

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

OPTIMALIZACE RŮSTOVÝCH PODMÍNEK PRO TVORBU BAKTERIÁLNÍHO BIOFILMU

Bc. Veronika Rošková

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Michaela Hympánová

HRADEC KRÁLOVÉ, 2022

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Michaele Hympánové, za veškerou péči a trpělivost, kterou mi poskytla. Dále bych ráda poděkovala svému vedoucímu PharmDr. Miroslavu Kovaříkovi, Ph.D. za pomoc se zpracováním a vůbec za umožnění vypracování práce v Centru biomedicínského výzkumu.

V neposlední řadě mé díky patří rodině, bez jejíž podpory bych tuto práci nikdy nemohla psát.

„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 15/5/2022

Veronika Rošková

1. OBSAH

2.	ABSTRAKT	6
3.	ABSTRACT	8
4.	ÚVOD	10
5.	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	11
6.	TEORETICKÁ ČÁST	12
6.1	Bakteriální biofilm	12
6.1.1	Výskyt bakteriálního biofilmu	13
6.1.2	Tvorba a složení biofilmu	13
6.1.3	Quorum Sensing	17
6.1.4	Faktory ovlivňující tvorbu biofilmu	18
6.2	Bakterie tvořící biofilm	19
6.2.1	Biofilm kmene <i>Staphylococcus aureus</i>	20
6.3	Modely pro sledování biofilmu	21
6.3.1	Uzavřené modely	21
6.3.2	Otevřené modely	22
6.3.3	Mikrokosmy	23
6.4	Metody detekce a kvantifikace bakteriálního biofilmu	24
6.4.1	Fyzikální metody stanovení	24
6.4.2	Chemické metody stanovení	24
6.4.3	Mikroskopické metody	25
7.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
7.1	Použitý biologický materiál	27
7.2	Použité chemikálie a materiál	27
7.3	Technické vybavení	28
7.4	Metodika	28
7.4.1	Zásady práce s bakteriální suspenzí	28
7.4.2	Optimalizace metodiky AlamarBlue	28
7.4.3	Kalibrační křivka závislosti AlamarBlue na množství bakterií	31
7.4.4	Stanovení přesného CFU/ml pomocí vysazení na agar	33

7.4.5	Růst biofilmu	33
7.4.6	Statistické zpracování dat	34
8.	VÝSLEDKY.....	35
8.1	Optimalizace metodiky s AlamarBlue	35
8.2	Kalibrační křivka závislosti AB na množství bakterií.....	36
8.3	Stanovení tvorby biofilmu.....	40
8.3.1	Tvorba biofilmu kmeny <i>S. aureus</i> a meticilin-rezistentní <i>S. aureus</i>	40
8.3.2	Vliv doby inkubace na tvorbu biofilmu	41
8.3.3	Vliv kultivačního média na tvorbu biofilmu	42
8.3.4	Vliv povrchového substrátu na tvorbu biofilmu	43
9.	DISKUSE	45
10.	ZÁVĚR	48
11.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	49
12.	SEZNAM TABULEK	51
13.	SEZNAM OBRÁZKŮ	52
14.	SEZNAM GRAFŮ.....	53
15.	POUŽITÁ LETERATURA.....	54

2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Autor: Bc. Veronika Rošková

Školitel: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Michaela Hympánová

Diplomová práce

Název: Optimalizace růstových podmínek pro tvorbu bakteriálního biofilmu

Studijní obor: Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Úvod: Biofilm je nejstabilnější formou života bakterií. Jde o strukturu, ve které jsou jednotlivé bakterie chráněny před okolními vlivy, a navíc v nich dochází ke změně fyziologie, díky které jsou bakterie schopny přežít při nevyhovujících podmínkách. Z tohoto důvodu je obtížné biofilmy odstranit a stávají se hrozbou pro okolní svět. Mezi nejobávanější patogeny tvořící biofilm patří např. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

Cíl práce: Cílem práce bylo porovnat a optimalizovat růstové podmínky bakteriálního biofilmu *S. aureus* a jeho meticilin-rezistentní varianty. Pozorován byl vliv třech rozdílných kultivačních médií s různým stupněm výživnosti, dále vliv třech různých povrchů a dvou dob inkubace.

Metody: Pro stanovení nárůstu biofilmu dvou bakteriálních kmenů *S. aureus* byla využita metodika AlamarBlue (AB). Jde o oxidoredukční indikátor metabolické přeměny. Barevná přeměna média indikuje utilizaci chemické látky vitálními bakteriemi. Nárůst biofilmu byl sledován v mikrotitrační destičce opatřené Calgary biofilm device systémem, za obměňování kultivačních podmínek. Spektrofotometricky jsme následně stanovili nárůsty a jejich rozdíly statisticky zpracovali v programu GraphPad.

Výsledky: Pro kvantifikaci biofilmu byla optimalizována AB metodika a byly stanoveny kalibrační křivky závislosti redukce AB na množství bakterií. Množství bakterií v biofilmu formovaném na povrchu s Hydroxyapatitem (HA) a oxidem titaničitým (TiO₂) se pohybovalo v rozmezí $1,26 \times 10^7$ – $2,70 \times 10^8$ CFU/ml.

Závěr: Nárůsty biofilmu byly rychlé a markantní za všech experimentálních kultivačních podmínek kromě situace s využitím čistě plastového povrchu. Nejlepší nárůst biofilmu *S. aureus* byl po 24 hodinách ve vysoce výživném bujónu z mozkosrdcové infúze na povrchu hrotů s hydroxyapatitem. Růst za těchto podmínek považujeme tedy za optimální.

Klíčová slova: Tvorba biofilmu; Biofilm; *Staphylococcus aureus*; Calgary biofilm device

3. ABSTRACT

Author: Bc. Veronika Rošková

Supervisor: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Consultant: Mgr. Michaela Hympánová

Title: Optimisation of growth conditions for bacterial biofilm forming

Diploma Thesis

Study program: Bioanalytical laboratory diagnostics in healthcare

Introduction: Biofilm is the most stable living form of bacteria. Bacteria are changing their physiology during the process of biofilm formation, so they are becoming more protected from the environmental factors. This protection leads to higher survivability in hostile conditions and higher resistance against chemical or mechanical treatment. One of the most common bacteria with the ability to produce biofilm and which causes persistent infections is *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

Objectives: The diploma thesis has its aim at comparing biofilm growth of *S. aureus* and his methicillin-resistant variant under different conditions. We observed biofilm formation in three different broths with different level of nutrition, three different types of surfaces and two different times of incubation.

Methods: The microplate AlamarBlue (AB) assay was used for quantification of biofilm formation. AB is a redox indicator, which changes its colour when it is metabolised by bacteria. The colour change was observed spectrophotometrically, and statistically analyzed with GraphPad.

Results: The AB assay was optimised for biofilm quantification. The calibration curves of AB dependence on bacterial density were established. Biofilms formed on hydroxyapatite (HA) and Titanium dioxide (TiO₂) surfaces contained between 1.26×10^7 to 2.70×10^8 CFU/ml.

Conclusion: The biofilm formation was strong and quick under all experimental conditions besides the situation of a smooth plastic surface. The best growth of *S. aureus*

biofilm was observed after 24 hours of incubation in Brain heart infusion broth on a hydroxyapatite-coated Calgary biofilm device. Therefore, we considered these conditions to be optimal for biofilm growth of *S. aureus*.

Keywords: Biofilm formation; Biofilm; *Staphylococcus aureus*; Calgary biofilm device

4. ÚVOD

Bakterie jsou všudypřítomné prokaryotní mikroorganismy, které jsou schopné pozitivně i negativně ovlivnit různé procesy v každodenním životě, medicíně a průmyslu. K boji proti negativnímu působení bakterií jsou používány různé chemické a fyzikální metody, vůči kterým se bakterie naopak snaží bránit. Jedním z obranných mechanismů je tvorba velmi odolné biofilmové formy. Zavedené antimikrobiální látky pak nemusí vykazovat dostatečnou účinnost proti odolnému biofilmu v koncentracích běžně efektivních vůči planktonním bakteriím. Proto je v posledních letech kladen důraz právě na stanovení antibiofilmové aktivity antimikrobiálních látek, pro což prozatím neexistuje standardní metodika. Pro testování jsou využívány vhodné optimalizované biofilmové modely s cílem vytvořit model, který se bude co nejvíce podobat reálnému biofilmu. Zároveň se studují faktory ovlivňující tvorbu této 3D struktury. V rámci popsané problematiky jsme v této práci sledovali faktory ovlivňující tvorbu biofilmu *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), s cílem optimalizovat biofilmový model tohoto kmene. Získaný model může být následně využit k dalšímu výzkumu, např. v rámci testování nových antimikrobních látek.

5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této práce byla optimalizace růstových podmínek pro tvorbu bakteriálního biofilmu *S. aureus*. V rámci práce byly sledovány tři hlavní faktory, u kterých byl předpoklad k ovlivnění formování biofilmu.

Za prvé se jednalo o kultivační médium, které bylo zastoupeno třemi vhodnými živnými bujóny. Za druhé byl pozorován vliv povrchu, na kterém se biofilm tvořil - použity byly tři vhodné povrchové substráty, které jsou dostupné v rámci komerčního kitu pro tvorbu biofilmu. Za třetí byl sledován vliv doby inkubace. Zároveň jsme pozorovali tvorbu biofilmu při zvolených růstových podmínkách u dvou bakteriálních kmenů tvořících biofilm: *S. aureus* a meticilin-rezistentní *S. aureus*.

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Bakteriální biofilm

Biofilmem nazýváme společenství bakterií přisedlé na pevném podkladu. To, že jde o bakteriální strukturu, odhalil Antoni van Leeuwenhoek pod svým světelným mikroskopem roku 1683 (Vestby et al. 2020). V dnešní době podléhá biofilm důkladnějšímu zkoumání s využitím moderních mikroskopických a molekulárně genetických metod (Azeredo et al. 2017).

Soužití v biofilmu je pro bakterie výhodné, především proto, že jsou v této formě chráněny před okolními vlivy. Extracelulární matrix, produkovaná bakteriemi uvnitř biofilmu, zamezuje vnějším látkám proniknout do jeho nitra v dostatečné koncentraci. Bakterie se také může uvnitř biofilmu nacházet v tzv. perzistentním stavu, kdy dochází k epigenetické změně fenotypu do neaktivního stavu, díky čemuž jsou bakterie schopny přežít nevyhovující podmínky. Dalším způsobem obrany, který může bakteriím v biofilmu dopomoci k přežití, je systém toxin-antitoxin. Zaznamenají-li bakterie přítomnost antimikrobiální látky, vyloučí toxin, jímž okamžitě zablokují místo jejich účinku. Po odeznění „nebezpečí“ vyloučí antitoxin a tím se receptor opět odhalí (Lopez et al. 2010; Kopecká a Melter 2020).

Imunitní systém se naopak snaží proti biofilmu bojovat, a tak tvoří proti jeho antigenům protilátky. To má ale spíše negativní dopad, jelikož protilátky nedokáží bakterie v biofilmu přesně zasáhnout a vzniklé imunokomplexy narušují zdravé tkáně v okolí. Skrz polymerovou matrix do biofilmů často neproniknou v dostatečné koncentraci ani antibiotika ani chemické biocidy (Costerton et al. 1999).

Biofilm je díky všem těmto mechanismům velmi stálý a až 1000x rezistentnější k antimikrobiálním přípravkům nežli planktonní (tedy volně se pohybující) bakterie. Dále jsou bakterie v biofilmu chráněny před UV zářením či změnami pH. Pro účinnou eliminaci je tedy potřeba odstranit celou biofilmovou strukturu (Němcová 2008).

6.1.1 Výskyt bakteriálního biofilmu

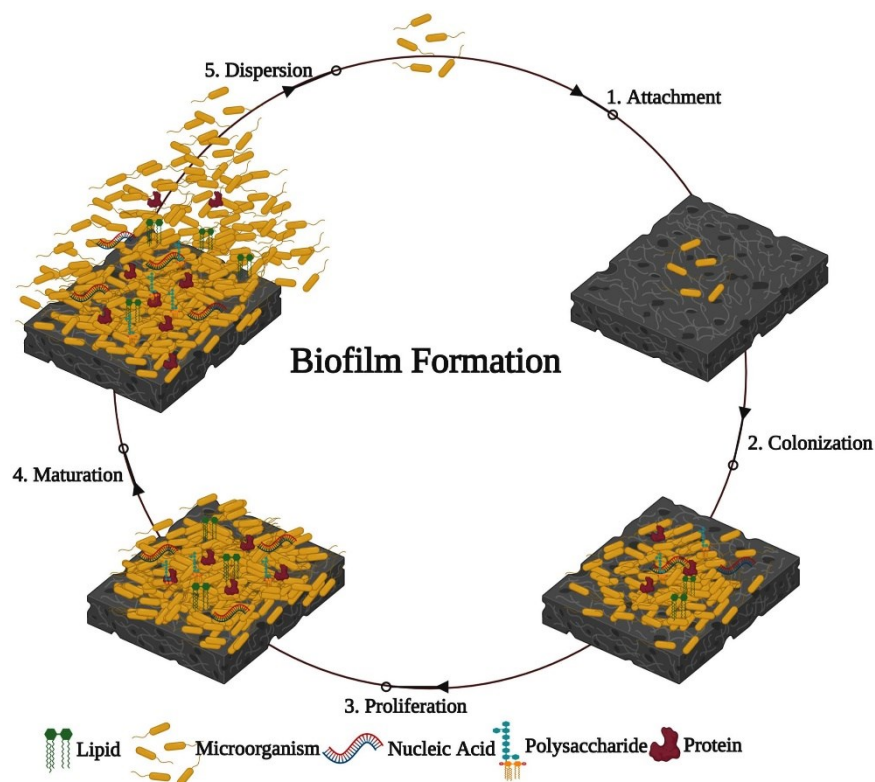
Biofilmy se vyskytují na rozhraní dvou fází. Nejčastěji se jedná o rozhraní pevné a kapalné, v přírodě tedy typicky na materiálech omývaných vodou, jak sladkou, tak slanou. Kromě kamenů v řece můžeme vyjmenovat například trup lodí, mola či potrubí. Dále na rozhraní mezi plynou a pevnou fází a to typicky u plicních infekcí či rozhraní mezi kapalnou a plynnou fází, které je prezentováno třeba jako bakteriální povlak na hladinách znečištěných vod (Rulík a Holá 2012).

V medicíně se biofilm nejčastěji vyskytuje na implantovaných náhradách (chlupní, kloubů, cév), katetrech či nekrotizovaných tkáních. Bývá příčinou chronických bakteriálních infekcí (například infekcí dýchacích cest při cystické fibróze). Při těchto typech infekcí jsou nutné opakované antibiotické zásahy. Po užití antibiotik dochází k odeznění příznaků na základě usmrcení cirkulujících forem bakterií, následně se ale z biofilmu uvolňují další bakterie a nastává relaps. Biofilm se také podílí na korozi medicínských nástrojů, či na špatném odvodu tepla.

Nelze naopak opomenout pozitivní aspekt biofilmů a to jejich využívání v průmyslových závodech při spotřebě xenobiotik (např. polutantů) (Němcová 2008; Sochorová 2010; Costerton et al. 1999).

6.1.2 Tvorba a složení biofilmu

Biofilm se tvoří nejlépe na vlhkých drsných plochách, kde je dostupné velké množství živin. Snadněji se tvoří na plochách hydrofobních (plast) než hydrofilních (sklo). (Němcová 2008; Costerton et al. 1999) Jeho vznik se dělí do několika fází, které jsou vyobrazeny na obrázku 1.



Obrázek 1 - Jednotlivé fáze tvorby biofilmu (Srinivasan et al. 2021)

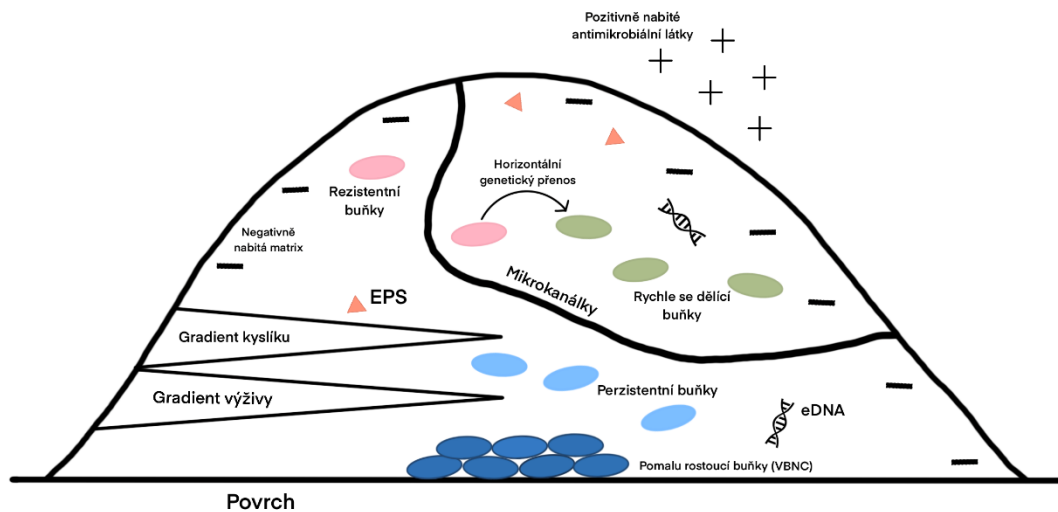
Prvním krokem vzniku biofilmu je adheze, kdy dochází k reverzibilnímu přisednutí jednotlivých bakterií k povrchu. Z této fáze se mohou bakterie stále jednoduše navrátit do planktonické formy. Adheze bakterií záleží na jejich pohybu (pasivní transport tekutinou či aktivní transport za pomoci bičků), na jejich vnějším náboji (zeta potenciálu), produkci extracelulárních polymerů (zejména přítomnost adhezínů) a fyzikálně-chemických reakcích (van der Waalsovy či elektrostatické síly). Adheziny ve formě fimbrií specificky váží mono i oligosacharidy, tím dochází na materiálu nejdříve ke vzniku jedné vrstvy biofilmu, která postupným dělením nabývá 3D struktury za vzniku mikrokolonií. Následná maturace vede ke vzniku tzv. „zralého“ biofilmu. Posledním krokem biofilmového cyklu je disperze, tedy opětovné odtrhávání částí biofilmu, na základě tlaku cirkulující vody, produkce látek podporujících degradaci nebo odumírání bakterií v biofilmu. Volné bakterie jsou následně připraveny utvářet biofilm na jiném území (Němcová 2008; Rulík a Holá 2012).

Za adhezi jsou zodpovědné především skupiny povrchových proteinů. První povrchový protein byl odhalen u kmene *S. aureus* vyvolávajícího mastitidy krav. Šlo o protein Bap (Biofilm associated protein). Po analýze primární sekvence Bap, byla

zjištěna strukturální podobnost s proteiny v buněčné stěně gram-pozitivních bakterií. Také bylo zjištěno, že přidání vápníkových iontů do média blokuje schopnost tvorby biofilmu. Geny pro Bap byly nalezeny i u dalších stafylokoků. Homology Bap nalezené u jiných kmenů jsou například BapA, Esp či LapA. U lidských typů *S. aureus* ale Bap chybí (Sochorová 2010).

Bakterie v různých hloubkách biofilmu mění svou genetickou expresi, na základě gradientu kyslíku a výživy. Ve spodních vrstvách biofilmu se tedy nachází buňky v klidovém stadiu či pomalu rostoucí. Naopak na povrchu, kde je přístup živin a kyslíku, jsou buňky aktivně se dělící. Celkově tedy biofilmy oproti planktonické formě bakterií omezují svou rychlost dělení v zájmu větší odolnosti (Dopitová 2015). Biofilm v sobě tvoří mikrokánálky, které zajišťují cirkulaci živin a odvádění metabolitů. Díky molekulární genetice bylo odhaleno, že po prvních dvou fázích, tedy po adhezi a vzniku mikrokolonií, dochází k aktivaci genů specifických pro biofilm. Genů zodpovědných za zástavu tvorby bičíků či za vznik polysacharidové matrix.

Polysacharidová matrix se skládá ze směsi extracelulárních polymerních látek (EPS), které zajišťují soudržnost biofilmu. Kromě neutrálních či polyanionických polysacharidů, které sdružováním s dvojmocnými ionty vytváří polymerní vlákna a stavebních či enzymatických proteinů, má v matrixu nezastupitelnou roli i extracelulární nukleová kyselina (eDNA). Role eDNA je stále spekulativní. Dříve se zdálo, že jde pouze o derivovanou genomovou DNA z lyzovaných buněk, ale bylo prokázáno, že v sobě ukrývá i části odlišné od nukleární DNA. Jelikož vytváří mřížkovitou strukturu, podél které se přenáší elektrony, diskutuje se i o její strukturální roli (Rulík a Holá 2012; Flemming et al. 2007). Schematické znázornění jednotlivých složek biofilmu je zobrazené na obrázku 2.



Obrázek 2 - Složení biofilmu (vlastní zpracování podle (Dominguez-Benetton 2007; Rapacka-Zdonczyk et al. 2021))

Složení produkovaného EPS se různí dle bakteriální podstaty biofilmu, prostředí, ve kterém se tvoří a v rámci jednoho biofilmu i dle hloubky, ve které se produkující bakterie nachází. Bylo například prokázáno, že s hloubkou biofilmu stoupá koncentrace polysacharidů (Němcová 2008; Lopez et al. 2010; Costerton et al. 1999).

Zformovaný biofilm je z 97 % tvořen porézními či absorbujícími látkami, které do sebe inkorporují velké množství vody, díky čemuž dochází k výraznému usnadnění přísunu živin (Ghazay a Bukhari 2020).

Struktura biofilmu má schopnost do určité míry filtrovat antimikrobiální látky. EPS brzdí elektrostatickými a hydrofobními interakcemi průnik antimikrobiálních látek k buňkám, navíc EPS obsahuje degradativní enzymy jako například beta-laktamázy. K buňkám, které jsou tedy hlouběji v biofilmu, se skrz tyto mechanismy dostává subletální koncentrace antimikrobiálních látek a zároveň jsou bakterie v této situaci schopny aktivovat obranné mechanismy, jako je produkce určitých enzymů (superoxiddismutáza, kataláza). K expresi těchto enzymů také významně napomáhá quorum sensing (Dopitová 2015).

6.1.3 Quorum Sensing

Objev komunikace mezi buňkami bakterií byl zlomovým bodem pro jejich zkoumání. Do té doby se brala komunikace jako výhra vyšších organismů. První bakterie, u které byla tato schopnost dokázána, byla *Vibrio Fischeri*, bakterie žijící v oceánu, která je schopna bioluminiscence (Fuqua a Greenberg 2002).

Mezibakteriální komunikace, díky které se biofilm přizpůsobuje prostředí, byla nazvána quorum sensing (QS). Každý bakteriální druh je schopen produkovat specifické signální molekuly (autoinduktory) a zároveň je schopen zachytit, zda dochází k produkci těchto molekul v jeho okolí. Čím větší je společenství stejných bakterií, tím vyšší je koncentrace autoinduktoru. Při dosažení prahové koncentrace se signální molekuly navážou na receptor, který posílá signál k indukci genů specifických pro společenství a zajišťující určité fyziologické aktivity biofilmu (např. bioluminiscenci, virulenci, symbiózu, pohyblivost, sporulaci) (Tiny Conspiracies - Bonnie Bassler (Princeton/HHMI) 2012).

Mezidruhovou komunikaci většiny bakterií zajišťuje molekula autoinduktoru dva (AI-2). Pro gramnegativní bakterie je specifická produkce acetylovaných homoserinových laktonů. Grampozitivní bakterie mají jako specifický autoinduktor polymer, který představuje např. N-acetyl glukosamin u kmene *Staphylococcus aureus* (Lopez et al. 2010; Tiny Conspiracies - Bonnie Bassler (Princeton/HHMI) 2012).

Vědci přišli s nápadem využít QS ke svému užitku, a to konkrétně jeho inhibicí. Pokud buňky přežívají a ohrožují organismus na základě komunikace, řešením by mělo být jim v komunikaci zabránit a to buď přímým rozkladem signálních molekul nebo využitím inhibitorů k blokaci signální molekuly (či jejich receptorů) (Paldrychová 2016). Mechanismem rušení QS, který se také nazývá Quorum Quensing (QQ) se vědci inspirovali od přirozené schopnosti některých prokaryot a eukaryot. Byly určeny dvě základní skupiny molekul, které se na QQ mohou podílet. První skupinou jsou malé molekuly strukturálně podobné QS molekulám, a tedy schopné blokovat receptor pro pravé signální molekuly nebo zředit jejich koncentraci pod hranici vyvolání změny. Druhou skupinou jsou poté malé enzymy, které autoinduktory rozkládají (Dong et al. 2007). Jako příklad můžeme zmínit dokázanou inaktivaci receptorů LasR pro QS u *Pseudomonas aeruginosa* za použití flavonoidů (Paczkowski et al. 2017). Tyto

mechanismy tedy poukazují na nové možnosti regulace bakterií i při antibiotické rezistenci (Dong et al. 2007).

6.1.4 Faktory ovlivňující tvorbu biofilmu

Formování biofilmu je závislé na mnoha faktorech, které jsou shrnuty v tabulce 1. Jedním z těchto faktorů je typ kolonizovaného povrchu. Bakterie nejlépe adherují na povrchy nejednotné, tedy drsné a porézní. Tyto povrchy se nejen hůře čistí, ale přináší bakteriím více místa pro přisednutí a částečnou ochranu. Bylo dokázáno, že ideální jsou povrchy s póry o velikosti obdobné adherujícím buňkám. Adherenci dále ovlivňuje individuální schopnost tvořit glykokalyx, povrchová produkce extracelulárních polysacharidů, schopnost vytváření elektrostatických sil, či výskyt povrchových fimbrií a bičíků (Hsu et al. 2013).

Biofilmy tvoří celkově lépe bakterie gramnegativní, které jsou díky výskytu endotoxinu v bakteriální stěně hydrofobní.

Vznik biofilmu dále ovlivňují faktory okolního prostředí jako pH, teplota, přísun živin a povrchové tření (shear stress). Tyto faktory totiž ovlivňují degradaci či syntézu druhého posla c-di-GMP (cyklický diguanosinmonofosfát), který funguje jako signální molekula a při jeho vysoké koncentraci se zvyšuje produkce adhezínů a EPS (Dulínková 2021).

Bylo prokázáno, že pH ovlivňuje zvláště první krok formování biofilmu, tedy adhezi k povrchu spolu s formováním bakteriálního slizu (EPS). Pro většinu bakterií byla určena nejlepší formace biofilmu při neutrálním pH (pH=7), kdy je zeta potenciál záporný.

Teplota prostředí ovlivňuje především metabolismus a příjem živin biofilmem. Při zvyšování teploty pozorujeme zrychlování růstu biofilmu a navýšení adhezních molekul (fimbrie, bičíky). U *S. aureus* byl zároveň pozorován nárůst hydrofobicity a tedy přilnavosti k povrchu. Naopak při snižování teplot bylo pozorováno snižování viskosity EPS a následná menší soudržnost struktury biofilmu. Mezi limitujícími živinami můžeme zmínit například dostatek kyslíku či glukózy, které pomáhají vzniku biofilmu (Ghazay a Bukhari 2020).

Rozpad biofilmu s následným uvolňováním bakterií do okolního prostředí je způsoben zvýšením síly průtoku v okolí, a tedy zvýšením povrchového tření nebo snížením síly kompatibility biofilmu.

Na základě znalostí faktorů ovlivňující tvorbu biofilmu jsme schopni optimalizovat vlastnosti materiálů tak, aby byla adheze bakterií a následná formace biofilmu co nejobtížnější. Vznikají tak povrchy (zvláště v medicínském užití), které jsou antimikrobiálně aktivní a to např. elektrostaticky nabitě nebo pokryté heparinem, což vytváří hydratovanou vrstvu aktivně odpuzující mikroby. Dále je možné povrchy pokrýt antibiotiky či kovy (Ghazay a Bukhari 2020).

Tabulka 1- Faktory ovlivňující tvorbu biofilmu

Vnější prostředí	Kolonizovaný povrch (porozita, hydrofobicita,...)
	pH prostředí
	Teplota prostředí
	Přísun živin (glukóza, kyslík)
	Povrchové tření
Vnitřní prostředí	Bakteriální druh (Gram +/-)
	Povrch bakterie (glykokalyx/ bičíky)
	Quorum sensing
	Složení EPS

6.2 Bakterie tvořící biofilm

Biofilm může být tvořen jedním mikroorganismem nebo častěji vícero geneticky odlišnými druhy. Mezibuněčné přilnutí v rámci jedno druhového biofilmu se nazývá koheze, u směsného biofilmu koagregace (Němcová 2008).

Ve zdravotnictví je biofilm nejčastěji tvořen kmeny: *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* nebo *Proteus mirabilis*. S největším zastoupením prvních dvou uvedených (Khatoon et al. 2018).

6.2.1 Biofilm kmene *Staphylococcus aureus*

S. aureus je komenzální grampozitivní kok kolonizující kolem 30 % populace. Zároveň je ale považován za nejvíce patogenní kmen u lidí i zvířat, a to především kvůli rezistenci k fagocytům, produkci toxinů, časté tvorbě biofilmu a výskytu rezistentních kmenů. V planktonní formě způsobuje akutní infekce, a ve formě biofilmu je často spojován s infekcemi chronickými, které i přes léčbu nevykazují známky hojení. Příkladem mohou být osteomyelitidy, infekce chronických ran (ulcerace u diabetiků) nebo endokarditidy. Kvůli obtížné eradikaci biofilmu je často nutné chirurgické odstranění celé postižené tkáně (Archer et al. 2011).

Formování biofilmu kmene *S. aureus* je zajištěno několika geny, které zajišťují rozpoznání, adhezi a osídlení povrchu. Jedná se o fibrinogen binding proteins gene (fib), clumping factor (clf), elastin binding protein (ebps), atd. Zároveň se adheze účastní kyselina teichoová a glykokalyx (Archer et al. 2011).

Quorum sensing, tedy mezibuněčnou komunikaci u tohoto kmene zajišťuje doplňkový genový regulátor (agr). Ten reguluje gen kódující dva transkripty RNAII a RNAIII, dle kterých vznikají proteiny pro buněčnou komunikaci, exotoxiny (proteázy, lipázy) a proteiny zajišťující lepší virulenci. Tento regulátor je komplementární s regulátorem sarA, který zajišťuje prvotní fáze formování biofilmu (Idrees et al. 2021; Archer et al. 2011).

S. aureus přisedá na hostitelské proteiny, následně se adherující buňky pomnožují a na základě QS produkují EPS, kterými se obalují (Cucarella et al. 2001).

Nejvíce zastoupenými polysacharidy v EPS *S. aureus* jsou PIA (polysaccharide intercellular adhesin) a PNAG (poly-N-acetyl- β -1,6-glukosamin). Z proteinů se zde nachází např. Aap (Accumulation associated proteins) a FnBP (Fibrinogen binding protein). Dále má v biofilmu velký význam eDNA, která zajišťuje horizontální přenos genů (například těch pro rezistenci), udržování integrity biofilmu, mechanickou antimikrobiální rezistenci a ireverzibilní adhezi. V biofilmu jsou jak pozitivně tak negativně nabití ionty, celkově je ale povrch biofilmu negativní (Dopitová 2015; Idrees et al. 2021).

6.3 Modely pro sledování biofilmu

První se studiem bakteriálního biofilmu zabíral Bill Costerton v sedmdesátých letech dvacátého století. Využíval metody in vitro a in vivo (hlodavci, skot) (McCowan et al. 1978; Jacques et al. 1986). Se současným stoupajícím důrazem na etický systém tří R (Replace, Reduce, Refine) od Russel a Bourcha (Russell a Burch 1960) se ale muselo postupně upouštět od in vivo metodik. Od té doby výrazně pokročila metodika in vitro, a to především díky novým zobrazovacím, biochemickým a molekulárním metodám. Nadále se zkoumají biofilmy na úrovni společenství i jednotlivých buněk, a to proto, aby bylo možné zefektivnit boj proti nim a naopak optimalizovat jejich využití (Lebeaux et al. 2013).

Modely pro růst biofilmu se dělí do tří podkategorií. Modely uzavřené, otevřené a takzvané mikrokosmy. Jednotlivé příklady níže popsaných modelů jsou prezentovány na obrázcích 3, 4, 5.

6.3.1 Uzavřené modely

Uzavřené modely jsou jednoduché, snadno kvantifikovatelné a využívají statických podmínek při nízkém obsahu živin a provzdušnění. Nejběžnější uzavřenou metodu představují klasické mikrotitrační destičky nebo vylepšené Calgary device destičky (Calgary Biofilm Device, CBD), které díky hrotům zabraňují nespecifické sedimentaci volných bakterií na dno. Bylo dokázáno, že na jednotlivých hrotech CBD vznikají totožné biofilmy a jde tedy o zařízení ideální pro růst biofilmu k pozdějšímu zkoumání. Dále je možné na hrotech optimalizovat velikost biofilmu a lépe se vyhnout kontaminaci. Systém je také mnohem jednodušší k zacházení, než některé otevřené systémy (Ceri et al. 1999).

Z povrchu mikrotitrační destičky, popř. hrotů Calgary device může být biofilm odstraněn sonifikací pro následnou kvantifikaci. Případně může být biofilm kvantifikován specifickým obarvením, viz metody kvantifikace bakteriálního biofilmu (Lebeaux et al. 2013).

Další uzavřenou metodou je Biofilm Ring Test, který je vhodný především ke sledování převážně raných stádií vzniku biofilmu. K bakteriální suspenzi jsou přidány paramagnetické mikrokuličky, které jsou postupně zabudovány do vznikajícího biofilmu.

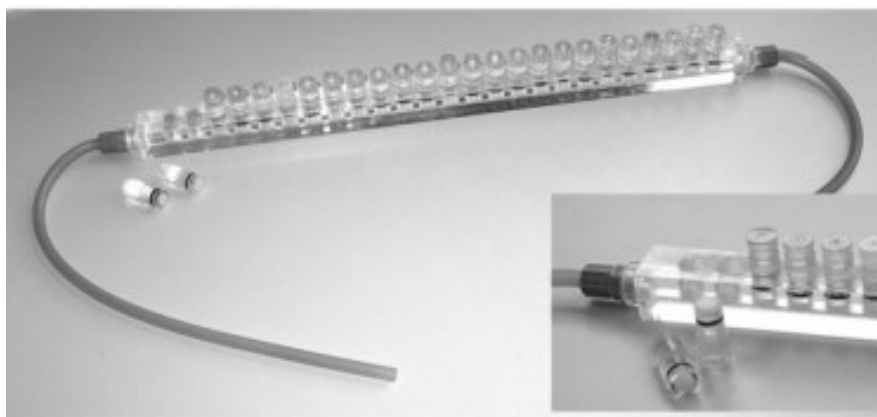
Nárůst biofilmové struktury je sledován pomocí snižující se pohyblivosti mikrokuliček v přítomnosti magnetického pole (Chavant et al. 2007).



Obrázek 3 - Calgary biofilm device (z vlastní sbírky, nafoceno ve FNHK)

6.3.2 Otevřené modely

Otevřené systémy zajišťují kontinuální výměnu mrtvých buněk a metabolitů za čerstvé živné médium. V tomto systému lze kontrolovat různé fyzikální parametry jako například tření. Nevýhodou otevřených systémů je nutnost propracovanějšího speciálního technického vybavení. Mezi otevřené systémy řadíme například Modifikovaný Robbins device (MRD), kde se bakteriální biofilm tvoří při měnícím se průtoku okolní tekutiny (McCoy et al. 1981). Drip Flow Biofilm Reactor umožňuje růst biofilmu přímo na nahnutých mikroskopických sklíčkách (Xu et al. 1998). Rotating disc reactor umožňuje modifikovat proudění tekutiny za pomoci koordinace rotačního pohybu (Pitts et al. 2001). Dalšími otevřenými systémy jsou například: Kadouri systém (Merritt et al. 2006), Flow cell (Heydorn et al. 2000), CDC biofilmový reaktor (Donlan et al. 2004) a Microfermentory (Ghigo 2001).



Obrázek 4 - Modified Robbins device (Azeredo et al. 2017)



Obrázek 5 - The drip flow biofilm reactor (Azeredo et al. 2017)

6.3.3 Mikrokosmy

Nejdokonalejší napodobení in situ podmínek do reality umožňují mikrokosmy. Většinou je využíváno více bakteriálních druhů a podmínky se snaží být, co nejpodobnější opravdovému místu vzniku biofilmu. Jako příklad může sloužit přidávání slin nebo hydroxyapatitu, při napodobování prostředí ústní dutiny. Dále potahování abiotických materiálů lidskými buňkami k vytvoření prostředí lidské tkáně (Lebeaux et al. 2013; Azeredo et al. 2017).

Mezi známé mikrokosmy patří například „Reconstituted Human Epithelia (RHE)“ (Schaller et al. 1998) či „Zürich Oral Biofilm-model“ (Guggenheim et al. 2011).

6.4 Metody detekce a kvantifikace bakteriálního biofilmu

Stačí-li nám detekovat biofilm kvalitativně, dá se použít Christensenova zkumavková metoda či její variace Christensenova mikrotitrační metoda, kdy se narostlý biofilm vizualizuje barvením. Další kvalitativní metodou detekce je kultivace na agaru s kongo červení, tedy detekce pro biofilmy rodu *Staphylococcus*. Bakterie tvořící biofilm se poznají nárůstem černých suchých kolonií s matným povrchem či hnědočerných kolonií se zónou precipitace. Biofilm negativní bakterie tvoří lesklé červené kolonie (Hrubanová 2011; Freeman et al. 1989).

Základními a stále nejvíce užívanými metodami kvantifikace biofilmu jsou metody kultivační a molekulární. Pro kultivovatelné bakterie je tedy zlatým standardem počítání množství CFU/ml na agarových plotnách, pro nekultivovatelné bakterie průtoková cytometrie. Další možností je využití polymerázové řetězcové reakce (PCR), což je ale metoda pro tyto účely značně nepřesná a to kvůli výskytu eDNA a volné DNA z mrtvých buněk, které počet bakterií falešně zvyšují. Tyto nežádoucí vlivy lze ale eliminovat a to barvením extracelulárního DNA fotoreaktivním propidium monoazidem (PMA). Takto označená DNA se následně vyřadí při extrakci (Azeredo et al. 2017). Další používané metody jsou rozděleny do několika odstavců.

6.4.1 Fyzikální metody stanovení

Biofilm lze kvantifikovat na základě rozdílu hmotnosti suchého sklíčka (či jiné matrice pro mikrobiální růst) před nárůstem biofilmu a následně po jeho vytvoření. Další možností je elektrochemická impedanční spektroskopie (ECIS), kdy se měří elektrochemická reakce na elektrodě, která s nárůstem biofilmu klesá. Další velmi užívanou metodou je Ultrasonic time-domain reflektometrie, která zjišťuje tloušťku biofilmu měřením akustické impedance na obou jeho stranách. Dále se dají využívat i metody jako CT nebo rentgen (Azeredo et al. 2017).

6.4.2 Chemické metody stanovení

Jedná se o metody využívající barviva a fluorochromy. Mezi nejčastější patří barvení krystalovou violetí, karbolfuchsinem a safraninem. Tyto metody kvantifikují celou bakteriální biomasu (mrtvé i živé buňky). Biofilm se zafixuje ethanolem

nebo teplem, a následně obarví. Krystalová violeť se iontovými reakcemi váže na DNA, proteiny nebo biofilmové polysacharidy. Přebytečná krystalová violeť se opláchne vodou a zchovalé modro-fialové zbarvení značí vytvořený biofilm. Zkumavková varianta tohoto testu se nazývá Christensenova zkumavková metoda. Lze ji ale provést i v mikrotitračních destičkách (Hrubanová 2011).

Dále existují kolorimetrické reakce využívající fyziologie bakterií, tedy jejich metabolické přeměny barviv na stanovitelné deriváty. Příkladem může být dehydrogenace XXT (tetrazolinové soli), která se používá jako marker buněčné respirace a při její redukci dochází k přeměně na silně barevný formazan.

Dalším používaným barvivem je Resazurin (známý také jako AlamarBlue). Jde o redoxní činidlo, které je metabolizováno na Resorufin. Jedná se o aktivní přeměnu díky FMNH₂, FADH₂, NAHD, NADPH a cytochromům (Pettit et al. 2005). Využití AlamarBlue je příhodnější díky nízké ceně, rychlé reakci a spektrofotometrické vizualizaci. Jediným úskalím je vysoký nejnižší limit kvantifikace buněk (a to více než 10⁶ CFU/biofilm). Tento limit byl snížen na 10³ CFU/biofilm ředěním suspenze čerstvým živným médiem (Azeredo et al. 2017).

6.4.3 Mikroskopické metody

Pro základní identifikaci biofilmu lze využít i světelná mikroskopie. Tato metoda je semi-kvantitativní a slouží tedy k odhadu bakterií v biofilmu a jejich morfologie. Pro zlepšení obrazu a odlišení jednotlivých struktur biofilmu lze využít mikroskopii fluorescenční. Tyto základní mikroskopické metody jsou nicméně nevhodné v případě hutného mnohavrstevného biofilmu. Pro zobrazení celé 3D struktury biofilmu je potřeba dosáhnout většího zvětšení na úrovni vizualizace jedné buňky a pozorování vnitřních vrstev biofilmu. Toho lze dosáhnout konfokální laserovou skenovací mikroskopií (CLSM). Při tomto typu mikroskopování musí být bakterie schopny fluorescence na což lze využít různé fluorescenční próby s širokým spektrem specifík. Nejčastěji se používají barviva SYTO-9 a Sybr-green, která se vážou na DNA. Další možností je genetická úprava bakterií, aby vykazovaly schopnost auto-fluorescence (Azeredo et al. 2017).

Případně lze využít fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH), která může dopomoci identifikovat jednotlivé kmeny ve vícedruhovém biofilmu (Idrees et al. 2021).

V neposlední řadě lze využít moderní elektronové mikroskopy, ať už SEM (skenovací elektronový mikroskop) nebo TEM (transmisní elektronový mikroskop). Tyto metody umožňují pozorovat nejmenší části jako např. nukleové kyseliny nebo proteinové struktury. Nevýhodou je naopak specifická úprava vzorků, při které dochází k celkové dehydrataci (Azeredo et al. 2017).

Poslední vybranou metodou je mikroskopie atomárních sil (AFM), při které je možné pozorovat biofilm ve fyziologickém stavu bez dehydratace. Jde o snímání povrchu stejně jako u SEM, ale výsledkem je 3D obraz v nanometrovém rozlišení. Tato metoda ale snímá velmi malé pole vzorku (Chatterjee et al. 2014).

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální části byla sledována tvorba bakteriálního biofilmu dvěma kmeny *S. aureus*, ve třech různých živných bujónech, na třech různých površích po dobu 24 a 72 hodin.

Nárůst biofilmu byl pozorován pomocí metabolické metodiky s AlamarBlue (AB). AB je netoxická sloučenina, které se využívá ke zjištění životnosti bakterií, do kterých snadno, bez narušení jejich buněčné stěny, proniká. Bakterie aktivně přeměňují oxidativní formu modrého barviva Resazurinu na formu redukovanou, červenou a silně fluoreskující – Resorufin. Změna se dá stanovit již „okometricky“ na základě změny barvy, přesněji ale stanovením vzrůstající fluorescence či absorbance. Ve výsledku můžeme tedy na základě vytvořených grafů stanovit kvantitu živých buněk ve směsi.

7.1 Použitý biologický materiál

V experimentální části jsme využili dvou bakteriálních kmenů – *S. aureus* (STAU) a jeho meticilin-rezistentní verze (MRSA). Jednalo se o klinické izoláty z oddělení FNHK, které jsme uchovávali zamražené ve sterilních kryozkumavkách ITEST KRYOBANKA B s porézními kuličkami a médiem (ITEST plus s.r.o., Hradec Králové, Česká republika) při -80°C . Po jejich rozmrazení jsme si křížovým roztěrem na trypton-sójovém agaru (TSA) vytvořili čistou sekundární kulturu, kterou jsme uchovávali maximálně 2 týdny při 4°C .

7.2 Použité chemikálie a materiál

V rámci experimentu jsme použili tři živná media – Mueller-Hinton bujón (MH, Himedia, Čadeský-Envitek, Česká Republika), bujón z mozkosrdcové infúze (BHI, Himedia, Čadeský-Envitek, Česká Republika), trypton-sójový bujón (TSB, Himedia, Čadeský-Envitek, Česká Republika). Všechny bujóny byly připraveny ze suché směsi rozpuštěné v destilované vodě dle poměrů uvedených na obalu a následně sterilizovány v autoklávu. Dále byly použity tři typy speciálních mikrotitračních destiček Calgary Device (MBEC Biofilm Inoculator, InnovaTech, Canada) – čistě plastový povrch, hydroxyapatitem (HA) potažený povrch a oxidem titaničitým (TiO_2) potažený povrch.

Z chemikálií byly použity AlamarBlue (AB, Invitrogen, ThermoFisher, Eugene, Oregon) a fyziologický roztok (B. Braun, Melsungen, Německo).

7.3 Technické vybavení

- Automatické pipety 20, 200, 1000 μ L (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Denzitometr Den-1B (BioSan, Riga, Lotyšsko)
- Vortex Stuart (Bibbyscientific/ColeParner, Staffordshire, UK)
- Laminární box HealForce, HFSafe 1200LC (Shanghai Lisben scientific equipment, Šanghaj, Čína)
- Termostat CelCulture-CO2 Incubator (ESCO, Singapur)
- Třepačka OrbiShaker CO2 (BenchMark, Sayreville, NJ 08872 USA)
- Optický spektrofotometr SynergyTM HT (BioTek Instruments, Vermont, USA)
- Software: GraphPad PRISM 9 (GraphPad Software Inc., Kalifornie)

7.4 Metodika

7.4.1 Zásady práce s bakteriální suspenzí

Práce s bakteriálními kmeny *S. aureus* řadí laboratoř do úrovně biologické bezpečnosti 2 (BSL-2). Kladli jsme proto důraz na nošení OOPP: laboratorní plášť, přezůvky a rukavice. Veškerou manipulaci s bakteriemi jsme prováděli v laminárním boxu, aby nedošlo ke kontaminaci okolí. Zároveň jsme bránili zanesení jiných mikroorganismů na naši pracovní plochu a to pomocí dezinfekce všeho, co bylo do laminárního boxu vneseno. Po dokončení práce byl odpad před likvidací dezinfikován rozpustnými chlorovými tabletami. Znovu použitelné pomůcky byly autoklávovány. Laminární box byl vysvícen UV světlem.

7.4.2 Optimalizace metodiky AlamarBlue

7.4.2.1 Příprava bakteriálních suspenzí

Ze sekundární bakteriální kultury jsme odebrali pár kolonií, které jsme za využití kličky a vortexu resuspendovali ve fyziologickém roztoku. Následně jsme změřili denzitu roztoku na optickém denzitometru a přidávali kolonie či ředili suspenzi, dokud jsme

nedosáhli denzity 1 McFarland. Dle McFarlandovy zákalové stupnice víme, že tato suspenze S odpovídá zhruba 3×10^8 CFU/ml. Přesné CFU/ml bylo stanoveno spočítáním kolonií na agaru po inokulaci suspenze na TSA a inkubaci při 35°C přes noc (viz 7.4.4).

7.4.2.2 Experiment s 5% AlamarBlue

Připravenou suspenzi STAU a MRSA jsme následně 1:10 rozředili ve třech typech živného media (MH, TSB, BHI) a 209 µl takto připravených roztoků (S1 v tabulce 2) jsme napipetovali do jamek řádku A mikrotitrační destičky. Do jamek řádku B jsme napipetovali 190 µl media a 19 µl suspenze z řádku A. Do jamek řádku C jsme napipetovali 171 µl media a 19 µl suspenze z řádku B. Tímto jsme připravili 3 ředění (1:10, 1:100, 1:1000) původní suspenze pro oba kmeny a všechny media. Do řádku D jsme napipetovali pouze 190 µl media, jako negativní kontrolu. Obsah jednotlivých jamek je znázorněn v tabulce 2.

V této fázi experimentu jsme zkoušeli kvantifikovat bakterie pomocí 5 % AB a tak jsme do každé jamky vzhledem k poměrům přidali 10 µl AB. Před měřením absorbance byla destička zabalena do alobalu a uložena do termostatu.

Tabulka 2 - Experiment s 5% AlamarBlue

	STAU			MRSA		
Přídavek 10 µl AB	1	2	3	4	5	6
A	209 µl S1	209 µl S2	209 µl S3	209 µl S1	209 µl S2	209 µl S3
B	190 µl MH + 19 µl z A1	190 µl TSB + 19 µl z A2	190 µl BHI + 19 µl z A3	190 µl MH + 19 µl z A4	190 µl TSB + 19 µl z A5	190 µl BHI + 19 µl z A6
C	171 µl MH + 19 µl z B1	171 µl TSB + 19 µl z B2	171 µl BHI + 19 µl z B3	171 µl MH + 19 µl z B4	171 µl TSB + 19 µl z B5	171 µl BHI + 19 µl z B6
D (kontroly)	190µl MH	190µl TSB	190µl BHI	190 µl MH	190 µl TSB	190 µl BHI

Vysvětlení zkratk v tabulce: Mueller-Hinton bujón (MH), Trypton-sojový bujón (TSB), bujón z mozkosrdcové infúze (BHI), oxidoredukční činidlo AlamarBlue (AB), použité kmeny *Staphylococcus Aureus* (STAU) a *meticilin-rezistentní Staphylococcus Aureus* (MRSA).

7.4.2.3 Experiment s 1% AlamarBlue

Připravenou suspenzi STAU a MRSA jsme 1:10 rozředili ve třech typech živného media (MH, TSB, BHI) a 218 µl takto připravených roztoků (S1 v tabulce 1) jsme napipetovali do jamek řádku A mikrotitrační destičky. Do jamek řádku B jsme napipetovali 198 µl media a 20 µl suspenze z řádku A. Do jamek řádku C jsme napipetovali 178 µl media a 20 µl suspenze z řádku B. Tímto jsme připravili 3 ředění (1:10, 1:100, 1:1000) původní suspenze pro oba kmeny a všechny media. Do řádku D jsme napipetovali pouze 198 µl media, jako negativní kontrolu. Obsah jednotlivých jamek je znázorněn v tabulce 3.

V této fázi experimentu jsme zkoušeli kvantifikovat bakterie pomocí 1% AB a tak byly do každé jamky přidány 2 µl AB. Před měřením absorbance byla destička zabalena do alobalu a uložena do termostatu.

Tabulka 3 - Experiment s 1% AlamarBlue

Přídavek 2 µl AB	STAU			MRSA		
	1	2	3	4	5	6
A	218 µl S1	218 µl S2	218 µl S3	218 µl S1	218 µl S2	218 µl S3
B	198 µl MH + 20 µl z A1	198 µl TSB + 20 µl z A2	198 µl BHI + 20 µl z A3	198 µl MH + 20 µl z A4	198 µl TSB + 20 µl z A5	198 µl BHI + 20 µl z A6
C	178 µl MH + 20 µl z B1	178 µl TSB + 20 µl z B2	178 µl BHI + 20 µl z B3	178 µl MH + 20 µl z B4	178 µl TSB + 20 µl z B5	178 µl BHI + 20 µl z B6
D (kontroly)	198 µl MH	198 µl TSB	198 µl BHI	198 µl MH	198 µl TSB	198 µl BHI

Vysvětlení zkratk v tabulce: Mueller-Hinton bujón (MH), Trypton-sojový bujón (TSB), bujón z mozkosrdcové infúze (BHI), oxidoredukční činidlo AlamarBlue (AB), použité kmeny *Staphylococcus Aureus* (STAU) a *meticilin-rezistentní Staphylococcus Aureus* (MRSA).

7.4.2.4 Měření absorbance a výpočet AB redukce

Pro naše experimenty jsme využili měření absorbance při dvou vlnových délkách (570 nm a 600 nm), a to 12x po půl hodinách. Kvůli vysoké citlivosti na světlo bylo při práci s AB světlo omezeno na minimum. Při práci v laminárním boxu jsme měli vypnuté

hlavní světlo a následně jsme destičku balili do alobalu, aby byla před okolním světlem chráněna.

Pro výpočet redukce AB nám posloužil vzorec od výrobce (viz rovnice 1), kde kromě námi naměřených hodnot používáme molární absorpční koeficient ϵ , což je konstanta udávající, jak moc daná chemická struktura absorbuje světlo při dané vlnové délce (v jednotkách m^2/mol). Molární absorpční koeficienty jsou uvedeny v tabulce 4. V rovnici je používán ϵ_{ox} pro oxidovanou formu AB a ϵ_{red} pro AB redukovanou. Dále v rovnici počítáme s koncentracemi a to c_{red} - koncentrací redukované AB (červená) a c_{ox} – koncentrací oxidované AB (modrá). Absorbance A je absorbancí testovaného vzorku, zatímco A' negativní kontroly. Vlnová délka λ_1 je vlnová délka 570 nm a λ_2 600 nm.

Rovnice 1 - Výpočet procentuální redukce AB

$$\% \text{ redukované AlamaeBlue} = \frac{C_{red}(\text{test well})}{C_{ox}(\text{NK})} = \frac{(\epsilon_{ox})\lambda_2 * A\lambda_1 - (\epsilon_{ox})\lambda_1 * A\lambda_2}{(\epsilon_{red})\lambda_1 * A'\lambda_2 - (\epsilon_{red})\lambda_2 * A'\lambda_1} \times 100$$

Tabulka 4 – Molární absorpční koeficient pro různé vlnové délky

	570 nm	600 nm
ϵ_{ox} (m^2/mol)	80,586	117,216
ϵ_{red} (m^2/mol)	155,677	14,652

7.4.3 Kalibrační křivka závislosti AlamarBlue na množství bakterií

Dalším krokem experimentální části bylo stanovení závislosti redukce AB na množství bakterií ve vybraných mediích. V mikrotitrační destičce jsme si vytvořili šest ředících řad. Jednu pro STAU v MH, další pro STAU v BHI, třetí pro STAU v TSB. (Další tři pro stejná media s MRSA). Ve zkumavce jsme nejprve vytvořili primární suspenzi S pro každou řadu o optickém zákalu 3-4 McFahrland, což odpovídá zhruba koncentraci 10^9 CFU/ml. Následně byly pro každou řadu připraveny suspenze S1-S3 desítkovým ředěním v daném mediu. Jednotlivé suspenze byly následně pipetovány a ředěny v devíti jamkách jednoho řádku dle ředícího schématu viz tabulka 5.

Tabulka 5 - Příprava bakteriálních suspenzí pro kalibrační křivku závislosti AlamarBlue na množství bakterií

Jamka	Obsah jamky	Teoretické CFU/ml
1	95 µl suspenze S	10^9 CFU/ml
2	47.5 µL suspenze S + 47.5 µl media	5×10^8 CFU/ml
3	95 µL suspenze S1*	10^8 CFU/ml
4	47.5 µl suspenze S1 + 47.5 µl media	5×10^7 CFU/ml
5	95 µL suspenze S2**	10^7 CFU/ml
6	47.5 µl suspenze S2 + 47.5 µl media	5×10^6 CFU/ml
7	95 µL suspenze S3***	10^6 CFU/ml
8	47,5 µl suspenze S3 + 47,5 µl media	5×10^5 CFU/ml
9	9,5 µL suspenze S3+ 85,5 µl media	10^5 CFU/ml
10	95 µl media	0 CFU/ml

Vysvětlení:

- * S1 = 100 µL S + 900 µl media
- ** S2 = 100 µl S1 + 900 µl media
- *** S3 = 100 µl S2 + 900 µl media

Primární suspenzi jsme tedy zředili 1:1 a následně 1:9. Poměr 1:9 jsme označili jako suspenzi S1, kterou jsme následně opět zředili 1:1 a 1:9. Poměr 1:9 byl označen jako suspenze S2. Et cetera.

Desátá jamka sloužila jako negativní kontrola. Obsahovala tedy jen 95 µL daného media bez bakteriálního kmene. Do všech jamek jsme následně přidali 5 µl AB a dle stejné metodiky jako u předchozích experimentů spektrofotometricky odečítali absorbanci po 1 a 3 hodinách, pro dvě vlnové délky (570 nm a 600 nm). Následně jsme dle již známé rovnice 1 vypočítali redukci AB.

Přesné počty jednotek tvořících kolonie na jeden mililitr suspenzí (CFU/ml) byly stanoveny spočítáním kolonií na agarech po inokulaci danou suspenzí a inkubaci při 35°C přes noc (viz 7.4.4).

Ze stanovených hodnot CFU/ml a zjištěných hodnot redukce AB jsme vytvořili kalibrační křivku závislosti redukce AB (osa y) na množství bakterií (osa x). Kalibrační

křivka byla vytvořena pro oba kmeny, všechny media, při odečtu po 1 a 3 hodinách (celkem tedy 12 kalibračních křivek).

7.4.4 Stanovení přesného CFU/ml pomocí vysazení na agar

Pro stanovení přesného CFU/ml byly nejprve bakteriální suspenze naředěny v desítkové řadě. Všechna ředění byly následně inokulovány v objemu 100 μ l na Petriho misky s MH půdou a inkubovány 24 h při 35°C. Následně byly spočítány kolonie na plotnách s nárůstem v rozmezí 30 - 300 dobře oddělených kolonií (Koch 2014).

Při stanovení přesného CFU/ml původní suspenze se následně připočítalo ředění odpovídající odečtené plotně.

7.4.5 Růst biofilmu

Biofilm byl formován na třech typech speciálních destiček Calgary biofilm device. Hroty na víčku byly plastové, potažené hydroxyapatitem nebo oxidem titaničitým. Nejprve bylo zapotřebí vytvořit si bakteriální suspenzi S (viz krok 7.4.2.1) pro každý z našich kmenů a to o koncentraci 1 McFahrland. Každý řádek mikrotitrační destičky byl vyhrazen pro určitou bakterii v určitém mediu (a to v poměru 9,9 ml media + 100 μ L bakteriální suspenze S – tedy 100x zředěny). Do každé jamky jsme napipetovali 150 μ L vzniklé inokulační suspenze pro optimální zanoření hrotů. Experiment jsme provedli v duplikátu. Nárůst bakteriálního biofilmu jsme hodnotili po 24 a 72 hodinách inkubace při 35°C.

Před samotným měřením bylo nutné hroty s vytvořeným biofilmem opláchnout ve fyziologickém roztoku, aby došlo k odmytí buněk neadherovaných k biofilmu a víčko zanořit do nové mikrotitrační destičky obsahující médium s přídavkem AB (5 %). Poté byla destička zabalena do alobalu a vložena do termostatu, odkud byla vyjmuta a proměřena spektrofotometricky při 570 a 600 nm po třech a pěti hodinách inkubace. Pro výpočet redukce AB byl opět použit výpočet dle rovnice 1. Narostlý biofilm byl následně kvantifikován pomocí stanovených kalibračních křivek.

7.4.6 Statistické zpracování dat

Kalibrační křivky jsme stanovili v programu Graphpad Prism 9. Jde o kalibrační křivky AB redukce v závislosti na CFU/ml. Díky těmto křivkám lze stanovit množství bakterií v biofilmu na základě změřené redukce AB.

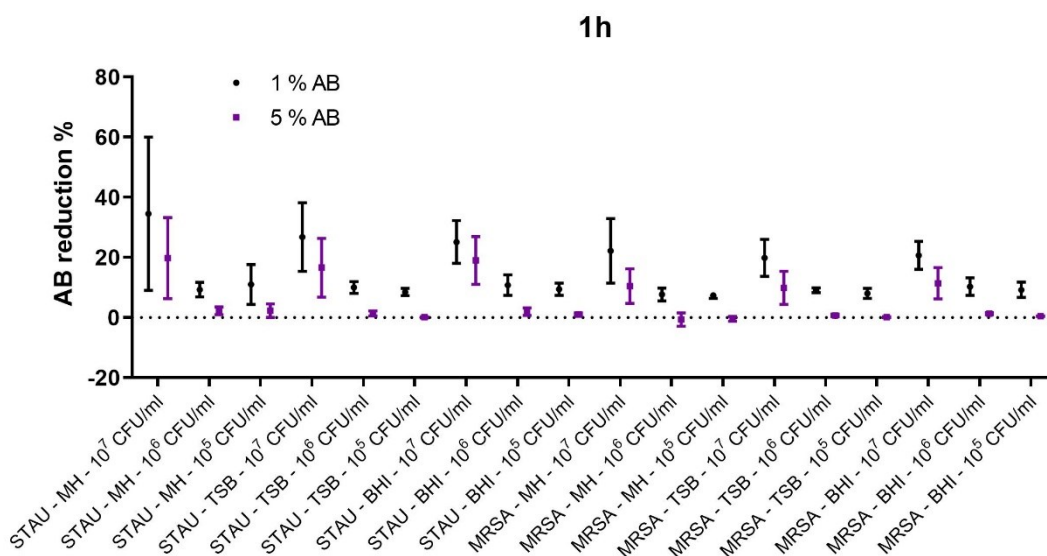
Stanovené hodnoty jsme podrobili Shapiro-Wilk testu normality, za pomoci kterého jsme zjistili, že naše data nejsou normálně rozložena. Proto byly jednotlivé bakteriální biofilmy tvořeny kmeny MRSA a STAU, na různých površích, v různých médiích a po různé době inkubace porovnány pomocí neparametrického testu Kruskal-Wallis. Následně jsme využili ještě Dunnův test pro podrobnější porovnání měření v párech, k identifikaci přesných míst statisticky významných rozdílů. Při testování byla využita klasická hladina spolehlivosti 5 %.

Ve výsledcích uvádíme sloupcové grafy, kde jsou znázorněny mediány s mezikvartilovým rozpětím.

8. VÝSLEDKY

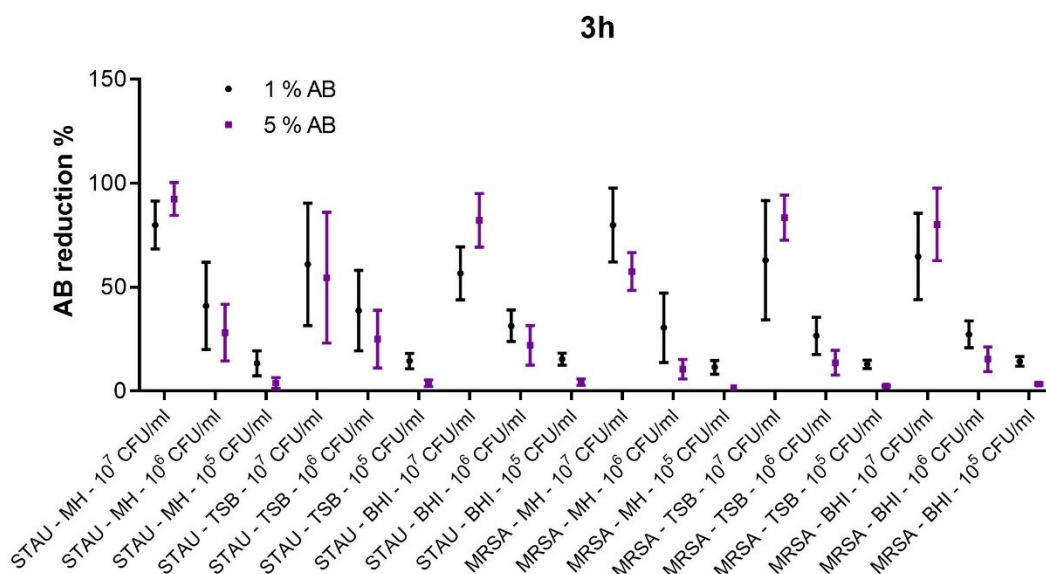
8.1 Optimalizace metodiky s AlamarBlue

Bakteriální nárůst byl hodnocen pomocí metabolizace AB, viz metodika 7.4.2. Podle protokolu (Thermo Fisher Scientific Inc 2019) od výrobce je doporučováno použít pro nespecifické buněčné stanovení 10% AB v celkovém objemu. V literatuře jsme našli, že pro obdobnou biofilmovou kvantifikaci jako je předmětem této práce, využívali R. K. Pettit a spol. (Pettit et al. 2009; 2005) 5% AB v celkovém objemu. V rámci ekonomické úspory jsme se rozhodli porovnat stanovení s 5% a 1% AB v celkovém objemu. Ze získaných hodnot měření jsme zjistili, že při měření s 1% AB jsou výsledné hodnoty zatíženy vyšší směrodatnou odchylkou, a proto je vhodnější zůstat u ověřené 5% koncentrace AB. Jednotlivá stanovení s příslušnými směrodatnými odchylkami jsou vyobrazena na přiložených grafech 1 a 2.



Graf 1 - Stanovení AB redukce po 1 hodině.

Pro jednoho patogena v jednom médiu vidíme vždy výsledek při použití 1% i 5% AlamarBlue (AB) a to pro tři různá množství jednotek formujících kolonii (CFU/ml). Typy bakterií *Staphylococcus Aureus* (STAU) a *meticilin-rezistentní Staphylococcus Aureus* (MRSA). Typy bujónů: *Mueller-Hinton* (MH), *Trypton-sojový bujón* (TSB), *bujón z mozkosrdcové infúze* (BHI).

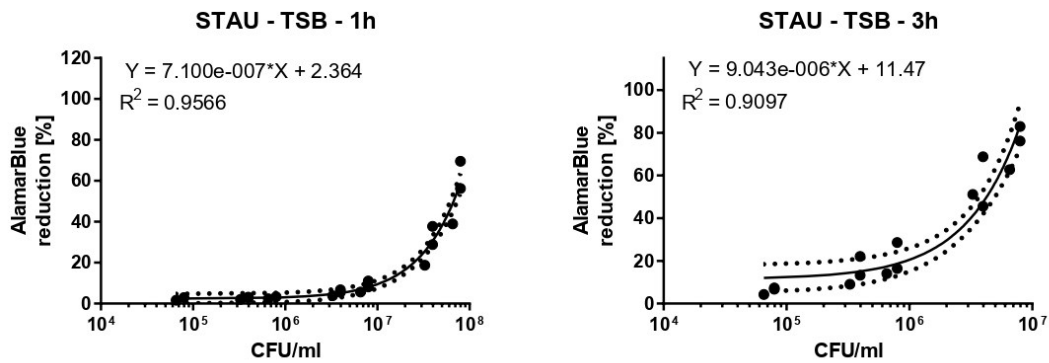


Graf 2 - Stanovení AB redukce po 3 hodinách.

Pro jednoho patogena v jednom médiu vidíme vždy výsledek při použití 1% i 5% AlamarBlue (AB) a to pro tři různá množství jednotek formujících kolonii (CFU/ml). Typy bakterií Staphylococcus Aureus (STAU) a meticilin-rezistentní Staphylococcus Aureus (MRSA). Typy bujónů: Mueller-Hinton (MH), Tryptonsojový bujón (TSB), bujón z mozkosrdcové infúze (BHI).

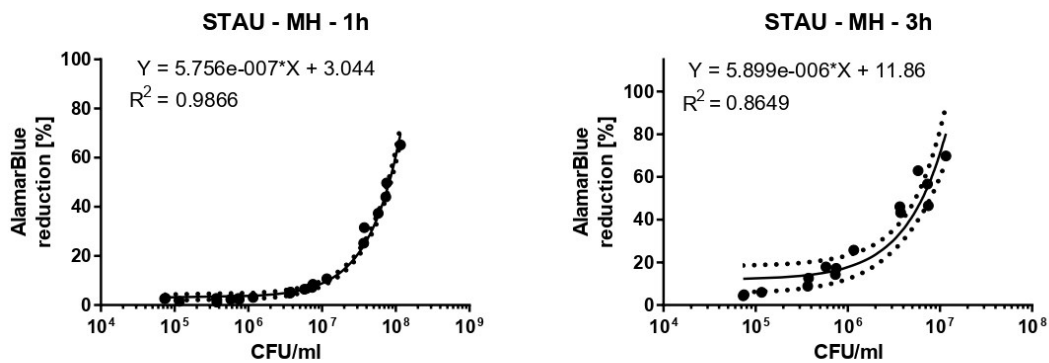
8.2 Kalibrační křivka závislosti AB na množství bakterií

Na základě ředících řad bakteriálních suspenzí jsme získali grafy závislosti redukce AB na množství CFU/ml. Z těchto křivek a rovnic z nich vycházejících bylo možné následně dopočítat, kolik bakterií se nachází, v kterém biofilmu, při stanovené AB redukci. Díky koeficientu determinance R^2 , který u většiny rovnic dosáhl hodnot nad 0,9, jsme ověřili, že tento regresní model je kvalitní a odpovídající. Jsou zde přiloženy jednotlivé kalibrační křivky vytvořené pro odečet redukce AB po 1 a 3 hodinách pro STAU (graf 3, 4, 5) i MRSA (graf 6, 7, 8). Kalibrační křivka pro odečet po 5 hodinách nebyla stanovena, jelikož tou dobou, pro zvolené rozmezí 10^5 - 10^8 CFU/ml, byla většina připravených suspenzí (obsahujících více než 10^6 CFU/ml) již za bodem maximální redukce AB.



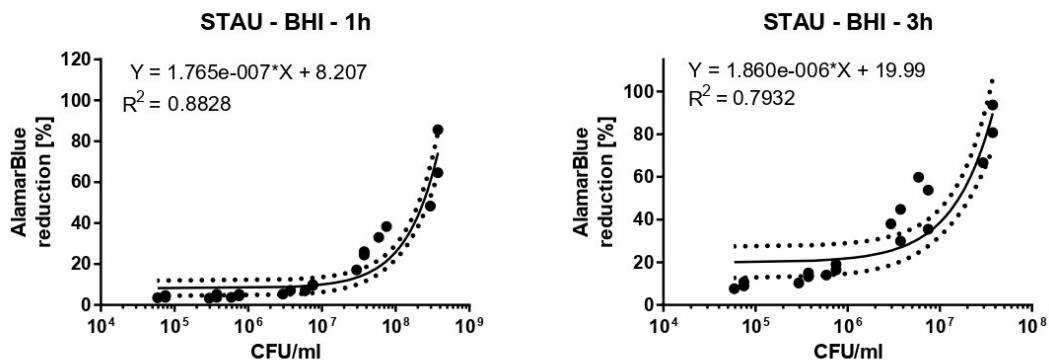
Graf 3 - Kalibrační křivky pro nárůst kmene *Staphylococcus Aureus* (STAU) v Trypton-Sojovém bujónu (TSB) po 1 a 3 hodinách

Na ose x je množství jednotek tvořících kolonii v mililitru (CFU/ml) na ose y redukce AlamarBlue (AB) v procentech. Dále můžeme vidět rovnici kalibrační křivky Y a koeficient determinance R^2 .



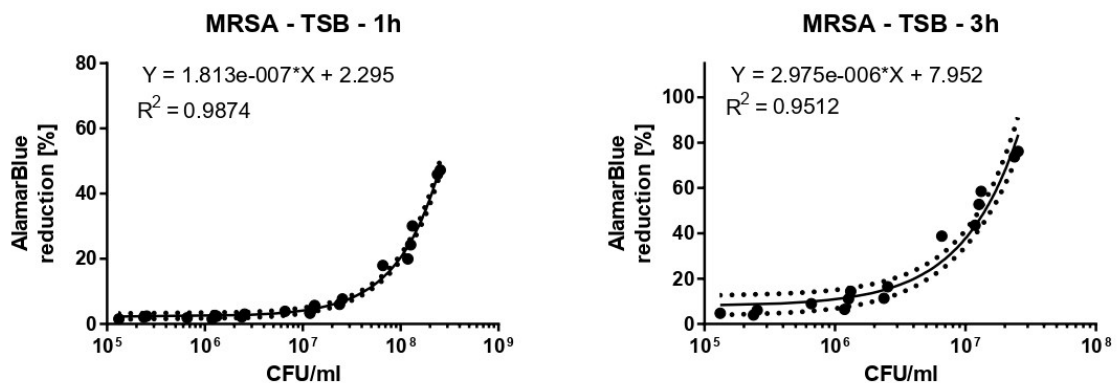
Graf 4 - Kalibrační křivky pro nárůst kmene *Staphylococcus Aureus* (STAU) v Mueller-Hinton bujónu (MH) po 1 a 3 hodinách

Na ose x je množství jednotek tvořících kolonii v mililitru (CFU/ml) na ose y redukce AlamarBlue (AB) v procentech. Dále můžeme vidět rovnici kalibrační křivky Y a koeficient determinance R^2 .



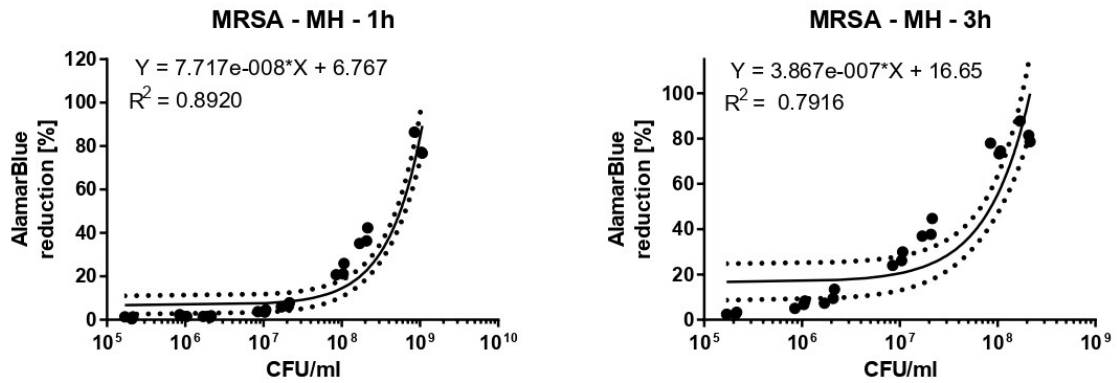
Graf 5 - Kalibrační křivky pro nárůst kmene *Staphylococcus Aureus* (STAU) v bujónu z mozkosrdcové infúze (BHI) po 1 a 3 hodinách

Na ose x je množství jednotek tvořících kolonii v mililitru (CFU/ml) na ose y redukce AlamarBlue (AB) v procentech. Dále můžeme vidět rovnici kalibrační křivky Y a koeficient determinance R^2 .



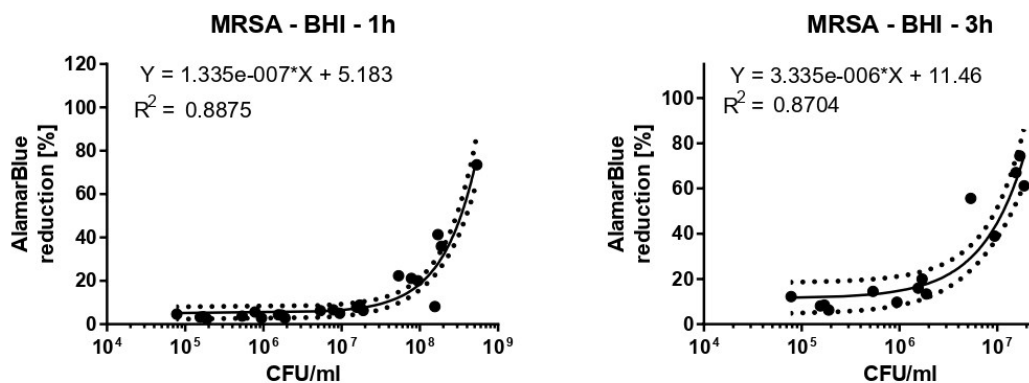
Graf 6 - Kalibrační křivky pro nárůst kmene meticilin-rezistentního *Staphylococca Aurea* (MRSA) v Trypton-sojovém bujónu (TSB) po 1 a 3 hodinách

Na ose x je množství jednotek tvořících kolonii v mililitru (CFU/ml) na ose y redukce AlamarBlue (AB) v procentech. Dále můžeme vidět rovnici kalibrační křivky Y a koeficient determinance R^2 .



Graf 7 - Kalibrační křivky pro nárůst kmene meticilin-rezistentního *Staphylococcus Aurea* (MRSA) v Mueller-Hintonově bujónu (MH) po 1 a 3 hodinách

Na ose x je množství jednotek tvořících kolonii v mililitru (CFU/ml) na ose y redukce AlamarBlue (AB) v procentech. Dále můžeme vidět rovnici kalibrační křivky Y a koeficient determinance R^2 .



Graf 8 - Kalibrační křivky pro nárůst kmene meticilin-rezistentního *Staphylococcus Aurea* (MRSA) v bujónu z mozkosrdcové infúze (BHI) po 1 a 3 hodinách

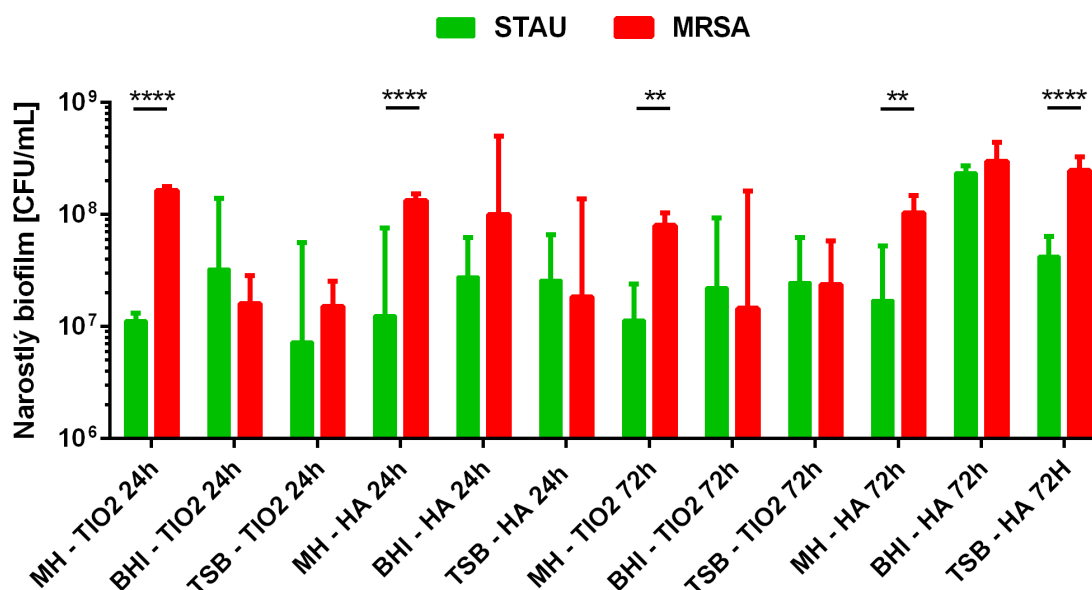
Na ose x je množství jednotek tvořících kolonii v mililitru (CFU/ml) na ose y redukce AlamarBlue (AB) v procentech. Dále můžeme vidět rovnici kalibrační křivky Y a koeficient determinance R^2 .

8.3 Stanovení tvorby biofilmu

Množství bakterií v biofilmu formovaném na HA a TiO₂ povrchu se pohybovalo v rozmezí $1,26 \times 10^7$ – $2,70 \times 10^8$ CFU/ml. Plastový povrch se prokázal jako nejméně vhodný pro tvorbu biofilmu. Redukce AB probíhala na plastovém povrchu velmi pomalu a i po 3 hodinách bylo zredukováno méně než 10 % AB. Takto nízké hodnoty jsou zatíženy vysokou chybovostí a nejsou tedy vhodné pro přesné stanovení CFU/ml. Vliv jednotlivých faktorů na růst biofilmu je vyhodnocen v následujících odstavcích a přiložených grafech.

8.3.1 Tvorba biofilmu kmeny *S. aureus* a meticilin-rezistentní *S. aureus*

Při porovnání tvorby biofilmu kmenem STAU a MRSA byla pozorována zvýšená tvorba biofilmu rezistentní variantou kmene, a to především při použití MH média. V takové situaci a zároveň při kultivaci v TBS na HA povrchu byla zvýšená tvorba biofilmu rezistentním kmenem statisticky významná. Stanovený nárůst biofilmu v jednotlivých skupinách, prezentován jako množství bakterií tvořící biofilm (CFU/ml), je i se statickým zhodnocením dat zobrazen na grafu číslo 9.

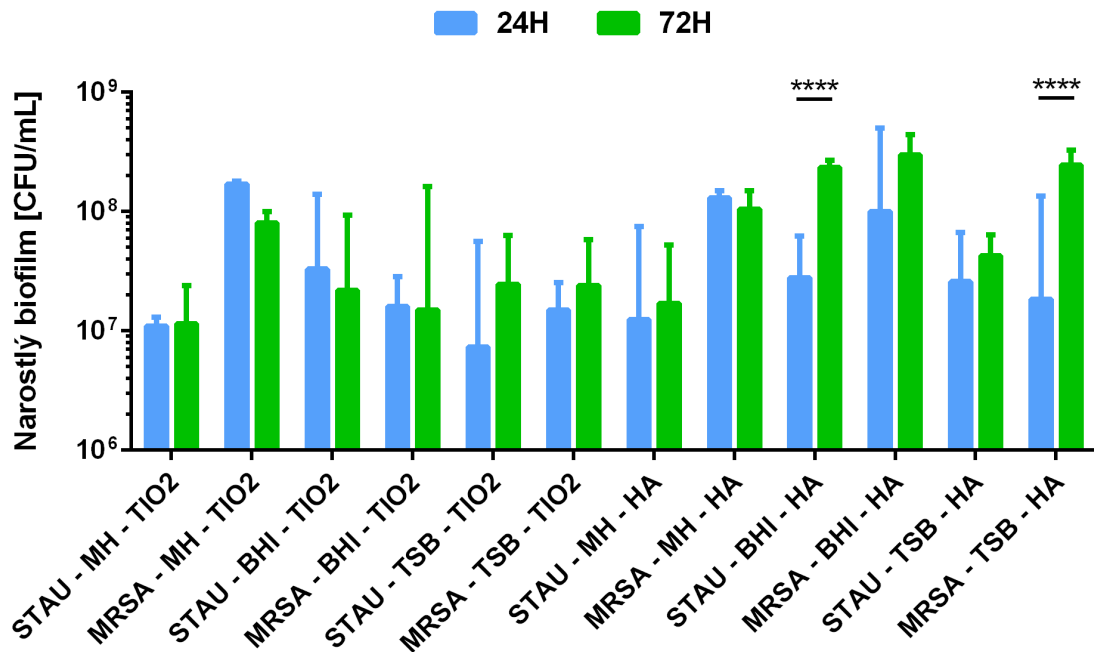


Graf 9 - Tvorba biofilmu kmeny *S. aureus* a meticilin-rezistentní *S. aureus* reprezentovaná jako množství bakterií tvořící biofilm v mililitru (CFU/ml)

*V grafu jsou uvedeny výsledky Kruskal-Wallis testu: medián s mezikvartilovým rozpětím (n = 32). Hladina významnosti odpovídá ** (p ≤ 0,01); **** (p ≤ 0,0001). Hodnoty CFU/ml vyjadřují množství jednotek tvořících kolonii na mililitr. Každá dvojice sloupců představuje situaci v jednom bujónu a na jednom povrchu. Typy bujónů: Mueller-Hinton (MH), Trypton-sojový bujón (TSB), bujón z mozkosrdcové infúze (BHI). Typy povrchů: hydroxyapatit (HA), oxid titaničitý (TiO₂).*

8.3.2 Vliv doby inkubace na tvorbu biofilmu

Při sledování vlivu doby inkubace na tvorbu biofilmu byl porovnán nárůst biofilmu v CFU/ml po 24 h a 72 h. Statisticky významně mohutnější biofilm byl po delší 72 hodinové inkubační době vytvořen pouze dvakrát, a to u kombinace STAU-BHI-HA a MRSA-TSB-HA. Ostatní experimentální skupiny neprokázaly významný vliv inkubační doby na hustotu tvořeného biofilmu. Stanovený nárůst biofilmu v jednotlivých skupinách, prezentován jako množství bakterií tvořící biofilm (CFU/ml), je i se statickým zhodnocením dat zobrazen na grafu číslo 10.



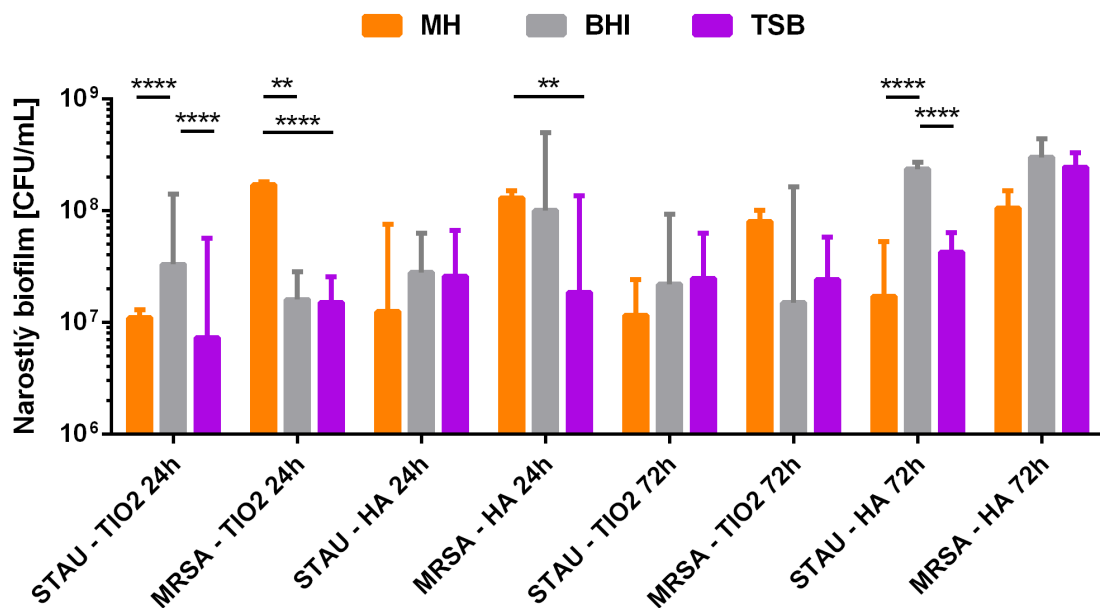
Graf 10 - Vliv doby inkubace na tvorbu biofilmu, reprezentován jako množství narostlých bakterií tvořících biofilm v mililitru (CFU/ml)

*V grafu jsou uvedeny výsledky Kruskal-Wallis testu: medián s mezikvartilovým rozpětím (n = 32). Hladina významnosti odpovídá: **** (p ≤ 0,0001). Hodnoty CFU/ml vyjadřují množství jednotek tvořících kolonii na mililitr. Každá dvojice sloupců představuje situaci jedné bakterie v jednom bujónu a na jednom povrchu. Typy bujónů: Mueller-Hinton (MH), Trypton-sojový bujón (TSB), bujón z mozkosrdcové infúze (BHI). Typy povrchů: hydroxyapatit (HA), oxid titaničitý (TiO₂). Typy bakterií Staphylococcus Aureus (STAU) a meticilin-rezistentní Staphylococcus Aureus (MRSA).*

8.3.3 Vliv kultivačního média na tvorbu biofilmu

Nejvíce statisticky významných rozdílů bylo odhaleno při sledování vlivu kultivačního média na tvorbu biofilmu. Detekovali jsme 7 statisticky významných rozdílů, z čehož pět s hladinou významnosti nižší než 0,0001 % a další dva s hladinou významnosti nižší než 0,01 %. Kmen STAU vytvořil statisticky významně mohutnější biofilm v kultivačním médiu BHI oproti MH a TSB na TiO₂ povrchu již po 24h inkubace a na HA povrchu po 72 hodinách inkubace. U TiO₂ povrchu došlo následně po delší 72h inkubaci k vyrovnání narostlého biofilmu ve všech médiích bez významných rozdílů. Kmen MRSA také vytvořil statisticky významně mohutnější biofilm v kultivačním médiu BHI oproti MH a TSB na HA povrchu po 72h inkubace. Pro kmen MRSA byl na povrchu TiO₂ pozorován pouze trend mohutnějšího biofilmu. Stanovený nárůst biofilmu

v jednotlivých skupinách, prezentovaný jako množství bakterií tvořící biofilm (CFU/ml), je i se statickým zhodnocením dat zobrazený na grafu číslo 11.

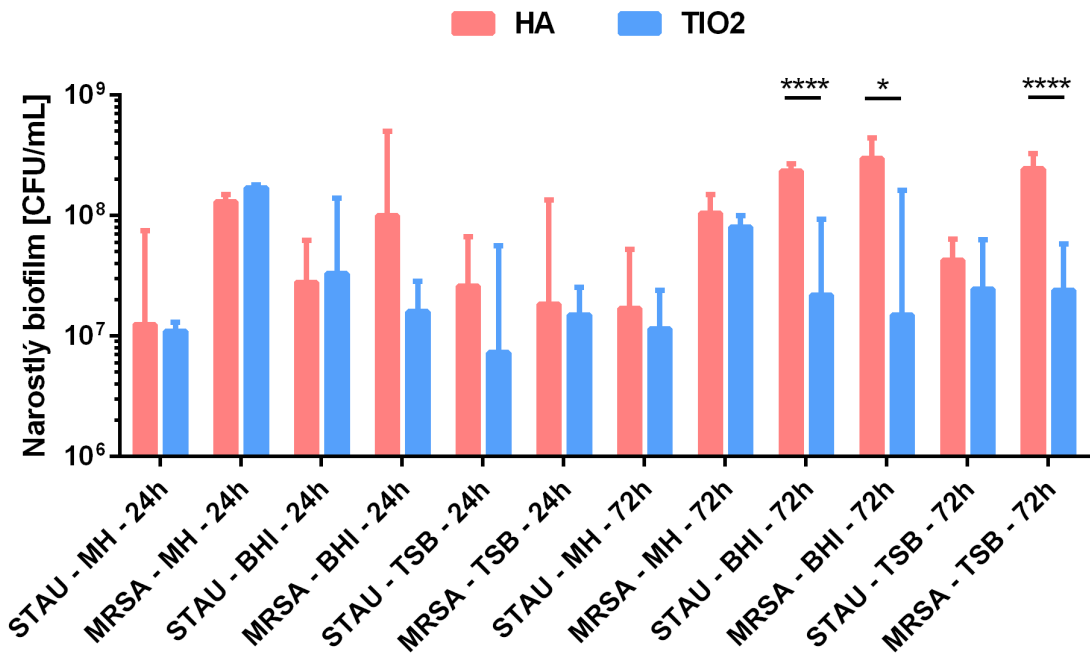


Graf 11 - Vliv kultivačního média na tvorbu biofilmu, reprezentován jako množství narostlých bakterií tvořících biofilm (CFU/ml)

V grafu jsou uvedeny výsledky Kruskal-Wallis testu: medián s mezikvartilovým rozpětím ($n = 32$). Hladina významnosti odpovídá ** ($p \leq 0,01$); **** ($p \leq 0,0001$). Hodnoty CFU/ml vyjadřují množství jednotek tvořících kolonii na mililitr. Každá trojice sloupců představuje situaci jedné bakterie na jednom povrchu, za jeden časový úsek. Typy povrchů: hydroxyapatit (HA), oxid titaničitý (TiO₂). Typy bakterií *Staphylococcus Aureus* (STAU) a *metlicilin-rezistentní Staphylococcus Aureus* (MRSA). Kultivační media, pro která jsou změny pozorovány: Mueller-Hinton bujón (MH), Trypton-sojový bujón (TSB), bujón z mozkosrdcové infúze (BHI).

8.3.4 Vliv povrchového substrátu na tvorbu biofilmu

Při porovnání tvorby biofilmu na površích potažených HA a TiO₂, se pro biofilmovou formaci prokázal jako výhodnější HA povrch. Průměrná biofilmová hustota vyjádřená v CFU/ml byla na tomto povrchu vyšší s jedinou výjimkou (STAU – BHI – 24h). Markantnější rozdíly byly pozorovány po 72 hodinové inkubaci u kmene MRSA v mediu TSB a BHI, a dále u kmene STAU v mediu BHI. Stanovený nárůst biofilmu v jednotlivých skupinách, prezentovaný jako množství bakterií tvořící biofilm (CFU/ml), je i se statickým zhodnocením dat zobrazen na grafu číslo 12.



Graf 12 - Vliv povrchového substrátu Calgary device na tvorbu biofilmu, reprezentován jako množství bakterií tvořící biofilm v mililitru (CFU/ml).

*V grafu jsou uvedeny výsledky Kruskal-Wallis testu: medián s mezikvartilovým rozpětím ($n = 32$). Hladina významnosti odpovídá * ($p \leq 0,05$); **** ($p \leq 0,0001$). Hodnoty CFU/ml vyjadřují množství jednotek tvořících kolonií na mililitr. Každá dvojice sloupců představuje situaci jedné bakterie v jednom mediu, za jeden časový úsek. Typy bakterií *Staphylococcus Aureus* (STAU) a metilicilin-rezistentní *Staphylococcus Aureus* (MRSA). Typy bujónů: Mueller-Hinton bujón (MH), Trypton-sojový bujón (TSB), bujón z mozkosrdcové infúze (BHI). Změny byly pozorovány pro dva kultivační povrchy: hydroxyapatit (HA), oxid titaničitý (TiO₂).*

9. DISKUSE

Různé bakteriální kmeny mohou vytvářet velmi odlišné biofilmy lišící se strukturou, pevností, odolností, hustotou či regulací růstu. Proto je vždy vhodné optimalizovat modelovou metodiku pro zvolený konkrétní kmen. Metabolická metoda využívající AB je vhodná pro kvantifikaci aerobních bakterií v planktonní či biofilmové formě. Velkou výhodou AB je především její stabilita a nízká toxicita. Pettit a spol. zároveň zjistili, že kvantifikace pomocí AB koreluje s druhou často využívanou metabolickou metodikou využívající tetrazoliovou sůl XTT a zároveň je přímo úměrná kultivačně naměřeným hodnotám CFU/ml (Pettit et al. 2009).

Součástí této práce byla optimalizace koncentrace použité AB. Jak už bylo v metodice nastíněno (viz 7.1.), byly ozkoušeny dvě koncentrace AB v roztoku: 5% dle publikace a 1% v zájmu úspory laboratoře. Nižší koncentrace AB se neosvědčila, jelikož se projevila nižším signálem pro odečet absorbance a následným zvětšením směrodatných odchylek měření.

Dále jsme v experimentální části pozorovali vliv jednotlivých faktorů na růst biofilmu kmene *S. aureus*. Statistická analýza naměřených dat nám umožnila sledovat vliv pouze jedné proměnné, kdy byl zbytek podmínek sjednocen. Například jsme pozorovali pouze vliv změny média nebo pouze vliv změny povrchu.

Při porovnávání rozdílu růstu biofilmu mezi meticilin-rezistentním a nerezistentním kmenem *S. aureus* jsme neočekávali velké statisticky významné rozdíly. Naše výsledky (5 z 12ti experimentálních skupin) ale odhalily statisticky významně mohutnější tvorbu biofilmu rezistentním kmenem. Tímto jsou naše výsledky v rozporu s naším očekáváním i Iránskou studií z roku 2016 (Ghasemian et al. 2016), kde vyhodnotili statistické rozdíly mezi meticilin-rezistentním a nerezistentním *S. aureus* jako nesignifikantní.

V dalším bodě práce docházelo k porovnávání nárůstu biofilmu po 24 hodinách s hodnotami po 72 hodinách. Statisticky významný rozdíl jsme získaly pouze u dvou experimentálních skupin z dvanácti. V několika případech došlo po delší inkubační době dokonce k úbytku biofilmové hmoty oproti kratší inkubační době. Tato situace může být

vysvětlena disperzí buněk z hotového biofilmu a tedy jejich odmytí. Ve studii, která se primárně zabírala vlivem různých kultivačních médií na formování biofilmu *Pseudomonas Aeruginosa* a *S. aureus* (Wijesinghe et al. 2019) konstatovali, že docházelo k plató růstu biofilmu po 72 hodinách. Dle našich výsledků se ale zdá, že některé z našich biofilmů dosáhli tohoto plató bodu dříve, díky čemuž již při 72 hodině docházelo k disperzi. Tyto poklesy v kvantitě biofilmu nebyly nicméně statisticky významné.

Dle české studie, která se zabírala vlivem kultivačních podmínek na produkci exopolymerních látek a adhezi buněk bakterie *Rhodococcus Erythropolis* (Pospíšilová et al. 2011) je adheze buněk a tedy první krok růstu biofilmu nejvyšší za přítomnosti toxického substrátu. Tuto myšlenku podpořila i další studie (Stepanović et al. 2007), kde byl růst biofilmu podpořen neinhibičními koncentracemi antibiotik, etanolem a NaCl. Ani jedno z našich médií nebylo obohaceno o neprospěšnou látku, ale stále jsme pozorovali změny v závislosti na odlišnosti média, což by měl být faktor nejvíce ovlivňující růst bakteriálního biofilmu (Stepanović et al. 2007). Ve studii, kde se porovnával růst biofilmu v BHI s růstem v dalších námi nevyužívaných médiích: nutrient broth (NB), Luria-Bertani (LB) a RPMI 1640 médium, byl bakteriemi značně preferován růst v BHI, díky jeho vysokému obsahu peptonů, proteinů a solí (Wijesinghe et al. 2019). Když se porovnával růst v BHI a TSB situace byla už značně nepřesnější a docházelo u různých bakteriálních kmenů k preferenci pokaždé jiného media (Stepanović et al. 2007). Při našem testování byly také v některých experimentálních skupinách pozorovány nejvyšší nárůsty biofilmu při použití BHI media. Nejednalo se ale o konstantní výsledky všech experimentálních skupin. Naš výzkum tedy odpovídal především výsledkům získaným ve studii z roku 2007 uvedené výše.

Použité povrchové modifikace prokázaly, že hrubší (pórovitější) povrch reprezentovaný HA a TiO₂ poskytuje bakteriím lepší podmínky pro adhezi a následnou tvorbu biofilmu. Nárůst na čistě plastovém povrchu byl po námi měřené době tak slabý, že nebylo možné přesně kvantifikovat bakterie v biofilmu za pomoci naší metodiky. Při porovnání HA a TiO₂ povrchu docházelo k mohutnějšímu nárůstu na Calgary biofilm device s hroty potaženými hydroxyapatitem. Tento povrch se tedy prokázal jako nejvhodnější pro tvorbu biofilmu *S. aureus*.

Jak již bylo zmíněno ve studii Stepanović a spol., (Stepanović et al. 2007) hlavním problémem biofilmových modelů zůstává předpokládaná nepřesná korelace výsledků in vitro pro in vivo situace. Je proto důležité dále optimalizovat metody tak, aby vznikaly modely, co nejpodobněji odrážející realitu v lidském organismu.

10. ZÁVĚR

Závěrem bych ráda zopakovala, že zkoumání bakteriálního biofilmu je stále aktuálním tématem, protože jde o faktor značně zvyšující bakteriální virulenci. V této diplomové práci jsme pozorovali vliv různých růstových podmínek na tvorbu biofilmu *S. aureus*, abychom optimalizovali biofilmový model využitelný například pro testování antimikrobiálních přípravků. Zjistili jsme, že naše kmeny *S. aureus* i meticilin-rezistentní *S. aureus* jsou schopny tvořit zralý biofilm již po 24hodinové kultivaci. Pro vytvoření hutného biofilmu je nejvhodnější hydroxyapatitem potažený povrch Calgary device a kultivační médium BHI.

11. POUŽITÉ ZKRATKY

AAp	Accumulation associated protein
AB	AlamarBlue
Agr	Accessory gene regulator
AI	Autoinduktor
Bap	Biofilm associated protein
BHI	Brain Heart Infusion bujón
BSL	Biosafety level
CBD	Calgary biofilm device
c-di-GMP	cyklický dimeric GMP (guaninmonofosfát)
CFU	Colony forming units
clf	clumping factor
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
DNA	Deoxynukleová kyselina
ebps	elastin binding protein of <i>S. aureus</i>
ECIS	Electrochemická impedanční spektroskopie
eDNA	Extracelulární Deoxynukleová kyselina
EPS	Extracellular polymeric substance (Extracelulární polymerní látky)
Esp	Enterococcal surface protein
Fib	Fibrinogen binding protein
FISH	Fluorescenční in situ hybridizace

FNHK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
FnBP	Fibrinogen Binding Protein
HA	Hydroxyapatit
LB	Luria-Bertani (médium)
MH	Mueller-Hinton bujón
MRD	Modified Robbins device
MRSA	Meticilin-rezistentní <i>S. aureus</i>
NB	Nutrient Broth
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerázová řetězcová reakce)
PIA	polysacharidový intercelulární adhezín (Poly-N-acetyl-glukosamin)
PMA	Propidium monoazide
PNAG	poly-N-acetyl – β -1,6-glukosamin
QQ	Quorum Quenching
QS	Quorum Sensing
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
STAU	<i>Staphylococcus aureus</i>
TEM	Transmisní elektronový mikroskop
TiO ₂	oxid titaničitý
TSB	Tryptofan sojový bujón/ agar
UV	Ultraviolet (ultrafialové)

12. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1- Faktory ovlivňující tvorbu biofilmu	19
Tabulka 2 - Experiment s 5% AlamarBlue	29
Tabulka 3 - Experiment s 1% AlamarBlue	30
Tabulka 4 – Molární absorpční koeficient pro různé vlnové délky.....	31
Tabulka 5 - Příprava bakteriálních suspenzí pro kalibrační křivku závislosti AlamarBlue na množství bakterií.....	32

13. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Jednotlivé fáze tvorby biofilmu (Srinivasan et al. 2021)	14
Obrázek 2 - Složení biofilmu (vlastní zpracování podle (Dominguez-Benetton 2007; Rapacka-Zdonczyk et al. 2021))	16
Obrázek 3 - Calgary biofilm device (z vlastní sbírky, nafoceno ve FNHK).....	22
Obrázek 4 - Modified Robbins device (Azeredo et al. 2017)	23
Obrázek 5 - The drip flow biofilm reactor (Azeredo et al. 2017).....	23

14. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - Stanovení AB redukce po 1 hodině.....	35
Graf 2 - Stanovení AB redukce po 3 hodinách.....	36
Graf 3 - Kalibrační křivky pro nárůst kmene Staphylococcus Aureus (STAU) v Trypton-Sojovém bujónu (TSB) po 1 a 3 hodinách	37
Graf 4 - Kalibrační křivky pro nárůst kmene Staphylococcus Aureus (STAU) v Mueller-Hinton bujónu (MH) po 1 a 3 hodinách	37
Graf 5 - Kalibrační křivky pro nárůst kmene Staphylococcus Aureus (STAU) v bujónu z mozkosrdcové infúze (BHI) po 1 a 3 hodinách	38
Graf 6 - Kalibrační křivky pro nárůst kmene meticilin-rezistentního Staphylococca Aurea (MRSA) v Trypton-sojovém bujónu (TSB) po 1 a 3 hodinách	38
Graf 7 - Kalibrační křivky pro nárůst kmene meticilin-rezistentního Staphylococca Aurea (MRSA) v Mueller-Hintonově bujónu (MH) po 1 a 3 hodinách	39
Graf 8 - Kalibrační křivky pro nárůst kmene meticilin-rezistentního Staphylococca Aurea (MRSA) v bujónu z mozkosrdcové infúze (BHI) po 1 a 3 hodinách.....	39
Graf 9 - Tvorba biofilmu kmeny S. aureus a meticilin-rezistentní S. aureus reprezentovaná jako množství bakterií tvořící biofilm v mililitru (CFU/ml)	41
Graf 10 - Vliv doby inkubace na tvorbu biofilmu, reprezentován jako množství narostlých bakterií tvořících biofilm v mililitru (CFU/ml)	42
Graf 11 - Vliv kultivačního média na tvorbu biofilmu, reprezentován jako množství narostlých bakterií tvořících biofilm (CFU/ml).....	43
Graf 12 - Vliv povrchového substrátu Calgary device na tvorbu biofilmu, reprezentován jako množství bakterií tvořící biofilm v mililitru (CFU/ml).....	44

15. POUŽITÁ LITERATURA

ARCHER, N. K., M. J. MAZAITIS, J. W. COSTERTON, J. G. LEID, M.E. POWERS a M. E. SHIRTLIFF, 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* [online]. **2**(5), 445–459. ISSN 2150-5594, 2150-5608. Dostupné z: doi:10.4161/viru.2.5.17724

AZEREDO, J., N. F. AZEVEDO, R. BRIANDET, N. CERCA, T. COENYE, A. R. COSTA, M. DESVAUX, G. DI BONAVENTURA, M. HÉBRAUD, Z. JAGLIC, M. KAČÁNIOVÁ, S. KNØCHEL, A. LOURENÇO, F. MERGULHÃO, R. L. MEYER, G. NYCHAS, M. SIMÕES, O. TRESSE a C. STERNBERG, 2017. Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. **43**(3), 313–351. ISSN 1040-841X, 1549-7828.

Dostupné z: doi:10.1080/1040841X.2016.1208146

CERI, H., M. E. OLSON, C. STREMICK, R. R. READ, D. MORCK a A. BURET, 1999. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **37**(6), 1771–1776. ISSN 0095-1137, 1098-660X. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.37.6.1771-1776.1999

COSTERTON, J. W., P. S. STEWART a E. P. GREENBERG, 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* [online]. **284**(5418), 1318–1322. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.284.5418.1318

CUCARELLA, C., C. SOLANO, J. VALLE, B. AMORENA, Í. LASA a J. R. PENADÉS, 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology* [online]. **183**(9), 2888–2896. ISSN 0021-9193, 1098-5530. Dostupné z: doi:10.1128/JB.183.9.2888-2896.2001

DOMINGUEZ-BENETTON, X., 2007. *Biocomplexity and Bioelectrochemical Influence of Gasoline Pipelines Biofilms in Carbon Steel Deterioration: A Transmission Lines and Transfer Functions Approach*. B.m. b.n.

DONG, Y.-H., L.-H. WANG a L.-H. ZHANG, 2007. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **362**(1483), 1201–1211. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2007.2045

DONLAN, R. M., J. A. PIEDE, C. D. HEYES, L. SANII, R. MURGA, P. EDMONDS, I. EL-SAYED a M. A. EL-SAYED, 2004. Model System for Growing and Quantifying *Streptococcus pneumoniae* Biofilms In Situ and in Real Time. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **70**(8), 4980–4988. ISSN 0099-2240, 1098-5336.

Dostupné z: doi:10.1128/AEM.70.8.4980-4988.2004

DOPITOVÁ, M., 2015. *Vliv kultivačních podmínek na citlivost mikrobiálního biofilmu k antimikrobiálním látkám*. Ústav experimentální biologie. Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta.

DULÍNKOVÁ, J., 2021. *Molekulární mechanismy tvorby bakteriálního biofilmu – rešerše*. Brno. Diplomová Práce. Masarykova Univerzita, Farmaceutická fakulta.

FLEMMING, H.C., T.R. NEU a D.J. WOZNIAC, 2007. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *Journal of Bacteriology* [online]. **189**(22), 7945–7947. ISSN 0021-9193, 1098-5530. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00858-07

FREEMAN, D.J., F.R. FALKINER a C.T. KEANE, 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology* [online]. **42**(8), 872–874. ISSN 0021-9746. Dostupné z: doi:10.1136/jcp.42.8.872

FUQUA, C. a E.P. GREENBERG, 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **3**(9), 685–695. ISSN 1471-0072, 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/nrm907

GHASEMIAN, A., S.N. PEERAYEH, M. MIRZAEI a B. BAKHSI, 2016. Comparison of Biofilm Formation between Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Iranian biomedical journal* [online]. **20**. Dostupné z: doi:10.7508/ibj.2016.03.007

GHAZAY, F.A. a M.A. BUKHARI, 2020. Factors Influencing Bacterial Biofilm Formation and Development. *American Journal of Biomedical Research* [online]. Dostupné z: doi:10.34297/AJBSR.2021.12.001820

GHIGO, J.M., 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* [online]. **412**(6845), 442–445. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/35086581

GUGGENHEIM, M., T. THURNHEER, R. GMÜR, P. GIOVANOLI a B. GUGGENHEIM, 2011. Validation of the Zürich burn-biofilm model. *Burns* [online]. **37**(7), 1125–1133. ISSN 03054179. Dostupné z: doi:10.1016/j.burns.2011.05.017

HEYDORN, A., A.T. NIELSEN, M. HENTZER, C. STERNBERG, M. GIVSKOV, B.K. ERSBØLL a S. MOLIN, 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology* [online]. **146**(10), 2395–2407. ISSN 1350-0872, 1465-2080. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-146-10-2395

HRUBANOVÁ, M., 2011. *Tvorba biofilmu potravinářsky významnými bakteriemi*. Zlín. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

HSU, L.C., J. FANG, D. BORCA-TASCIUC, R. WOROBO a C.I. MORARU, 2013. Effect of Micro- and Nanoscale Topography on the Adhesion of Bacterial Cells to Solid Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **79**(8), 2703–2712. ISSN 0099-2240, 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.03436-12

CHATTERJEE, S., N. BISWAS, A. DATTA, R. DEY a P. MAITI, 2014. Atomic force microscopy in biofilm study. *Microscopy* [online]. **63**(4), 269–278. ISSN 2050-5698, 2050-5701. Dostupné z: doi:10.1093/jmicro/dfu013

- CHAVANT, P., B. GAILLARD-MARTINIE, R. TALON, M. HÉBRAUD a T. BERNARDI, 2007. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiological Methods* [online]. **68**(3), 605–612. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2006.11.010
- IDREES, M., S. SAWANT, N. KARODIA a A. RAHMAN, 2021. Staphylococcus aureus Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. **18**(14), 7602. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph18147602
- JACQUES, M, M.E. OLSON a J.W. COSTERTON, 1986. Microbial colonization of tailed and tailless intrauterine contraceptive devices: Influence of the mode of insertion in the rabbit. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [online]. **154**(3), 648–655. ISSN 00029378. Dostupné z: doi:10.1016/0002-9378(86)90624-1
- KHATOON, Z., C.D. MCTIERNAN, E. SUURONEN, T.F. MAH a E. ALARCON, 2018. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon* [online]. **4**(12), e01067. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2018.e01067
- KOCH, L., ed., 2014. Growth Measurement. In: L. KOCH, ed. *Methods for General and Molecular Microbiology* [online]. Washington, DC, USA: ASM Press, s. 172–199 [vid. 2022-03-21]. ISBN 978-1-68367-161-9. Dostupné z: doi:10.1128/9781555817497.ch9
- KOPECKÁ, T. a O. MELTER, 2020. *Mikrobiální perzistence: nevyhnutelná cesta ke chronicitě a rezistenci?* [online]. 2020. B.m.: SZÚ. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/29_2020/04_duben/173_177_Mikrobialni.pdf
- LEBEAUX, D., A. CHAUHAN, O. RENDUELES a C. BELOIN, 2013. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens* [online]. **2**(2), 288–356. ISSN 2076-0817. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens2020288
- LOPEZ, D., H. VLAMAKIS a R. KOLTER, 2010. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **2**(7), a000398–a000398. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a000398
- MCCOWAN, R.P., G.J. CHENG, C.B. BAILEY a J.W. COSTERTON, 1978. Adhesion of bacteria to epithelial cell surfaces within the reticulo-rumen of cattle. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **35**(1), 149–155. ISSN 0099-2240, 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/aem.35.1.149-155.1978
- MCCOY, W.F., J.D. BRYERS, J. ROBBINS a J.W. COSTERTON, 1981. Observations of fouling biofilm formation. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. **27**(9), 910–917. ISSN 0008-4166, 1480-3275. Dostupné z: doi:10.1139/m81-143

MERRITT, J. H., D. E. KADOURI a G. A. O'TOOLE, 2006. Growing and Analyzing Static Biofilms. *Current Protocols in Microbiology* [online]. **00**(1) [vid. 2022-05-02]. ISSN 1934-8525, 1934-8533. Dostupné z: doi:10.1002/9780471729259.mc01b01s00

NĚMCOVÁ, T., 2008. *Význam mikrobiálních biofilmů a jejich úloha v patogenezi* [online]. B.m. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/175480/prif_b/Bakalarska_prace1.pdf

PACZKOWSKI, J. E., S. MUKHERJEE, A. R. MCCREADY, J.-P. CONG, C. AQUINO, H. KIM, B. R. HENKE, C. D. SMITH a B. L. BASSLER, 2017. Flavonoids Suppress *Pseudomonas aeruginosa* Virulence through Allosteric Inhibition of Quorum-sensing Receptors. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **292**(10), 4064–4076. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M116.770552

PALDRYCHOVÁ, M., 2016. Komunikace v mikrobiálním světě: Jak a proč si bakterie povídají. *vscht.cz* [online]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/popularizace/doktorandipisou/paldrychova>

PETTIT, R. K., C. A. WEBER, M. J. KEAN, H. HOFFMANN, G. R. PETTIT, R. TAN, K. S. FRANKS a M. L. HORTON, 2005. Microplate Alamar Blue Assay for *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Susceptibility Testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **49**(7), 2612–2617. ISSN 0066-4804, 1098-6596. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.49.7.2612-2617.2005

PETTIT, R. K., C. A. WEBER a G. R. PETTIT, 2009. Application of a high throughput Alamar blue biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* [online]. **8**(1), 28. ISSN 1476-0711. Dostupné z: doi:10.1186/1476-0711-8-28

PITTS, B., A. WILLSE, G.A. MCFETERS, M.A. HAMILTON, N. ZELVER a P.S. STEWART, 2001. A repeatable laboratory method for testing the efficacy of biocides against toilet bowl biofilms. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **91**(1), 110–117. ISSN 1364-5072, 1365-2672. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01342.x

POSPÍŠILOVÁ, D., M. POLOVÁ a J. MASÁK, 2011. Vliv kultivačních podmínek na produkci exopolymerních látek a adhezi buněk bakterie *Rhodococcus Erythropolis*. *Acta Environmentalica U.C.* **2011**(19), 271–274. ISSN 1335-0285.

RAPACKA-ZDONCZYK, A., A. WOZNIAK, J. NAKONIECZNA a M. GRINHOLC, 2021. Development of Antimicrobial Phototreatment Tolerance: Why the Methodology Matters. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(4), 2224. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22042224

RULÍK, M. a V. HOLÁ, 2012. Mikrobiální biofilmy 1. Všudypřítomný a přitom málo známý fenomén. *Časopis Živa.* **2012**(3), str.104.

RUSSELL, W. M. S. a R.L. BURCH, 1960. The Principles of Humane Experimental Technique. *Medical Journal of Australia* [online]. **1**(13), 500–500. ISSN 0025-729X, 1326-5377. Dostupné z: doi:10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x

SCHALLER, M., W. SCHÄFER, H. C. KORTING a B. HUBE, 1998. Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Molecular Microbiology* [online]. **29**(2), 605–615. ISSN 0950-382X, 1365-2958. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00957.x

SOCHOROVÁ, Z., 2010. *Tvorba biofilmů u bakterií* [online]. B.m. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Dostupné z: https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/26743/BPTX_2009_2_11310_0_199800_0_79054.pdf?sequence=1&isAllowed=y

SRINIVASAN, R., S. SANTHAKUMARI, P. POONGUZHALI, M. GEETHA, M. DYAVAI AH a L. XIANGMIN, 2021. Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. *Frontiers in Microbiology* [online]. **12**, 676458. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2021.676458

STEPANOVIĆ, S., D. VUKOVIĆ, V. HOLA, G. BONAVENTURA, S. DJUKIĆ, I. ĆIRKOVIĆ a F. RUZICKA, 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* [online]. **115**(8), 891–899. ISSN 0903-4641, 1600-0463. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x

THERMO FISHER SCIENTIFIC INC, 2019. *AlamarBlue™ Cell Viability Reagent. PRODUCT INFORMATION SHEET. Pub. No. MAN0018317 Rev. C.0* [online]. 2019. B.m.: Invitrogen. Dostupné z: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0018317_alamarBlueCVS_PI.pdf

TINY CONSPIRACIES - BONNIE BASSLER (PRINCETON/HHMI), 2012. *kanál uživatele: iBiology* [online]. [youtube]. 2012. TINY CONSPIRACIES - BONNIE BASSLER (PRINCETON/HHMI).

VESTBY, L.K., T. GRØNSETH, R. SIMM a L.L. NESSE, 2020. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics* [online]. **9**(2), 59. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics9020059

WIJESINGHE, G., A. DILHARI, B. GAYANI, N. KOTTEGODA, L. SAMARANAYAKE a M. WEERASEKERA, 2019. Influence of Laboratory Culture Media on in vitro Growth, Adhesion, and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Medical Principles and Practice* [online]. **28**(1), 28–35. ISSN 1011-7571, 1423-0151. Dostupné z: doi:10.1159/000494757

XU, K.D., P.S. STEWART, F. XIA, C.T. HUANG a G.A. MCFETERS, 1998. Spatial Physiological Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Is Determined by Oxygen Availability. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **64**(10), 4035–4039. ISSN 0099-2240, 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.64.10.4035-4039.1998