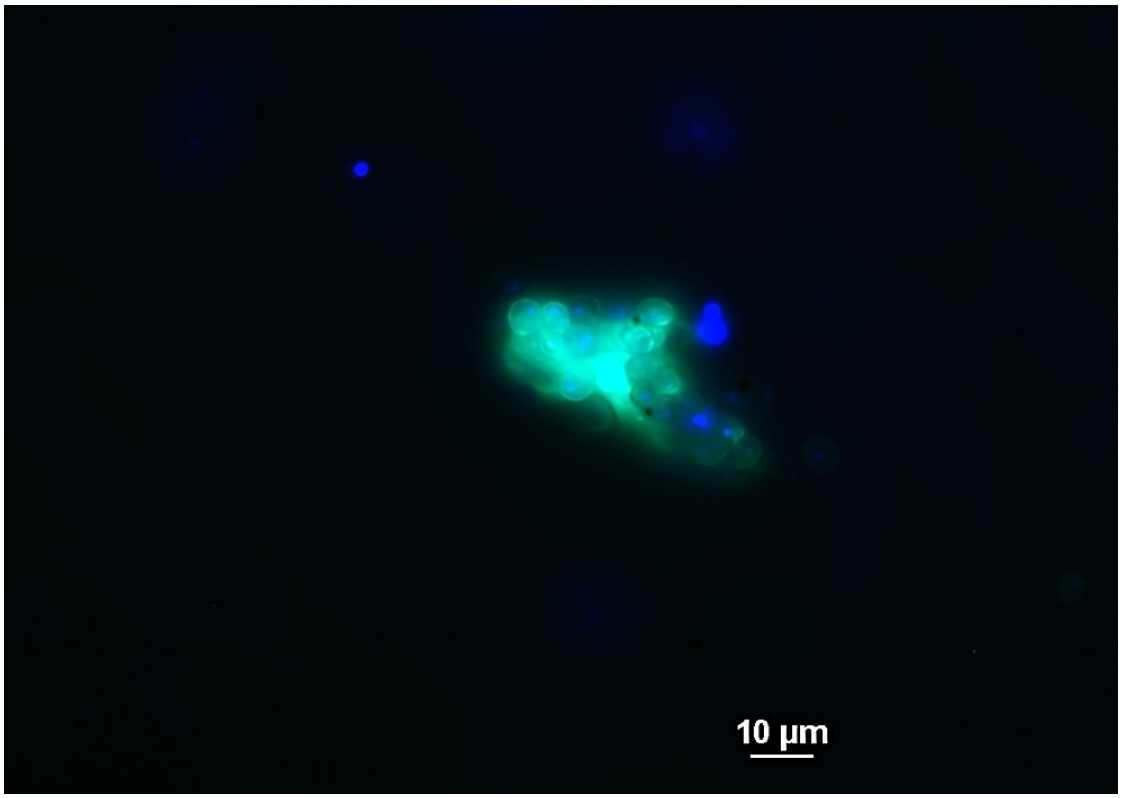
Při tomto postupu barvení bylo také nutné provést promývací kroky. Protože jak je již zmíněno výše, barvivo FITC-ConA fluoreskuje i nenavázané. Na následujících Obrázcích č. 31 až 35 jsou uvedeny výsledné snímky pořízené pomocí fluorescenční mikroskopie obarvených mikrobiálních biofilmů po 120 hodinové kultivaci.



Obrázek č. 31: Snímek biofilmu bakterie Staphylococcus epidermidis pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie.

Bakteriální biofilm starý 120 hodin značený konjugátem konkavalin A-fluorescein isothiokyanát/Hoechst 33342.

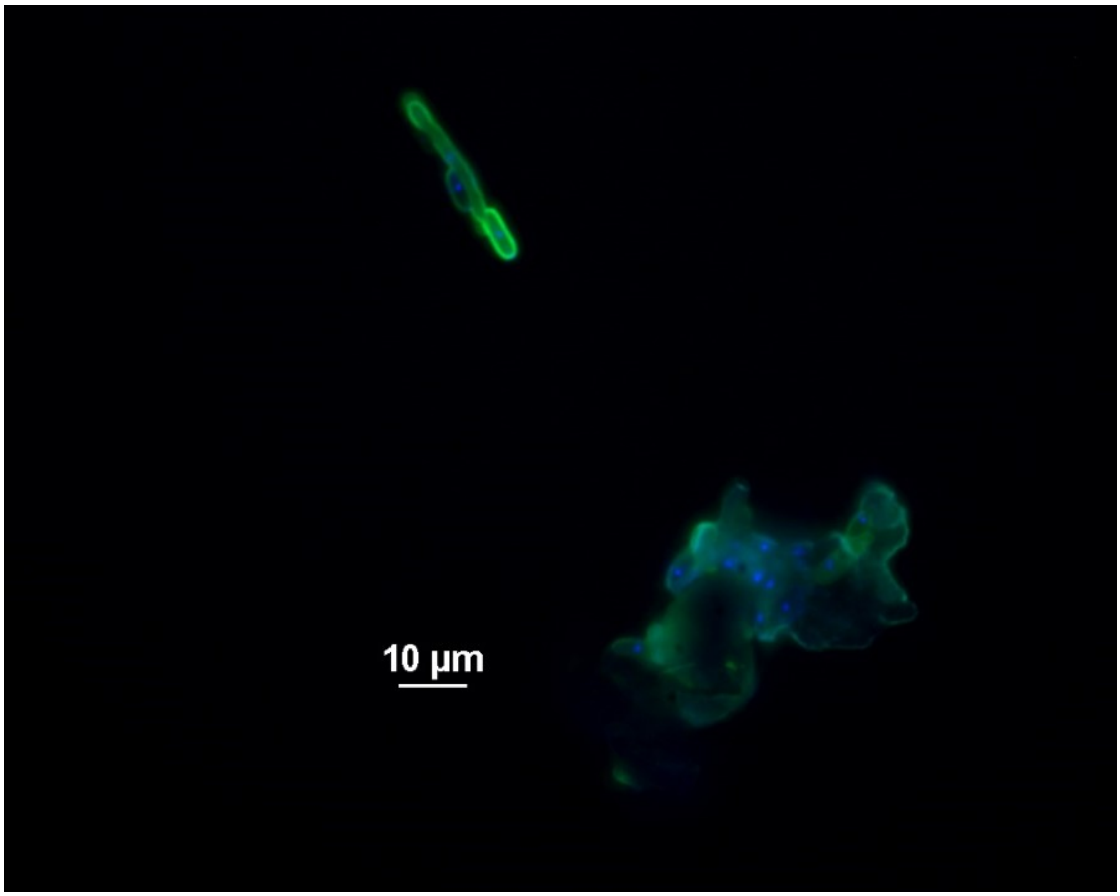
Modrá – bakteriální DNA, zelená – extracelulární polymerní substance.



Obrázek č. 32: Snímek biofilmu Candida albicans pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie.

Kvasinkový biofilm starý 120 hodin značený konjugátem konkavalin A-fluorescein isothiokyanát/Hoechst 33342.

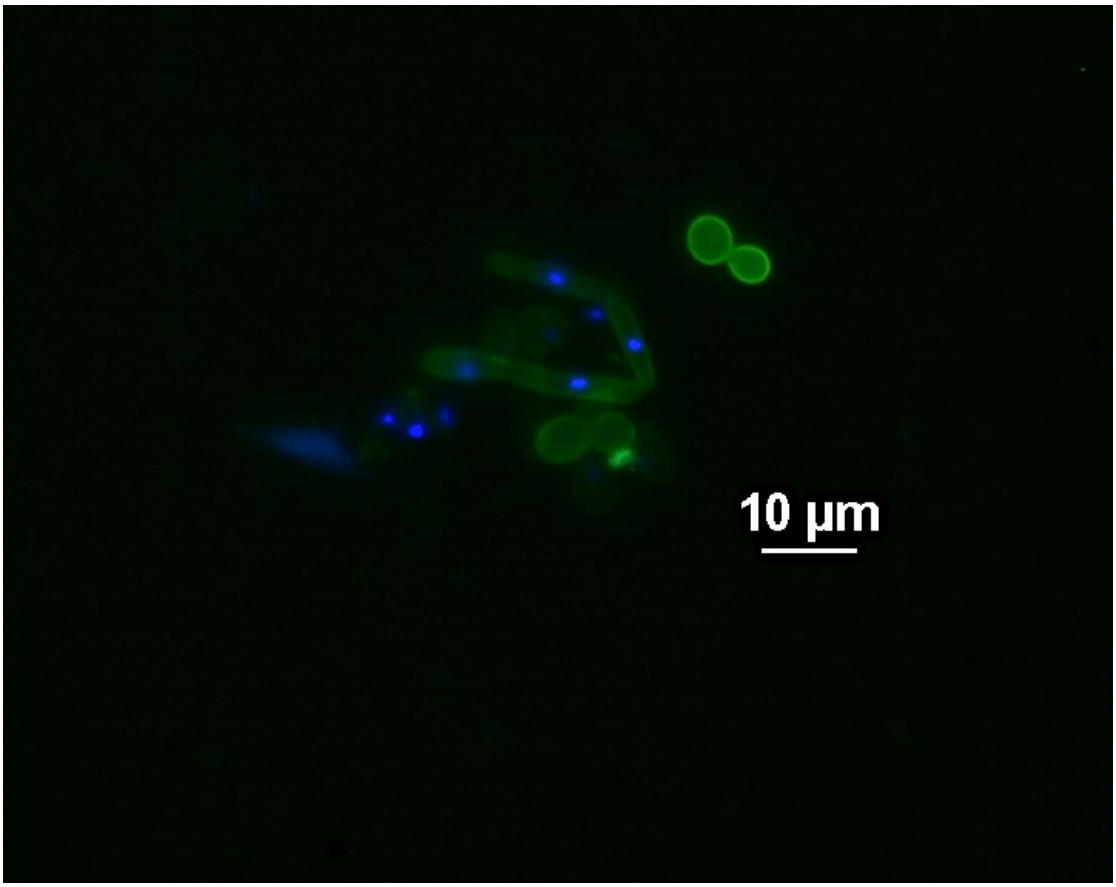
Modrá – jádra obsahující DNA, zelená – kvasinky a extracelulární polymerní substance.



Obrázek č. 33: Snímek biofilmu Candida krusei pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie.

Kvasinkový biofilm starý 120 hodin značený konjugátem konkavalin A-fluorescein isothiokyanát/Hoechst 33342.

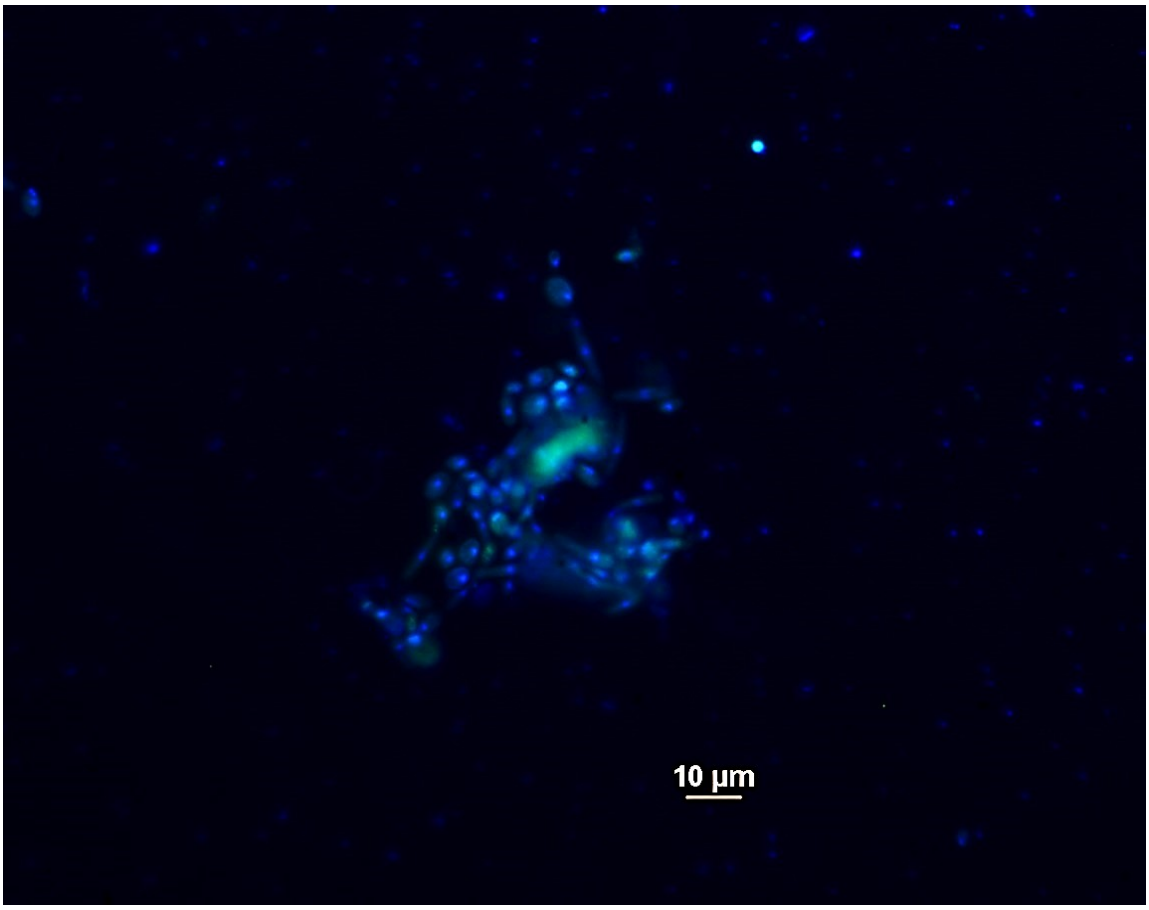
Modrá – jádra obsahující DNA, zelená – kvasinky a extracelulární polymerní substance. V horní části snímku lze vidět vláknitou formu kvasinky. Ve spodní části snímku by se mohlo jednat o shluk kvasinek i s částí extracelulární polymerní substance.



Obrázek č. 34: Snímek biofilmu Candida tropicalis pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie.

Kvasinkový biofilm starý 120 hodin značený konjugátem konkavalin A-fluorescein isothiokyanát/Hoechst 33342.

Modrá – jádra obsahující DNA, zelená – kvasinky (i vláknitá forma).



Obrázek č. 35: Snímek směsného preparátu biofilmů bakterie Staphylococcus epidermidis a kvasinky Candida tropicalis pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie.

Bakteriální a kvasinkový biofilm starý 120 hodin značený konjugátem konkavalin A-fluorescein isothiokyanát/Hoechst 33342.

Modrá – jádra kvasinek obsahující DNA a bakteriální DNA, zelená – buněčná stěna kvasinek.

8. ZÁVĚR

Mikrobiální biofilmy jsou velkou klinickou výzvou s ohledem na to, že až 80 % všech chronických infekcí se pojí právě s biofilm-formujícími mikroorganismy. Mikrobiální buněčné komplexní struktury označované jako biofilmy vykazují vysokou odolnost jednak vůči antibiotické terapii, jednak jsou také hůře eliminovány prostřednictvím imunitního systému hostitele.

Pracoviště, na kterém byla tato práce vypracována, se dlouhodobě věnuje testování antiinfekční aktivity nově syntetizovaných látek, včetně testování anti-biofilmové aktivity vybraných sloučenin. V rámci této výzkumné aktivity bylo zapotřebí nejen optimalizovat metodiky vedoucí k tvorbě robustních mikrobiálních biofilmů *in vitro*, ale také zavést metody pro vizualizaci biofilmů, které by mohly sloužit jakožto podklad pro studium efektivity v rámci anti-biofilmové aktivity kandidátních studovaných sloučenin.

Tato práce podává v teoretické části stručný přehled nejčastěji používaných metodických přístupů, které jsou voleny při studiu mikrobiálních biofilmů.

Experimentální část pojednává o přípravě preparátů obsahujících mikrobiální biofilmy pro následné hodnocení prostřednictvím fluorescenční mikroskopie.
Pro vizualizaci mikrobiálních biofilmů byly využity různé fluorescenční barvy v různých kombinacích, jmenovitě: Syto 9 v kombinaci s propidium jodidem a kalkofluorovou bělobou, dále pak konkavalin A-fluorescein isothiokyanát v kombinaci s kalkofluorovou bělobou a v poslední řadě konkavalin A-fluorescein isothiokyanát kombinovaný s Hoechst 33342. Metodika barvení biofilmů byla optimalizována prostřednictvím epifluorescenční mikroskopie. Nicméně do budoucna se počítá s využitím zavedené metodiky pro barvení mikrobiálních biofilmů s následnou vizualizací konfokální laserovou skenovací mikroskopii, která je vzhledem k prostorovému uspořádání biofilmů mnohem vhodnější.

9. POUŽITÉ ZKRATKY

AFM .....Atomic Force Microscopy, mikroskopie atomárních sil

CFU .....Colony Forming Units, kolonie tvořící jednotky

CLSM.....Confocal Laser Scanning Microscopy, konfokální laserová skenovací mikroskopie

ConA .....Concavalin A, konkavalin A

CV .....Crystal Violet, krystalová violeť

DMMB .....1,9-dimethyl-methylen blue, 1,9-dimethyl-methylenová modř

EPS.....Extracelullar Polymeric Substance, extracelulární polymerní substance

FCS.....Fluorescence Correlation Spectroscopy, fluorescenční korelační spektroskopie

FDA.....Fluorescein Diacetate, fluorescein diacetát

FITC.....Fluorescein Isothiocyanate, fluorescein isothiokyanát

FITC-Con A.....Fluorescein Isothiocyanate–Concavalin A, fluorescein isothiokyanát–konkavalin A

FLBA.....Fluorescence Lectin-Binding Analysis, analýza fluorescenční lektinové vazby

KTJ .....Kolonie Tvořící Jednotky

MTT .....3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid

PI.....Propidium Iodide, propidium jodid

SEM .....Skenovací Elektronová Mikroskopie

XTT.....2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-5-[(fenylamino) karbonyl]-2H-tetrazoliumhydroxid

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Biofilm kolonizující zubní sklovinu. 9
Obrázek č. 2: Kroky formování biofilmu. 10
Obrázek č. 3: Složení a jednotlivé molekulární komponenty extracelulární polymerní substance biofilmu. 13
Obrázek č. 4: Snímky z konfokální laserové skenovací mikroskopie mikrobiálních biofilmů tvořených na lidské dásni, značené různými lektiny. 15
Obrázek č. 5: Schéma kroků vedoucích ke stanovení počtu kolonie tvořících jednotek. 17
Obrázek č. 6: Stanovení počtu kolonie tvořících jednotek výsevovou metodou. 18
Obrázek č. 7: Metoda kvantifikace biofilmu formovaného v jamkách mikrotitrační destičky pomocí barvení krystalovou violetí. 22
Obrázek č. 8: Metoda kvantifikace biofilmu ve zkumavkách. 23
Obrázek č. 9: Snímek z konfokálního laserového skenovacího mikroskopu, biofilm bakterie *Vibrio cholerae*, barvený pomocí Syto 9. 24
Obrázek č. 10: Snímek pořízený pomocí fluorescenčního mikroskopu, bakterie *Klebsiella pneumoniae* barvená pomocí Syto 9/PI. 25
Obrázek č. 11: Provedení XTT testu. 26
Obrázek č. 12: Provedení MTT testu. 26
Obrázek č. 13: Metabolická přeměna resazurinu na resofurin. 27
Obrázek č. 14: Schématické znázornění kroků vedoucích k hodnocení resazurinového testu. . 28
Obrázek č. 15: Snímky ze světelné mikroskopie, histopatologie nosního polypu. 29
Obrázek č. 16: Snímek z konfokálního laserového skenovacího mikroskopu. 30
Obrázek č. 17: Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu. 31
Obrázek č. 18: Snímky z mikroskopie atomárních sil. 32
Obrázek č. 19: Fluorescenční spektrum barviva SYTO 9 a PI. 34
Obrázek č. 20: Fluorescenční spektrum barviva konkavalin A-fluorescein isothiokyanát. 37
Obrázek č. 21: Fluorescenční spektrum barviv konkavalin A-fluorescein isothiokyanát (FITC-ConA) a Hoechst 33342. 39
Obrázek č. 22: Snímek biofilmu bakterie *Staphylococcus epidermidis* pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie. 43
Obrázek č. 23: Snímek biofilmu kvasinky *Candida krusei* pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie. 44
Obrázek č. 24: Snímek biofilmu kvasinky *Candida krusei* pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie. 45

Obrázek č. 25: Snímek biofilmu kvasinky *Candida tropicalis* pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie. 46
Obrázek č. 26: Snímek biofilmu kvasinky *Candida tropicalis* pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie. 47
Obrázek č. 27: Snímek biofilmu kvasinky *Candida albicans* pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie 48
Obrázek č. 28: Snímek biofilmu kvasinky *Candida albicans* pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie. 49
Obrázek č. 29: Snímek biofilmu kvasinky *Candida krusei* pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie. 50
Obrázek č. 30: Snímek biofilmu kvasinky *Candida tropicalis* pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie. 51
Obrázek č. 31: Snímek biofilmu bakterie *Staphylococcus epidermidis* pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie. 52
Obrázek č. 32: Snímek biofilmu *Candida albicans* pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie. 53
Obrázek č. 33: Snímek biofilmu *Candida krusei* pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie... 54
Obrázek č. 34: Snímek biofilmu *Candida tropicalis* pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie. 55
Obrázek č. 35: Snímek směsného preparátu biofilmů bakterie *Staphylococcus epidermidis* a kvasinky *Candida tropicalis* pořízený pomocí fluorescenční mikroskopie. 56

11. POUŽITÁ LITERATURA

[1] BERLANGA, M., GUERRERO, R. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microbial Cell Factories* [online]. 2016, **15**(1) [cit. 2018-11-13]. DOI: 10.1186/s12934-016-0569-5. ISSN 1475-2859. Dostupné z: http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-016-0569-5

[2] *What are biofilms?* [online]. Live Science, 2016 [cit. 2018-12-03]. Dostupné z: https://www.livescience.com/57295-biofilms.html

[3] DONLAN, R. M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2001, **33**(8), 1387-1392 [cit. 2018-11-13]. DOI: 10.1086/322972. ISSN 1058-4838. Dostupné z: https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/322972

[4] SANTOS, A. L. S., GALDINO, A. C. M., MELLO, T. P., *et al*. What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective!. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online]. 2018, **113**(9) [cit. 2018-11-13]. DOI: 10.1590/0074-02760180212. ISSN 1678-8060. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762018000900200&lng=en&tlng=en

[5] FLEMMING, H. C., WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*[online]. 2010, **8**(9), 623-633 [cit. 2018-12-01]. DOI: 10.1038/nrmicro2415. ISSN 1740-1526. Dostupné z: http://www.nature.com/articles/nrmicro2415

[6] CHUNG, P. Y., TOH, Y. S. Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant Staphylococcus aureus. *Pathogens and Disease* [online]. 2014, **70**(3), 231-239 [cit. 2018-12-05]. DOI: 10.1111/2049-632X.12141. ISSN 2049632X. Dostupné z: https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/2049-632X.12141

[7] KOSTAKIOTI, M., HADJIFRANGISKOU, M., HULTGREN, S. J., *et al*. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2013, **3**(4), a010306-a010306 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1101/cshperspect.a010306. ISSN 2157-1422. Dostupné z: http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a010306

[8] DUNNE, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2002, **15**(2), 155-166 [cit. 2019-03-13]. DOI: 10.1128/CMR.15.2.155-166.2002. ISSN 0893-8512. Dostupné z: http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002

[9] AZEREDO, J., AZEVEDO, N. F., BRIANDET, R., *et al*. Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2016, **43**(3), 313-351 [cit. 2018-12-05]. DOI: 10.1080/1040841X.2016.1208146. ISSN 1040-841X. Dostupné z: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1040841X.2016.1208146

[10] DAS, T., SHARMA, P. K., KROM, B. P., *et al*. Role of eDNA on the Adhesion Forces between Streptococcus mutans and Substratum Surfaces: Influence of Ionic Strength and Substratum Hydrophobicity. *Langmuir* [online]. 2011, **27**(16), 10113-10118 [cit. 2018-12-05]. DOI: 10.1021/la202013m. ISSN 0743-7463. Dostupné z: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la202013m

[11] FLETCHER, M. The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 1977, **23**(1), 1-6 [cit. 2019-02-10]. DOI: 10.1139/m77-001. ISSN 0008-4166. Dostupné z: http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/m77-001

[12] ADAV, S. S., LEE, D. J. Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2008, **154**(1-3), 1120-1126 [cit. 2018-12-01]. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.11.058. ISSN 03043894. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389407016226

[13] CHU, H., YU, H., TAN, X., *et al*. Extraction procedure optimization and the characteristics of dissolved extracellular organic matter (dEOM) and bound extracellular organic matter (bEOM) from Chlorella pyrenoidosa. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*[online]. 2015, **125**, 238-246 [cit. 2018-12-06]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.08.007. ISSN 09277765. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776514004299

[14] COMTE, S., GUIBAUD G., BAUDU, M., *et al*. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2006, **38**(1-2), 237-245 [cit. 2018-12-05]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.06.016. ISSN 01410229. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022905002644

[15] PAN, X. LIU, J., ZHANG, D., *et al*. A comparison of five extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) from biofilm by using threedimensional excitation-emission matrix (3DEEM) fluorescence spectroscopy. *Water SA* [online]. 2010, **36**(1) [cit. 2018-12-06]. DOI: 10.4314/wsa.v36i1.50914. ISSN 0378-4738. Dostupné z: http://www.ajol.info/index.php/wsa/article/view/50914

[16] NEU, T. R., LAWRENCE, J. R. Investigation of Microbial Biofilm Structure by Laser Scanning Microscopy. MUFFLER, Kai a Roland ULBER, ed. *Productive Biofilms* [online].

Cham: Springer International Publishing, 2014, 2014-5-20, s. 1-51 [cit. 2018-12-06]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. DOI: 10.1007/10_2014_272. ISBN 978-3-319-09694-0. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/10_2014_272

[17] *Lectin from Concanavalin A (Canavalia ensiformis) FITC Labeled* [online]. Sigma-Aldrich [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c7642pis.pdf

[18] MARCHAL, M., BRIANDET, R., HALTER, D., *et al*. Subinhibitory Arsenite Concentrations Lead to Population Dispersal in Thiomonas sp. *PLoS ONE* [online]. 2011, **6**(8) [cit. 2018-12-05]. DOI: 10.1371/journal.pone.0023181. ISSN 1932-6203. Dostupné z: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0023181

[19] TAWAKOLI, P. N., NEU, T. R., BUSCK, M. M., *et al*. Visualizing the dental biofilm matrix by means of fluorescence lectin-binding analysis. *Journal of Oral Microbiology* [online]. 2017, **9**(1) [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1080/20002297.2017.1345581. ISSN 2000-2297. Dostupné z: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20002297.2017.1345581

[20] DANIELS, K. J., PARK, Y. N., SRIKANTHA, T., *et al*. Impact of Environmental Conditions on the Form and Function of Candida albicans Biofilms. *Eukaryotic Cell* [online]. 2013, **12**(10), 1389-1402 [cit. 2018-12-06]. DOI: 10.1128/EC.00127-13. ISSN 1535-9778. Dostupné z: http://ec.asm.org/lookup/doi/10.1128/EC.00127-13

[21] HOCHBAUM, A. I., KOLODKIN-GAL, I., FOULSTON, L., *et al*. Inhibitory Effects of D-Amino Acids on Staphylococcus aureus Biofilm Development. *Journal of Bacteriology* [online]. 2011, **193**(20), 5616-5622 [cit. 2018-11-10]. DOI: 10.1128/JB.05534-11. ISSN 0021-9193. Dostupné z: http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.05534-11

[22] LI, L., MENDIS, N., TRIGUI, H., *et al*. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2014, **5** [cit. 2018-12-05]. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00258. ISSN 1664-302X. Dostupné z: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00258/abstract

[23] OLIVEIRA, F., LIMA, C. A., BRÁS, S., *et al*. Evidence for inter-and intraspecies biofilm formation variability among a small group of coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2015, **362**(20) [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1093/femsle/fnv175. ISSN 1574-6968. Dostupné z: https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1093/femsle/fnv175

[24] STIEFEL, P., SCHMIDT-EMRICH S., REN, Q., *et al*. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology*[online]. 2015, **15**(1) [cit. 2018-11-13]. DOI: 10.1186/s12866-015-0376-x. ISSN 1471-2180. Dostupné z: http://www.biomedcentral.com/1471-2180/15/36

[25] *MICROBIAL GROWTH AND CONTROL: Growth of Bacterial Cultures, Growth Curve and Measurement of Microbial growth* [online]. nptel.ac.in [cit. 2018-12-14]. Dostupné z: https://nptel.ac.in/courses/102103015/module5/lec1/5.html

[26] BOS, R., VAN DER MEI, H.C., BUSSCHER, H. J., *et al*. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*[online]. 1999, **23**(2), 179-230 [cit. 2018-12-07]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00396.x. ISSN 1574-6976. Dostupné z: https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00396.x

[27] BUSSCHER, H. J., VAN DER MEI, H. C. Microbial Adhesion in Flow Displacement Systems. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2006, **19**(1), 127-141 [cit. 2018-12-06]. DOI: 10.1128/CMR.19.1.127-141.2006. ISSN 0893-8512. Dostupné z: http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.19.1.127-141.2006

[28] SJOLLEM, J., BUSSCHER, H. J., WEERKAMP, A. H., *et al*. Experimental approaches for studying adhesion of microorganisms to solid substrata: applications and mass transport. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 1989, **9**(2), 79-90 [cit. 2018-11-14]. DOI: 10.1016/0167-7012(89)90058-4. ISSN 01677012. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167701289900584

[29] SZLAVIK, J., PAIVA, D. S., MØRK, N., *et al*. Initial adhesion of Listeria monocytogenes to solid surfaces under liquid flow. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2012, **152**(3), 181-188 [cit. 2018-11-14]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.006. ISSN 01681605. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160511005241

[30] SIM, S.T.V., SUWARNO, S. R., CHONG, T. H., *et al*. Monitoring membrane biofouling via ultrasonic time-domain reflectometry enhanced by silica dosing. *Journal of Membrane Science* [online]. 2013, **428**, 24-37 [cit. 2018-11-11]. DOI: 10.1016/j.memsci.2012.10.032. ISSN 03767388. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738812007764

[31] CHRISTENSEN, G. D., SIMPSON, W. A., YOUNGER, J. J., *et al.* "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* vol. 22,6 (1985): 996-1006, [cit. 2018-12-06].

[32] PEETERS, E., NELIS, H. J., COENYE, T., *et al*. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2008, **72**(2), 157-165 [cit. 2018-12-01]. DOI:

10.1016/j.mimet.2007.11.010. ISSN 01677012. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701207003909

[33] OMMEN, P., ZOBEK, N., MEYER, L. R., *et al*. Quantification of biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2017, **141**, 87-89 [cit. 2018-12-07]. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.08.003. ISSN 01677012. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701217302117

[34] HASSAN, A., USMAN, J., KALEEM, F., *et al*. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*[online]. 2011, **15**(4), 305-311 [cit. 2018-12-06]. DOI: 10.1590/S1413-86702011000400002. ISSN 1413-8670. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702011000400002&lng=en&nrm=iso&tlng=en

[35] MARTHUR, T., SINGHAL, S., KHAN, S., *et al*. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol*. 2006 Jan; 24(1): 25-9 [cit. 2018-12-14].

[36] TRIVEDA, L., GOMATHI, S. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Enterococci: An evaluation of three different screening methods. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [online]. 2016, **5**(3), 643-650 [cit. 2018-12-05]. DOI: 10.20546/ijcmas.2016.503.075. ISSN 23197692. Dostupné z: http://www.ijcmas.com/abstractview.php?ID=252&vol=5-3-2016&SNo=75

[37] *Vibrio cholerae Biofilms* [online]. Karatan Lab [cit. 2018-12-03]. Dostupné z: http://www.appstate.edu/~karatane/vibrio_biofilms.html

[38] STOCKS, S. M. Mechanism and use of the commercially available viability stain,BacLight. *Cytometry* [online]. 2004, **61A**(2), 189-195 [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.1002/cyto.a.20069. ISSN 0196-4763. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.20069

[39] JENKINS, J., NOBBS, A. H., VERKADE, P., *et al*. Characterisation of bactericidal titanium surfaces using electron microscopy. *Mycroscopy and analysis* [online]. 2018 [cit. 2018-12-06]. Dostupné z: https://microscopy-analysis.com/blog/blog-articles/characterisation-bactericidal-titanium-surfaces-using-electron-microscopy

[40] *Nacalai Tesque: Cell Count Reagent SF* [online]. [cit. 2019-04-14]. Dostupné z: https://www.nacalai.co.jp/global/download/pdf/Cell_Count_Reagent.pdf

[41] SHOKRZADEH, M., MODANLOO, M. An overview of the most common methods for assessing cell viability. *Journal of Research in Medical and Dental Science* [online].

2017, **5**(2) [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.5455/jrmds.2017526. ISSN 2347-2545. Dostupné z: http://www.ejmanager.com/fulltextpdf.php?mno=271430

[42] *Resazurin Cell Viability Assay* [online]. creative-bioarray.com [cit. 2018-12-14]. Dostupné z: https://www.creative-bioarray.com/support/resazurin-cell-viability-assay.htm

[43] *Cell-Quant™ AlamarBlue Cell Viability Reagent* [online]. genecopoeia.com [cit. 2018-12-03]. Dostupné z: https://www.genecopoeia.com/product/cell-quant-alamarblue-cell-viability-reagent/

[44] HOCHSTIM, Ch. J., CHOI, J. Y., LOWE, D., *et al*. Biofilm Detection With Hematoxylin-Eosin Staining. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* [online]. 2010, **136**(5) [cit. 2019-02-12]. DOI: 10.1001/archoto.2010.62. ISSN 0886-4470. Dostupné z: http://archotol.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archoto.2010.62

[45] OATES, A., BOWLING, F. L., BOULTON, A. J. M., *et al*. The Visualization of Biofilms in Chronic Diabetic Foot Wounds Using Routine Diagnostic Microscopy Methods. *Journal of Diabetes Research* [online]. 2014, 1-8 [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.1155/2014/153586. ISSN 2314-6745. Dostupné z: http://www.hindawi.com/journals/jdr/2014/153586/

[46] TÓTH, L., CSOMOR, P., SZIKLAI, I., *et al*. Biofilm detection in chronic rhinosinusitis by combined application of hematoxylin-eosin and gram staining. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* [online]. 2011, **268**(10), 1455-1462 [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.1007/s00405-011-1623-x. ISSN 0937-4477. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s00405-011-1623-x

[47] WINTHER, B., GROSS, B. C., HENDLEY, J. O., *et al*. Location of Bacterial Biofilm in the Mucus Overlying the Adenoid by Light Microscopy. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* [online]. 2009, **135**(12) [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.1001/archoto.2009.186. ISSN 0886-4470. Dostupné z: http://archotol.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archoto.2009.186

[48] DE CARVALHO, C. C. C. R., Manuela, M., DA FONSECA, R., *et al*. Assessment of three-dimensional biofilm structure using an optical microscope. *BioTechniques* [online]. 2007, **42**(5), 616-620 [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.2144/000112403. ISSN 0736-6205. Dostupné z: https://www.future-science.com/doi/10.2144/000112403

[49] RICHARDSON, N., MORDAN, N. J., FIGUEIREDO, J. A. P., *et al*. Microflora in teeth associated with apical periodontitis: a methodological observational study comparing two protocols and three microscopy techniques. *International Endodontic Journal* [online]. 2009, **42**(10), 908-921 [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.1111/j.1365-2591.2009.01594.x. ISSN 01432885. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2591.2009.01594.x

[50] BRIDIER, A., DUBOIS-BRISSONNET, F., BOUBETRA, A., *et al*. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2010, **82**(1), 64-70 [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.04.006. ISSN 01677012. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701210001363

[51] VILA, T., FONSECA, B. B., DOS SANTOS, G. R., *et al*. *LS-8-P-3502 An extended analysis of the extracellular matrix of Candida albicans biofilms extracted during sample preparation process* [online]. [cit. 2019-02-18]. Dostupné z: http://www.microscopy.cz/html/3502.html

[52] HANNIG, C., FOLLO, M., HELLWIG, E., *et al*. Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2009, **59**(1), 1-7 [cit. 2019-01-23]. DOI: 10.1099/jmm.0.015420-0. ISSN 0022-2615. Dostupné z: http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.015420-0

[53] BOYD, C. D., SMITH, T. J., EL-KIRAT-CHATEL, S., *et al*. Structural Features of the Pseudomonas fluorescens Biofilm Adhesin LapA Required for LapG-Dependent Cleavage, Biofilm Formation, and Cell Surface Localization. *Journal of Bacteriology* [online]. 2014, **196**(15), 2775-2788 [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.1128/JB.01629-14. ISSN 0021-9193. Dostupné z: http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.01629-14

[54] *Spectra viewer* [online]. Thermofisher.com [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/order/spectra-viewer

[55] *18909 Calcofluor White Stain* [online]. Sigma-Aldrich [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/18909dat.pdf

[56] *Fluorescence SpectraViewer* [online]. Thermofisher.com [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?SID=srch-svtool&UID=2761old_2

[57] *Hoechst 33342* [online]. Thermofisher.com [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?id=man0011717&version=a.0&pdfurl=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011717_Hoechst_33342_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogIEhvZWNoc3QgMzMzNDI