

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**VIZUALIZACE BIOFILMOVÝCH SPOLEČENSTVÍ  
BAKTERIE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* POMOCÍ  
FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE**

**ERIK ZACHAR**

**Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Pavlína Vávrová**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2024**

## **Poděkování**

Velké poděkování patří RNDr. Pavlíně Vávrové především za její podnětné rady a odbornou pomoc při sepisování práce a během experimentů. Mnohokrát bych poděkoval za přátelské jednání, věnovaný čas, trpělivost, ale i konstruktivní kritiku a objektivní náhled, což mi přineslo řadu zkušeností, které jistě využiji i v budoucnu.

Rád bych také poděkoval všem blízkým a přátelům za podporu během sepisování práce.

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

V Hradci Králové 23. 4. 2024

Erik Zachar

# 1. OBSAH

2.	ABSTRAKT .....	7
3.	ABSTRACT .....	8
4.	ÚVOD .....	9
5.	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE .....	10
6.	TEORETICKÁ ČÁST .....	11
6.1	Bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	11
6.2	Biofilmy bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	12
6.2.1	Složení biofilmů .....	12
6.2.2	Formování biofilmů bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
6.3	Klinický dopad biofilmů <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	17
6.3.1	Antibiotická rezistence .....	17
6.3.2	Infekce pacientů s cystickou fibrózou .....	19
6.3.3	Infekce spojené s kolonizací lékařských přístrojů .....	20
6.3.4	Infekce chronických ran a popálenin .....	21
6.4	Vizualizace biofilmů pomocí fluorescenční mikroskopie .....	22
6.4.1	Fluorescenční barvivo FM 1-43 .....	24
6.4.2	Fluorescenční barvivo SYPRO Ruby .....	25
6.4.3	Fluorescenční barvivo SYTO 9 .....	26
6.4.4	Fluorescenční barvivo propidium jodid .....	27
6.4.5	Fluorescenční barvivo kalkofluorová běloba .....	28
7.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	30
7.1	Seznam použitého materiálu .....	30
7.2	Použitá kultivační média .....	31
7.2.1	Bujón infuze mozkové a srdeční tkáně (Brain-Heart Infusion, BHI) .....	31
7.2.2	Mueller-Hinton bujón (MHB) .....	32
7.2.3	Trypto-kasein sójový bujón (Tryptic soy broth, TSB) .....	32
7.2.4	RPMI médium .....	32
7.2.5	Lubbockovo médium simulující chronickou ránu .....	32
7.3	Příprava barvicích roztoků .....	33

7.3.1	Zásobní roztok FM 1-43 .....	33
7.3.2	Roztok FM 1-43 pro následnou kombinaci s CW .....	33
7.3.3	Roztok SYPRO Rubý a FM 1-43 (kombinace A) .....	33
7.3.4	Roztok SYPRO Rubý a FM 1-43 (kombinace B) .....	34
7.3.5	Roztok SYPRO Rubý a FM 1-43 (kombinace C) .....	34
7.3.6	Roztok FM 1-43 a PI .....	34
7.3.7	Roztok SYTO 9 a PI .....	34
7.3.8	Roztok SYTO 9 a SYPRO Rubý (kombinace A) .....	35
7.3.9	Roztok SYTO 9 a SYPRO Rubý (kombinace B) .....	35
7.4	Pracovní postup .....	37
7.4.1	Příprava .....	37
7.4.2	Formování biofilmů .....	37
7.4.3	Barvení a pozorování biofilmů .....	40
8.	VÝSLEDKY .....	42
8.1	Hodnocení vlivu kultivačních médií na formování biofilmů bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	42
8.1.1	Vliv média BHI .....	42
8.1.2	Vliv média MHB .....	43
8.1.3	Vliv média TSB + 10 % LP .....	44
8.1.4	Vliv média RPMI + 10 % LP .....	45
8.1.5	Vliv Lubbock média .....	46
8.2	Optimalizace barvicích směsí pro vizualizaci biofilmů bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	47
8.2.1	Barvení směsí 2 .....	47
8.2.2	Barvení směsí 3 .....	48
8.2.3	Barvení směsí 4a .....	49
8.2.4	Barvení směsí 4b .....	51
8.2.5	Barvení směsí 4c .....	53
8.2.6	Barvení směsí 5 .....	55
8.2.7	Barvení směsí 6 .....	56
8.2.8	Barvení směsí 7a .....	57
8.2.9	Barvení směsí 7b .....	58
9.	DISKUSE .....	61

10. ZÁVĚR .....	66
11. POUŽITÉ ZKRATKY.....	67
12. SEZNAM TABULEK .....	70
13. SEZNAM OBRÁZKŮ .....	71
14. POUŽITÁ LITERATURA.....	73

## 2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

**Studijní obor:** Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

**Autor:** Erik Zachar

**Školitel:** RNDr. Pavlína Vávrová

**Název bakalářské práce:** Vizualizace biofilmových společenství bakterie *Pseudomonas aeruginosa* pomocí fluorescenční mikroskopie

**Cíl práce:** Cílem teoretické části práce bylo zpracovat přehled recentních dat o biofilmech bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, jejich klinický význam a dostupné metody vizualizace pomocí fluorescenční mikroskopie. V rámci experimentální práce bylo úkolem provedení optimalizace barvení biofilmů pomocí směsí fluoroforů. Dílčím cílem pro hodnocení vhodných barvicích směsí bylo hodnocení vlivu kultivačních médií na nárůst biofilmů bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

**Metody:** Formování biofilmů bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) v nutričně rozdílných kultivačních médiích v mikrotitrační destičce, příprava směsí fluorescenčních barviv a následné hodnocení naformovaných biofilmů barvených připravenými směsmi pomocí epifluorescenční mikroskopie.

**Výsledky:** V rámci experimentální části práce byla jako nejvhodnější média pro formování biofilmů bakterie *Pseudomonas aeruginosa* stanovena: infuze mozkové a srdeční tkáně, trypto-kasein sojový bujón suplementovaný lidskou plasmou a Lubbockovo médium simulující chronické rány. Tato média byla také dále využita pro formování biofilmů v rámci optimalizace fluorescenčních směsí. Nejefektivnější kombinace barvicích směsí pro vizualizaci biofilmů *Pseudomonas aeruginosa* byly kombinace fluoroforů SYTO 9, propidium jodid a kalkofluorová běloba (případně jen kombinace SYTO 9 a propidium jodid), dále FM 1-43 a SYPRO Ruby o 20% (v/v) koncentraci, dále FM 1-43 a kalkofluorová běloba a nakonec SYTO 9 a SYPRO Ruby o 50% (v/v) koncentraci.

**Závěry:** Teoretická část poskytuje relevantní informace o biofilmových společenstvích bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. V rámci experimentální části byla stanovena nejvhodnější kultivační média a popsány metodické postupy vedoucí k efektivní vizualizaci těchto biofilmů.

**Klíčová slova:** *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, biofilmová matrice, viabilita bakteriálních buněk

### 3. ABSTRACT

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biological and Medical Sciences**

**Study programme:** Laboratory diagnostics in health care

**Author:** Erik Zachar

**Supervisor:** RNDr. Pavlína Vávrová

**Title of the bachelor thesis:** Visualization of biofilm consortia of *Pseudomonas aeruginosa* using fluorescent microscopy

**Background:** The aim of the thesis was to process current data of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, its clinical impact, and visualisation by fluorescent microscopy. In the experimental part of the thesis, optimisation of biofilm staining using fluorescent dye mixtures was made. The partial objective for the evaluation of appropriate staining mixtures was the determination of the impact of the cultivation media on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms growth.

**Methods:** *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) biofilm formation in nutritionally different cultivation media in a microtiter plate, preparation of fluorescent dye mixtures, and subsequent evaluation of the formed biofilms stained by the prepared mixtures using epifluorescent microscopy.

**Results:** In the experimental part, the most suitable media for the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms were revealed: brain-heart infusion, tryptic-soy broth supplemented with human plasma, and Lubbock chronic wound model. These media were used for the subsequent formation of biofilms within the optimisation of the fluorescent dye mixtures. The most effective mixtures for *Pseudomonas aeruginosa* biofilms visualisation were these combinations of fluorophores: SYTO 9, propidium iodide, and calcofluor white (alternatively only SYTO 9 and propidium iodide combination), then FM 1-43 and SYPRO Ruby at 20% (v/v) concentration, then FM 1-43 and calcofluor white, and finally SYTO 9 and SYPRO Ruby at 50% (v/v) concentration.

**Conclusions:** The theoretical part contains relevant information about the biofilms of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. In the experimental part, the most appropriate cultivation media were evaluated, and methodological approaches leading to effective visualisation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms were described.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, biofilm matrix, bacterial cell viability



## 4. ÚVOD

Jednou z hybných sil v živé přírodě je přirozeně schopnost přežití. To se v případě některých mikroorganismů projevilo schopností tvorby mnohobuněčných struktur obklopených extracelulárními produkty. Tyto struktury jsou označovány jako biofilmová společenství. Soužití ve struktuře biofilmů přináší mikroorganismům skutečně mnohem vyšší odolnost vůči nepříznivým vnějším podmínkám. V případě infekcí spojených s biofilmy to tedy také znamená nižší odpověď na léčbu antibiotiky.

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je jedním z klíčových producentů biofilmů. Její přirozená rezistence vůči antibiotikům společně s tvorbou biofilmů přináší zásadní úskalí v řešení infektů spojených s touto bakterií. Velkým problémem této bakterie je také schopnost vytvářet biofilmy nejen v těle pacienta, ale i na zařízeních, které jsou spojeny s léčbou pacienta, např. katétry a endotracheální trubice.

Za účelem vývoje nových léčiv umožňující cílenou eliminaci a prevenci tvorby biofilmů je potřeba, aby lidstvo prvně pochopilo jejich strukturu, složení a mechanismy tvorby. Je tedy zapotřebí, aby existovaly efektivní přístupy vedoucí ke studiu biofilmů. Jedním z dílčích metodik tohoto studia je fluorescenční mikroskopie umožňující přímou vizualizaci biofilmů pomocí fluorescenčních barviv.

## 5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo zpracovat přehlednou rešerši problematiky týkající se biofilmů bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, jejich klinického významu a možností vizualizace pomocí fluorescenční mikroskopie. V experimentální části práce byl kladen důraz na hlavní cíl – optimalizace metodiky vedoucí k efektivní vizualizaci biofilmů bakterie *Pseudomonas aeruginosa* se zaměřením na specifické kombinace flouoroforů. Dílčím cílem bylo hodnocení vlivu nutričně rozdílných kultivačních médií na tvorbu biofilmů bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

## 6. TEORETICKÁ ČÁST

### 6.1 Bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) je tyčinkovitá gramnegativní bakterie s ubikvitárním rozšířením netvořící spory. Jedná se o nefermentující bakterii, která díky preferenci aerobního způsobu života získává energii oxidací. Pohybuje se na základě přítomnosti jednoho bičíku umístěným polárně. Disponuje širokým spektrem metabolických drah a regulačních genů, takže se snadno adaptuje na měnící se vnější podmínky. U této pseudomonády lze také pozorovat významnou antibiotickou rezistenci a řadu virulenčních faktorů, mezi které řadíme i tvorbu biofilmů (1, 2).

*P. aeruginosa* způsobuje nejen infekce rostlin a živočichů, ale u lidí vyvolává především oportunní infekce, které jsou často nozokomiálního charakteru, doprovázené vysokou morbiditou a mortalitou. Ty pozorujeme zejména u pacientů se závažnými popáleninami, cystickou fibrózou a u imunokompromitovaných nebo polymorbidních pacientů (1, 3).

*P. aeruginosa* patří do skupiny ESKAPE patogenů zahrnující multirezistentní bakterie – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter* spp. Skupina patogenů ESKAPE je celosvětově zodpovědná za většinu nozokomiálních infekcí. Ruku v ruce s rostoucí antibiotickou rezistencí těchto patogenů je zvýšená mortalita. Jedná se tak o patogeny představující globální hrozbu pro lidské zdraví (4, 5).

Světová zdravotnická organizace (World Health Organization, WHO) zařadila v roce 2017 *P. aeruginosa* na seznam bakterií, vůči kterým je třeba neprodleně provádět další výzkum a vývoj nových antibiotik. V tomto seznamu byla *P. aeruginosa* uvedena jako bakterie s nejvyšší prioritou společně s *Acinetobacter baumannii* a s čeledí *Enterobacteriaceae* (6).

## **6.2 Biofilmy bakterie *Pseudomonas aeruginosa***

Biofilmy bakterie *P. aeruginosa* jsou považovány za jeden z jejích významných virulenčních faktorů. Obecně lze biofilmy definovat jako hromadné seskupení komunikujících mikrobiálních buněk, které jsou připevněné k biotickému či abiotickému povrchu, případně k sobě navzájem. Okolo těchto buněk se nachází jejich extracelulární polymerní látka, tvořící tzv. biofilmovou (extracelulární) matici (7).

*P. aeruginosa* dokáže kolonizovat a tvořit biofilmy na biotických strukturách, ale také na široké škále abiotických struktur, mezi nejkritičtější patří lékařské přístroje a další zdravotnické pomůcky (katétry, implantáty, kontaktní čočky, ...). Následkem kolonizace zmíněných materiálů mohou být získané nozokomiální infekce u hospitalizovaných pacientů (8).

### **6.2.1 Složení biofilmů**

Udává se, že biofilmová matrice zaujímá asi 90 % z celkové hmoty biofilmů, zbytek tvoří mikrobiální buňky *P. aeruginosa*. Matrice se převážně skládá z polysacharidů (především Psl, Pel a alginát), extracelulární DNA (eDNA), proteinů a lipidů. Konkrétní složení matrice se ale liší v závislosti na různých vnějších podmínkách, stáří biofilmu, typu povrchu a je jiné také u různých kmenů *P. aeruginosa* (9).

Matrice biofilmů zajišťuje nejen ochranu vůči měnícím se vnějším podmínkám, ale funguje též jako adhezní a stabilizační složka. Nalézáme u ní nutritivní význam, a také pomáhá zabezpečovat intercelulární komunikaci označovanou jako *quorum sensing*. Zásadní význam hraje také v antibiotické rezistenci, mikroorganismy žijící ve formě biofilmů mohou být až 1000× odolnější vůči antibiotikům, než buňky volné, označované též jako planktonní (9–11).

#### **6.2.1.1 Polysacharidy biofilmové matrice**

##### **6.2.1.1.1 Psl polysacharid**

Psl je neutrální polysacharid bohatý na D-mannózu a galaktózu. Podílí se na prvotní adhezi planktonních buněk k povrchu. V brzkých stádiích biofilmů se váže na bakteriální povrch a zlepšuje mezibuněčné interakce. Zralé biofilmy obsahují Psl

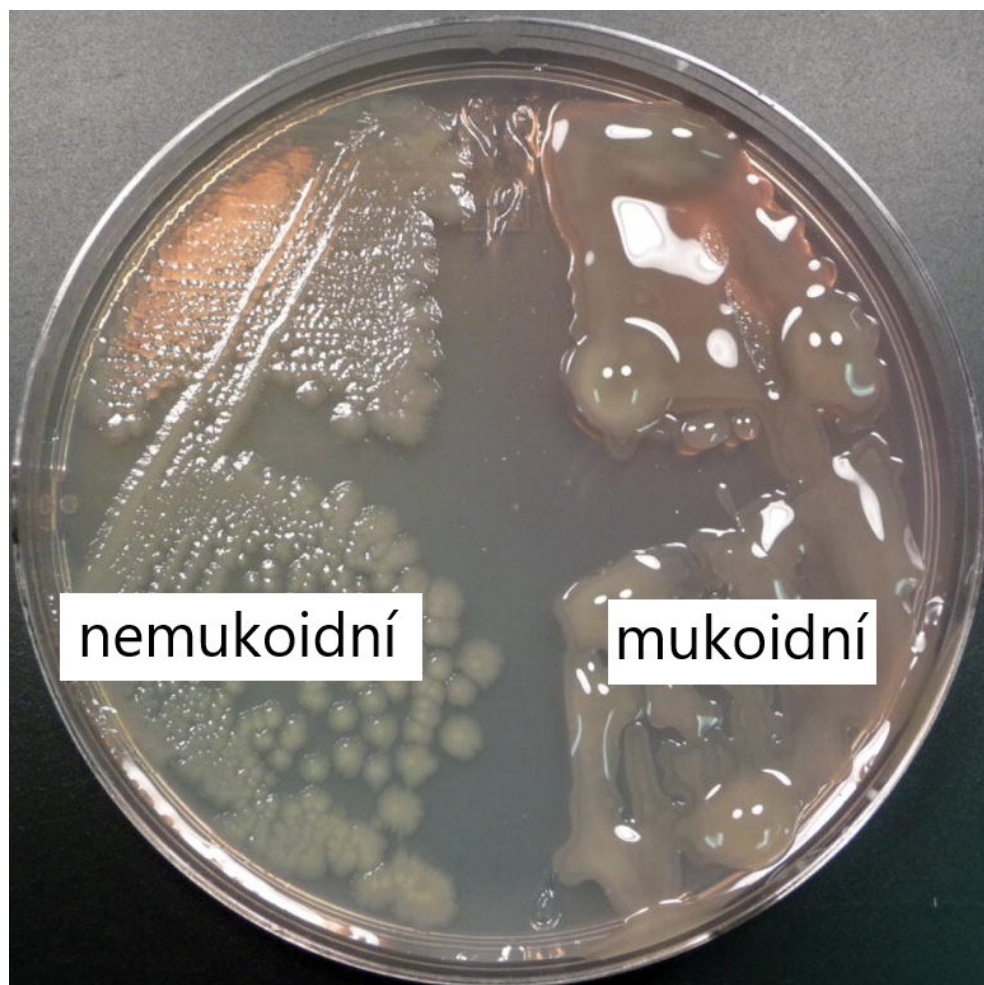
převážně na periferii, kde tvoří síť, což přispívá k udržení charakteristického houbovitému tvaru a umožňuje pozdější disperzi vyzrálých biofilmů. U Psl byla také objevena signalizační funkce – slouží jako stimulant tvorby druhého posla cyklického diguanosinmonofosfátu (c-di-GMP), který v konečném důsledku stimuluje tvorbu Psl. Jedná se tedy o unikátní regulační mechanismus s pozitivní zpětnou vazbou. Psl také dokáže limitovat fagocytózu zprostředkovanou neutrofily tak, že omezuje opsonizaci komplementárními bílkovinami. Psl mimo jiné hraje roli při antibiotické rezistenci (8, 12, 13).

#### 6.2.1.1.2 *Pel polysacharid*

Pel je kladně nabitý polysacharid složený především z *N*-acetylglukosaminu a *N*-acetylgalaktosaminu. Zabezpečuje intercelulární biofilmové interakce a ve tvořících se biofilmech funguje jako opěrný systém, především v raných fázích. Zásadní roli hraje ve formování tzv. pelikulárního biofilmu, tj. typu biofilmu tvořící se na rozhraní kapaliny a vzduchu. U tohoto polysacharidu byla též pozorována inhibiční vlastnost vůči aminoglykosidům (8, 14).

#### 6.2.1.1.3 *Alginát*

Tento aniontový polysacharid je složen z L-guluronové kyseliny a D-mannuronové kyseliny spojené  $\beta$ -1-4 glykosidickou vazbou. Alginát je ve velké míře přítomen převážně u izolátů *P. aeruginosa* z chronických infekcí pacientů s cystickou fibrózou. Důsledkem přítomnosti alginátu získávají kolonie *P. aeruginosa* mukoidní charakter, který je patrný i při izolaci na kultivačních médiích (Obrázek 1). Alginát chrání před vnějšími nepříznivými vlivy, zajišťuje strukturální stabilitu a udržuje v biofilmové matrici vodu a živiny. Přispívá k rezistenci vůči antibiotikům a fagocytóze. Společně s Psl se podílí na charakteristickém houbovitému vzhledu vyzrálých biofilmů (8, 13, 15).



Obrázek 1 Fenotypy bakterie *Pseudomonas aeruginosa* na pseudomonádovém izolativním agaru.

Převzato a upraveno (16)

### 6.2.1.2 eDNA biofilmové matrice

eDNA je další významnou složkou biofilmové matrice, která zabezpečuje adhezi k povrchu a strukturální organizaci buněk v biofilmech, je také důležitým faktorem vyzrání biofilmů. U vyzrálých biofilmů je eDNA nejvíce zastoupena ve „stopkách“ houbových struktur. eDNA hraje také zásadní roli v antibiotické rezistenci biofilmů. Důsledkem svého negativního náboje dokáže vazbou inhibovat některá pozitivně nabitá antibiotika, např. aminoglykosidy a antimikrobní peptidy. Pomáhá také snižovat pH biofilmů, tím se opět může snížit prostupnost některých antibiotik. Dále se chová jako chelátor, vychytává dvojmocné ionty ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  a  $Zn^{2+}$ ), což zvyšuje stabilitu biofilmů důsledkem elektrostatických interakcí. eDNA může sloužit sama o sobě jako nutriční zdroj pro bakterie při nedostatku nutriční. Má schopnost aktivovat neutrofilů, a slouží tak jako prozánětlivý komponent matrice (13, 15, 17).

### **6.2.1.3 Proteiny biofilmové matrice**

Jedním z klíčových proteinů, které lze nalézt v matrici je CdrA, primárně se však nachází na povrchu bakterií. Vlastní proteáza (LapG) pak dokáže tento protein štěpit z bakteriálního povrchu a uvolňuje jej do matrice. Tento protein je zodpovědný za agregaci biofilmů a přispívá k jejich stabilitě. Ta je dána interakcemi molekul CdrA mezi sebou navzájem nebo interakcemi s polysacharidy Psl a Pel. Těmito mezimolekulovými spoji je také CdrA chráněn před působením proteáz. Experimentálně bylo zjištěno, že mutantní kmeny pro protein CdrA tvořily menší množství biofilmové biomasy (18, 19).

### **6.2.1.4 Lipidy biofilmové matrice**

Komponentem matrice mohou být i rhamnolipidy. Jedná se o povrchově aktivní glykolipidové surfaktanty tvořené zbytkem L-rhamnózy a zbytkem mastné kyseliny spojené *O*-glykosidickou vazbou (20).

V iniciačních fázích rozvoje biofilmů nízké koncentrace rhamnolipidů zvyšují počáteční adherenci bakterií k povrchu, avšak jejich nadprodukce vývoji biofilmů brání. Ve zralých biofilmech se produkce vhodného množství rhamnolipidů podílí na udržení kanálů zajišťující přítok živin. V plicní tkáni významně zvyšují virulenci *P. aeruginosa*, kde degradují plicní surfaktant a rozrušují těsná spojení mezi pneumocyty. Dále napomáhají uvolňování planktonních buněk do okolí. Působí cytotoxicky na neutrofilů, čímž mohou limitovat působení imunitního systému (20, 21).

## **6.2.2 Formování biofilmů bakterie *Pseudomonas aeruginosa***

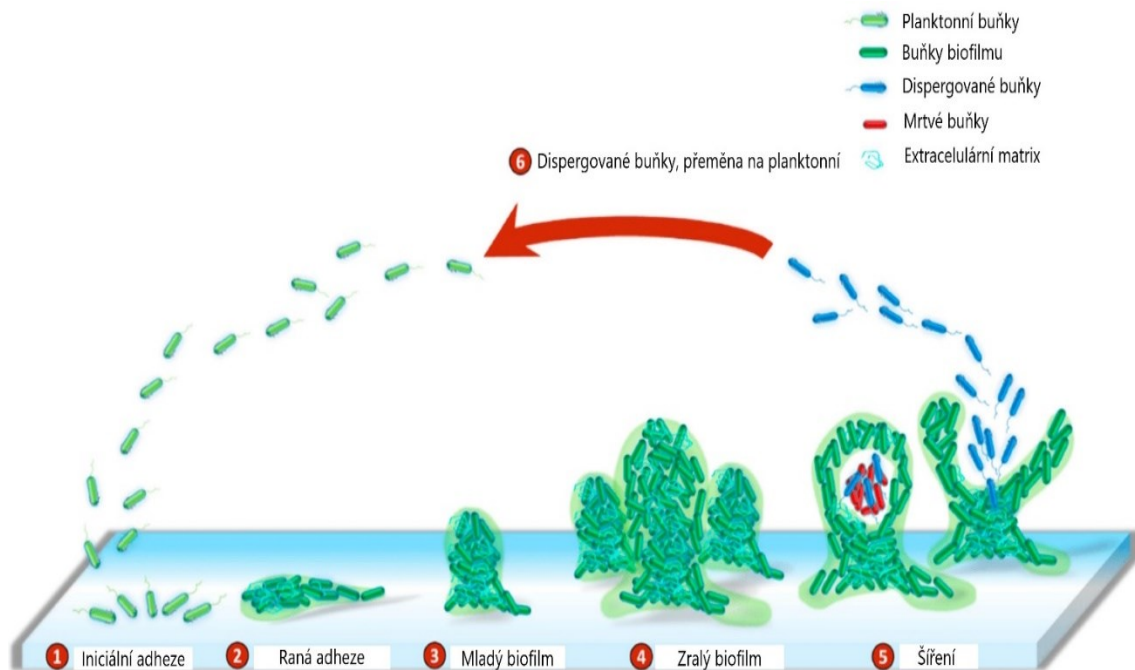
Tvorba biofilmů je proces, který lze rozdělit do několika stádií, jak je znázorněno na Obrázku 2 (viz níže). V prvním kroku dochází k reverzibilní adhezi planktonních buněk k povrchu za pomoci specifických adhezínů – bičík, pili typu IV anebo Cup fimbrie. Adherenci také pomáhá zajišťovat Psl polysacharid a dále lipopolysacharid přítomný na vnější membráně bakteriálních buněk. K adhezi dochází důsledkem fyzikálně-chemických vlastností povrchu. Po přisednutí může buňka stále putovat po povrchu anebo jej zcela opustit. Některé buňky mohou podstoupit další fázi, kdy na základě molekulárních interakcí povrchu a specifických adhezínů dojde k ireverzibilnímu

připoutání k povrchu. Vznikají tak přisedlé buňky, které se fyziologicky odlišují od buněk planktonních (10, 15).

V další fázi dochází k dělení přisedlých buněk a produkci matrice, tím vznikají mikrokolonie – základ „stopky“ houbovitě struktury biofilmů. V této fázi dochází k intenzivnímu uvolňování eDNA. Ta je uvolňována z buněk buď prostřednictvím membránových váčků anebo lýzou buněk, to vše zprostředkované systémem *quorum sensing*. Tato eDNA se pak objevuje na povrchu mikrokolonií. Bylo zjištěno, že pili typu IV mají silnou afinitu k eDNA. Pohyblivé buňky tak mohou využít tuto eDNA na povrchu mikrokolonií a svými pili typu IV přisednout. Důsledkem přisednutí pohyblivých buněk a následně jejich dělením vzniká „čepička“, mikrokolonie tak získávají svůj houbovitý tvar. Uvnitř biofilmů nacházíme kanálky, které jsou udržovány vlivem rhamnolipidů. Jimi pak proudí kapaliny s nutrienty (10, 15).

Jedním z charakteristických rysů zralých biofilmů je jejich trojrozměrná houbovitá struktura se subpopulacemi bakterií s odlišnými metabolickými pochody. Metabolická aktivita subpopulací je ovlivněna dostupností kyslíku a živin. Vysoce metabolicky aktivní buňky s lepším přístupem kyslíku a živin se tedy nacházejí na periferii biofilmů, kdežto metabolicky méně aktivní buňky jsou lokalizovány uvnitř. Poslední fází vývoje biofilmů je jejich disperze. V čepičce biofilmů dochází prostřednictvím buněčné autolýzy k vytvoření matricové dutiny a následnému uvolnění buněk z biofilmů. Dispergované buňky mají odlišnou fyziologii jak od usedlých, tak od planktonních buněk, a jsou silně virulentní. K jejich přeměně na standardní planktonní buňky, které jsou opět schopné tvořit nové mikrokolonie, dochází přibližně po dvou hodinách od uvolnění ze zralých biofilmů (9, 22, 23).





Obrázek 2 Schéma formování biofilmu.

Převzato a upraveno (22)

### 6.3 Klinický dopad biofilmů *Pseudomonas aeruginosa*

Dle odhadů je až 65 % infekcí způsobeno biofilmy obecně, chronické infekce jsou s nimi asociovány z více jak 80 %. Jedním z nejkritičtějších biofilmových producentů je právě bakterie *P. aeruginosa*. Imunitní systém hostitele nedokáže tato biofilmová společenství efektivně eliminovat, stejně tak konvenční antibiotická terapie v těchto případech často selhává. Perzistence biofilmů v místě infekce způsobuje chronickou zánětlivou odpověď, jejímž důsledkem může být i poškození přilehlých tkání (24, 25).

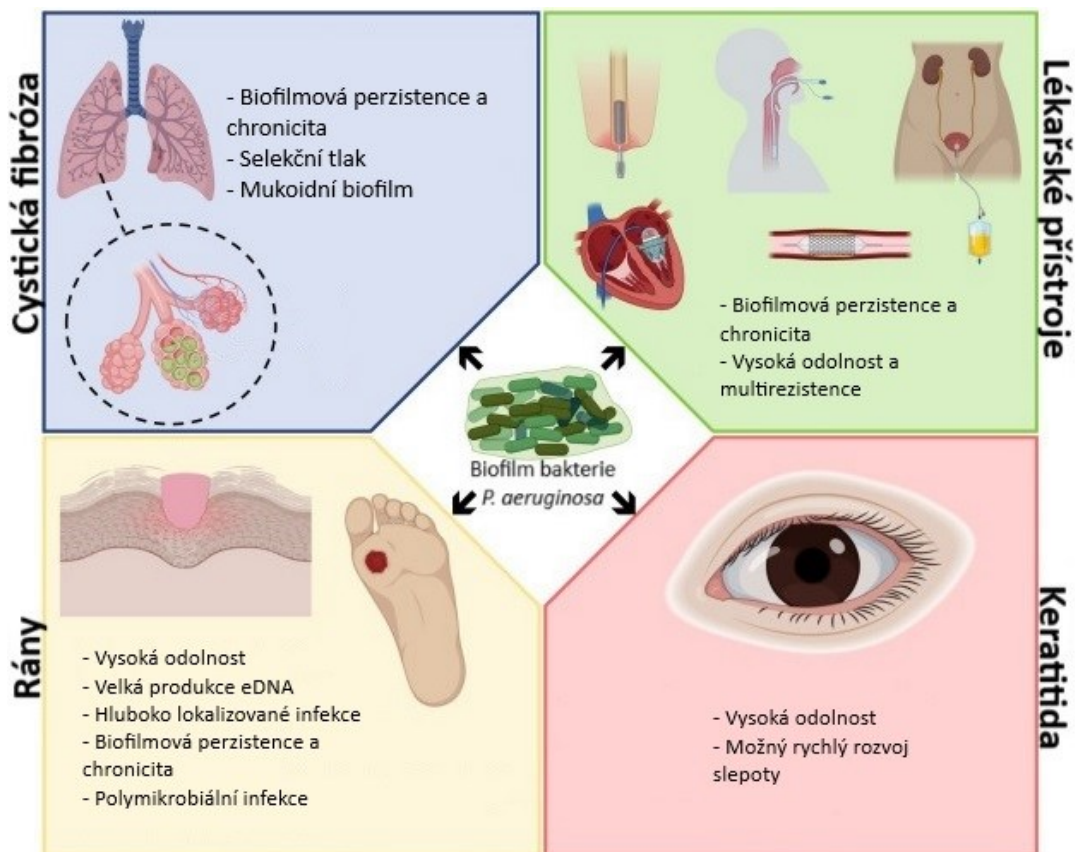
*P. aeruginosa* v klinické praxi tvoří monodruhové ale i polydruhové biofilmy obsahující další zástupce bakterií, ale i fungálních agens. Infekce způsobené polydruhovými biofilmy mívají obvykle horší prognózu (25).

Infekce spojené s biofilmy *P. aeruginosa* a jejich hlavní aspekty jsou znázorněny na Obrázku 3.

#### 6.3.1 Antibiotická rezistence

Jak již bylo zmíněno, biofilmy obecně, a stejně tak biofilmy bakterie *P. aeruginosa* jsou tvořeny různými subpopulacemi buněk, které se liší svými metabolickými pochody.

Bakterie uvnitř biofilmů tvoří subpopulace metabolicky méně aktivních buněk (tzv. dormantní buňky). Dormantní buňky jsou díky značnému omezení své metabolické aktivity odolné vůči většině antibiotikům. Po skončení antibiotické terapie mohou mikroorganismy plně obnovit své metabolické pochody, a znovu tak rozšířit biofilmovou biomasu. Ke zvýšení odolnosti biofilmů přispívá i již zmiňovaná biofilmová matrice. Ještě odolnější je mukoidní fenotyp *P. aeruginosa* díky nadprodukcí alginátu. Důsledkem těchto vlivů je k účinné léčbě potřeba dosáhnout v místě infekce vyšších koncentrací antibiotik, což je v klinické praxi téměř nemožné bez toho, aniž by se projevil toxické účinky antibiotik na hostitelský organismus. U pacientů s chronickými infekcemi navíc může docházet k opakované neúspěšné léčbě antibiotiky, a tímto způsobem se tak může rozvíjet další antibiotická rezistence (9, 25–27).



Obrázek 3 Charakteristika častých biofilmových infekcí *Pseudomonas aeruginosa*.

Převzato a upraveno (25)

### 6.3.2 Infekce pacientů s cystickou fibrózou

Cystická fibróza (CF) je dědičné autosomálně recesivní onemocnění vedoucí k multisystémovému postižení. Nemocní mají mutovaný gen kódující protein regulátoru transmembránové vodivosti cystické fibrózy (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR). CFTR fyziologicky reguluje transport vody a iontů přes epitelální vrstvy. Mutantní forma proteinu CFTR naopak způsobuje neefektivní transport iontů a vody přes epitel, což vede k dehydrataci a sekreci viskózního hlenu v řadě orgánů. Symptomy tohoto onemocnění se pak nejčastěji manifestují v dýchacích cestách, gastrointestinálním traktu, pankreatu, hepatobiliárních cestách a v mužském pohlavním traktu. V dýchacích cestách, kde je přítomen tento viskózní hlen, a zároveň je zde narušený mukociliární transport, dochází k vytvoření vhodného prostředí pro osídlení mikroorganismy (25, 28, 29).

Dýchací cesty pacientů s CF tedy vytváří ideální prostředí pro vznik biofilmů bakterie *P. aeruginosa*, což je potvrzováno jak vyšetřením sputa, tak autoptickými nálezy. V dětském věku dochází u těchto pacientů ke kolonizaci dýchacích cest bakterií *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), později začne dominovat *P. aeruginosa*, což pro pacienty znamená horší prognózu. Polovina z pacientů s CF je infikována bakterií *P. aeruginosa* do věku 18 let, později se prevalence zvyšuje až na 80 %. Asi 40-60 % infekcí u pacientů s CF tvoří primárně *P. aeruginosa* a je jejich hlavní příčinou morbidity a mortality. Odhady uvádí, že respirační trakt je současně kolonizován bakteriemi *S. aureus* a *P. aeruginosa* u 9-60 % pacientů s CF (25, 26, 30).

V dolních cestách dýchacích pacientů s CF převládá mikroaerofilní až anaerobní prostředí. To je zapříčiněno zvýšenou produkcí hlenu a spotřebou kyslíku epitelálními buňkami, metabolicky aktivními bakteriemi a infiltrovanými neutrofily. Nedostatečná koncentrace kyslíku navíc podporuje přeměnu nemukoidního fenotypu *P. aeruginosa* na mukoidní. Mukoidní fenotyp limituje přístup kyslíku ještě více. *P. aeruginosa* reaguje na anaerobní prostředí dále tak, že své metabolické procesy přepne na alternativní metabolický pochod zvaný denitrifikace. Využívá přitom nitráty ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrity ( $\text{NO}_2^-$ ) a oxid dusný ( $\text{N}_2\text{O}$ ), přičemž koncentrace prvních dvou jmenovaných je ve sputu pacientů s CF dostatek. Bylo zjištěno, že přeměnu na mukoidní fenotyp také ovlivňuje *quorum sensing*. Tato mukoidní konverze u pacientů s CF znamená horší prognózu.

Dalšími změnami u *P. aeruginosa* u pacientů s CF je ztráta bičíku a pili typu IV, což má za následek snížené rozpoznávání imunitním systémem (9, 25, 31).

Mukoidní fenotyp se vyskytuje především u pacientů s CF s chronickou infekcí způsobenou *P. aeruginosa*. Mimo vlivu anaerobního prostředí a *quorum sensing* je dalším uplatňujícím se mechanismem konverze z nemukoidního fenotypu na mukoidní i mutace v genu *mucA*. Gen *mucA* kóduje u bakterie *P. aeruginosa* negativní regulátor transkripce stresových drah. V případě mutantní formy *mucA* genu nedochází k potlačení stresové reakce, naopak stresová odpověď se rozvíjí. To vede k potlačení bakteriálního metabolismu, motility, virulence a zvyšuje se produkce alginátu. K mutaci v genu *mucA* dochází u pacientů s CF vlivem selekčních tlaků v přítomnosti nepřátelského prostředí a opakujících se antibiotických terapií (9).

Jelikož jsou možnosti léčby pro pacienty s CF v současné době poměrně omezené, je stále aktuální potřeba dalšího výzkumu nových antibiotik. Antibiotikem první volby bývá inhalačně podávaný tobramycin, alternativou je inhalační aztreonam lysin. Současné diagnostické postupy a léčba však nedokáže zcela efektivně zastavit postup infekce do chronického stádia. Důsledkem chronického zánětu dochází k poškození tkáně bronchů a bronchiolů, což může vyústit v závažné patologické následky, potažmo až k respiračnímu selhání (26, 32, 33).

### **6.3.3 Infekce spojené s kolonizací lékařských přístrojů**

Katétry, implantáty a další lékařské přístroje mohou být snadno kolonizovány ubikvitární *P. aeruginosa*. Bakterie následně pokračují v dalším vývoji a na površích rostou pseudomonádové biofilmy. Biofilmy přirozeně mohou projít všemi cykly, včetně disperze, čímž dojde k diseminaci infekce. Bakteriémie, která se může rozvinout, je život ohrožující stav, kdy i přes moderní postupy v urgentní medicíně dosahuje mortalita mezi 27-48 %. Ačkoliv antibiotika mohou účinně likvidovat planktonní buňky, úplná eliminace zdroje infekce je nejčastěji možná až po odstranění infikovaného předmětu z těla pacienta (9, 34).

Intubace pacientů narušuje mukociliární pohyb a omezuje vykašlávání, tím dochází k akumulaci hlenu v dýchacích cestách. Tento lékařský postup je tedy rizikovým pro rozvoj infekcí dýchacích cest, které se mohou rozvinout až v pneumonii

ventilovaných nemocných (ventilator-associated pneumonia, VAP). VAP způsobená *P. aeruginosa* se vyznačuje častějším pobytem pacientů na jednotkách intenzivní péče, navíc mortalita dosahuje až 35,8 %. S rostoucí rezistencí se toto číslo přirozeně zvyšuje. S rozvojem VAP je také spojena produkce rhamnolipidů. Jak již bylo zmíněno, rhamnolipidy dokáží degradovat plicní surfaktant a rozrušovat těsné spoje mezi pneumocyty, což významně zvyšuje virulenci *P. aeruginosa* v plicích (25, 35, 36).

Pokud *P. aeruginosa* kolonizuje močové katétry, může způsobit s katétrem spojené infekce močových cest (catheter-associated urinary tract infections, CAUTIs). Udává se, že *P. aeruginosa* je zodpovědná až za 12 % nozokomiálních CAUTIs. Ty se vyznačují komplikovanějším průběhem, a oproti CAUTIs způsobenými ostatními bakteriemi mají horší prognózu. Navíc u klinických izolátů biofilmů *P. aeruginosa* mnohých pacientů s CAUTIs byla prokázána multirezistence, což léčbu těchto infekcí ještě více komplikuje (25).

Pseudomonádové biofilmy schopné růst na abiotických strukturách, kolonizují i kontaktní čočky. Dojde-li k poranění rohovky např. neopatrnou manipulací s kontaktními čočkami, může dojít k proniknutí *P. aeruginosa* epiteliální vrstvou a hrozí riziko rozvoje keratitidy. V případě *P. aeruginosa* dochází ke změně zrakové ostrosti, potenciálně až k rozvoji slepoty, to vše do několika dnů od začátku infekce (25, 37).

#### **6.3.4 Infekce chronických ran a popálenin**

Kožní rány a jejich obtížně léčitelné chronické infekce jsou trendem ve vyspělých zemích zejména důsledkem civilizačních onemocnění (jako je například obezita, diabetes mellitus, kardiovaskulární onemocnění, ...). Předpokládá se, že ve vyspělých zemích se za život setká s chronickými ranami 1-2 % populace. Díky přítomnosti přirozené mikroflóry na kůži a sliznicích jsou chronické rány infikovány zpravidla širokým spektrem mikroorganismů tvořících biofilmy. Ačkoli bylo zjištěno, že dominantní bakterií je *Staphylococcus aureus*, ostatní mikroorganismy včetně *P. aeruginosa* nejsou zanedbatelné. Udává se, že tato bakterie infikuje především hlubší vrstvy chronických ran, navíc rány, ve kterých je přítomna, mívají větší rozsah ve srovnání s ranami neinfikovanými *P. aeruginosa* (25, 26, 38).

Mezi komplikace pacientů s diabetes mellitus patří tvorba vředů na nohou. Tyto rány jsou přirozeně vhodným místem pro osídlení mikroorganismy, včetně *P. aeruginosa*. Bylo prokázáno, že léčba těchto pacientů pomocí insulinu pomáhá v rozvoji biofilmů *P. aeruginosa* prostřednictvím zvýšeného množství eDNA v místě infekce důsledkem lýzy neutrofilů a dalších buněk imunitního systému (25).

Infekce popálenin představují významnou medicínskou výzvu, a to nejen ve vyspělých zemích, ale i v rozvojových. U pacientů s popáleninami zabírajícími více jak 40 % tělesného povrchu vedou infekce těchto ran až téměř k 100% mortalitě. Infekce popálenin *P. aeruginosa* mívají obvykle velmi rychlý průběh a postižení umírají v rámci dnů či týdnů. Podobně jako v případě katétrů, tak i u infekcí ran a popálenin může docházet k diseminaci infekce, rozvoji bakteriémie a následnému multiorgánovému postižení, potažmo až ke smrti pacienta. Chronické rány osídlené *P. aeruginosa* jsou však proti infekcím popálenin spojovány s relativně nízkou mortalitou (39, 40).

#### **6.4 Vizualizace biofilmů pomocí fluorescenční mikroskopie**

Hodnocení biofilmů patří důsledkem složité biofilmové struktury, dynamiky, počtu bakteriálních buněk atd. mezi značně náročné procesy. Nejednotné protokoly pro hodnocení biofilmů navíc práci dále ztěžují. Proto je nutné, aby si každé vědecké pracoviště své postupy dále optimalizovalo. Z kapitoly 6.3 Klinický dopad biofilmů *P. aeruginosa* jasně vyplývá, že biofilmy bakterie *P. aeruginosa* znamenají závažný problém, a i s ohledem na rostoucí rezistenci samotného bakteriálního agens je třeba neustále hledat nové terapeutické strategie. Pro řádné hodnocení nových antibiofilmových strategií je v preklinické fázi testování nezbytné pracovat s adekvátními biofilmovými modely. Jedna z možností zjištění, zda je pracováno s vhodným konsorciem, je vizualizace biofilmů prostřednictvím fluorescenční mikroskopie. Mikroskopické pochopení biofilmové struktury navíc slouží k dalšímu řešení problematiky týkající se biofilmových infekcí (41).

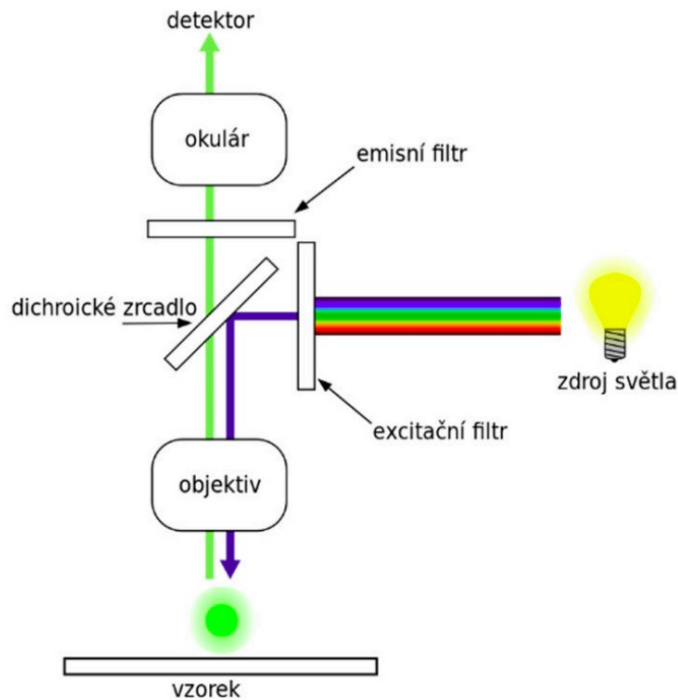
Fluorescenční mikroskopie využívá barvení vybraných struktur pomocí řady postupů. Jedním z nich je použití specificky navržených fluorescenčních molekul schopných vazby na konkrétní struktury biofilmů. Dalším způsobem je barvení pomocí fluorescenčně značených sond, např. metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

využívá značené sondy, která se váže na specifické 16S rRNA molekuly, což umožňuje lokalizovat bakterie uvnitř biofilmů. Časově náročnější metodou je genetická úprava mikroorganismů, které produkují fluorescenční proteiny (41, 42).

Mezi základní fluorescenčně-mikroskopické techniky používané v hodnocení biofilmů patří epifluorescenční mikroskopie a konfokální laserová skenovací mikroskopie (confocal laser scanning microscopy, CLSM) (42).

CLSM je fluorescenční mikroskopická nedestruktivní metoda umožňující 3D vizualizaci biofilmů. Prakticky se využívá při kvalitativním i kvantitativním hodnocení biofilmů, pomáhá objasňovat dynamiku jednotlivých komponent matrice, jejich uložení, vzájemné interakce složek matrice, celkovou strukturu biofilmů atd. Díky CLSM je také možno určit pH gradienty uvnitř biofilmů pomocí fluoresceinu (42, 43).

Epifluorescenční mikroskopie, použitá v praktické části této práce, dovoluje za použití vhodných fluoroforů u biofilmů hodnotit například viabilitu bakteriálních buněk, organizaci buněk v biofilmech, pH biofilmů, či distribuci látek ve struktuře biofilmů. Do hlavní výbavy epifluorescenčních mikroskopů patří zdroj světla umožňující excitaci fluorescenčních molekul a dále excitační a emisní filtry propouštějící vybrané vlnové délky pro účel pozorování. Základní schéma epifluorescenčního mikroskopu je znázorněno na Obrázku 4. Epifluorescenční mikroskopie neumožňuje 3D zobrazování jako CLSM. Preparáty je však možné sledovat *in situ*, případně dochází k přenosu biofilmů z povrchu, kde byly biofilmy kultivovány (např. špičkou pipety) a následně probíhá hodnocení na podložním skle (41, 42, 44, 45).



Obrázek 4 Schéma optické dráhy epifluorescenčního mikroskopu.  
Převzato (46)

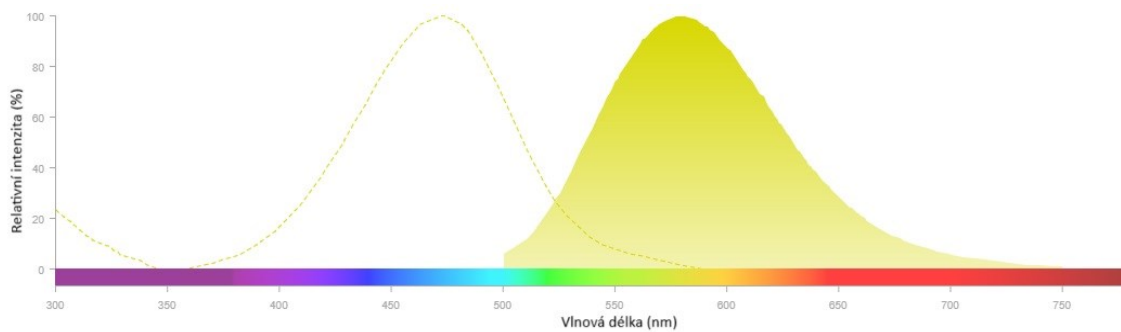
Mezi výhody fluorescenčního značení patří možnost získání bližších informací o viabilitě mikrobiálních buněk či rozmístění složek biofilmové matrice, atd. Nevýhoda této metody je časová náročnost plynoucí z přípravy preparátů, navíc je nutné pracovat při omezeném přístupu světla. Limity metody jsou také zřejmé v přípravě preparátů, kdy mnohdy dochází k destrukci původní morfologie konsorcia (41).

V praktické části této práce byly použity vybrané fluorofory, jejichž charakteristika je uvedena v následujících podkapitolách.

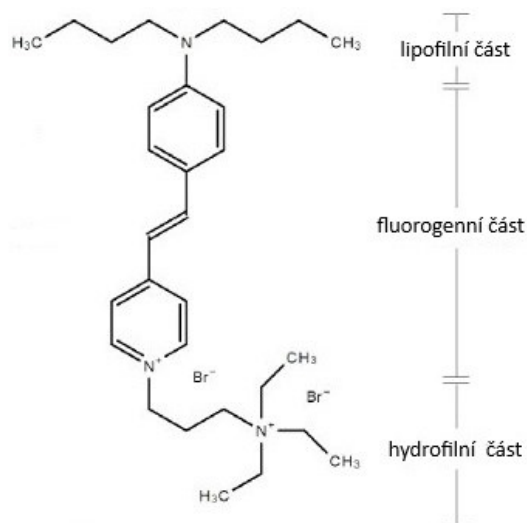
#### 6.4.1 Fluorescenční barvivo FM 1-43

Toto fluorescenční barvivo vykazující zelenou fluorescenci se používá ke značení fosfolipidové dvojvrstvy, respektive cytoplazmatické membrány, případně vezikul. Excitační maximum barviva je při vlnové délce 472 nm, emisní maximum je při 580 nm (viz Obrázek 5). Struktura barviva je znázorněna na Obrázku 6. Barvivo se částečně zanořuje lipofilní částí molekuly do plazmatické membrány, zbytek molekuly se nachází vně membrány. Fluorescence je schopné pouze navázané barvivo (47, 48).





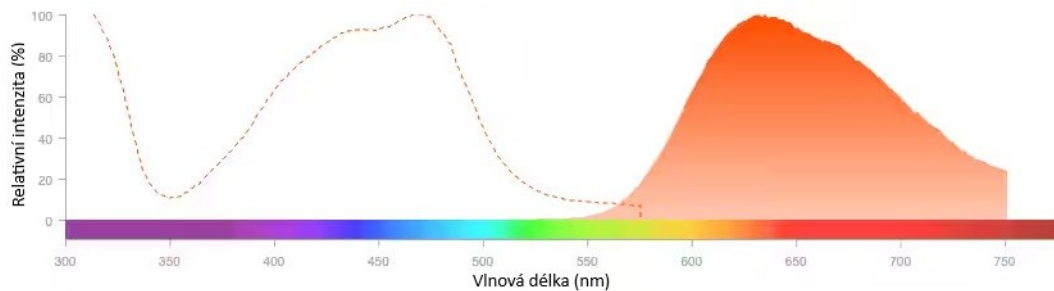
Obrázek 5 Excitační a emisní spektrum fluorescenčního barviva FM 1-43.  
Převzato a upraveno (49)



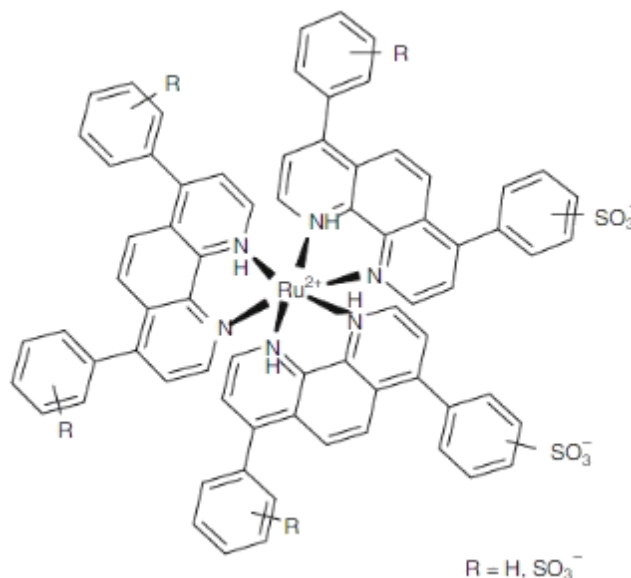
Obrázek 6 Struktura molekuly fluorescenčního barviva FM 1-43.  
Převzato a upraveno (47)

### 6.4.2 Fluorescenční barvivo SYPRO Ruby

Excitační maxima barviva SYPRO Ruby jsou při vlnových délkách 280 a 450 nm, emisní maximum je při 610 nm (viz Obrázek 7), barvivo je tedy detekovatelné v červené oblasti spektra. SYPRO Ruby se využívá při značení celé řady proteinů (glykoproteiny, fosfoproteiny, lipoproteiny, fibrilární proteiny, proteiny vázající vápenaté ionty, ...). Ve struktuře molekuly (Obrázek 8) jsou přítomné sulfonové skupiny, jimi pak molekula interaguje s aminoskupinami bílkovin, tím dochází k samotnému barvení. Centrální ruthenátový iont navíc tvoří koordinační vazby se zbytkem skeletu proteinu, takže se interakce posiluje (50, 51).



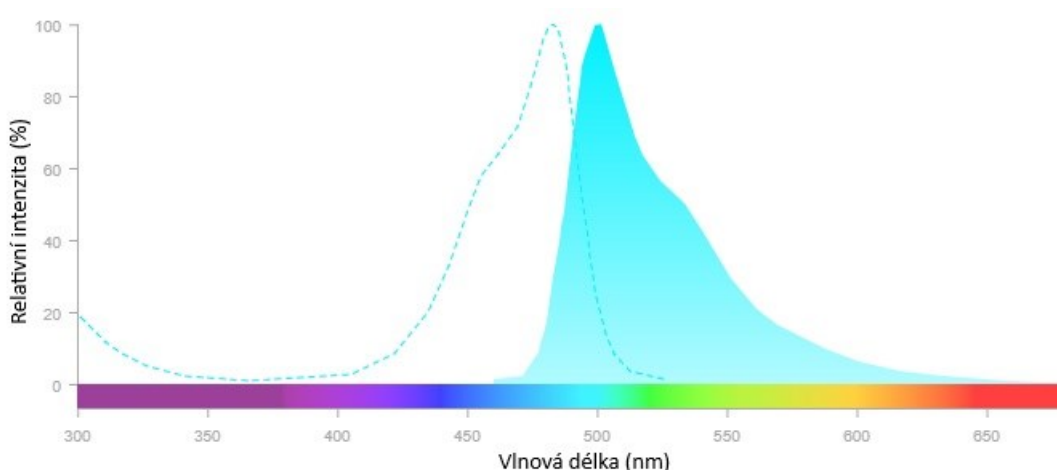
Obrázek 7 Excitační a emisní spektrum fluorescenčního barviva SYPRO Ruby.  
Převzato a upraveno (52)



Obrázek 8 Struktura molekuly fluorescenčního barviva SYPRO Ruby.  
Převzato (51)

### 6.4.3 Fluorescenční barvivo SYTO 9

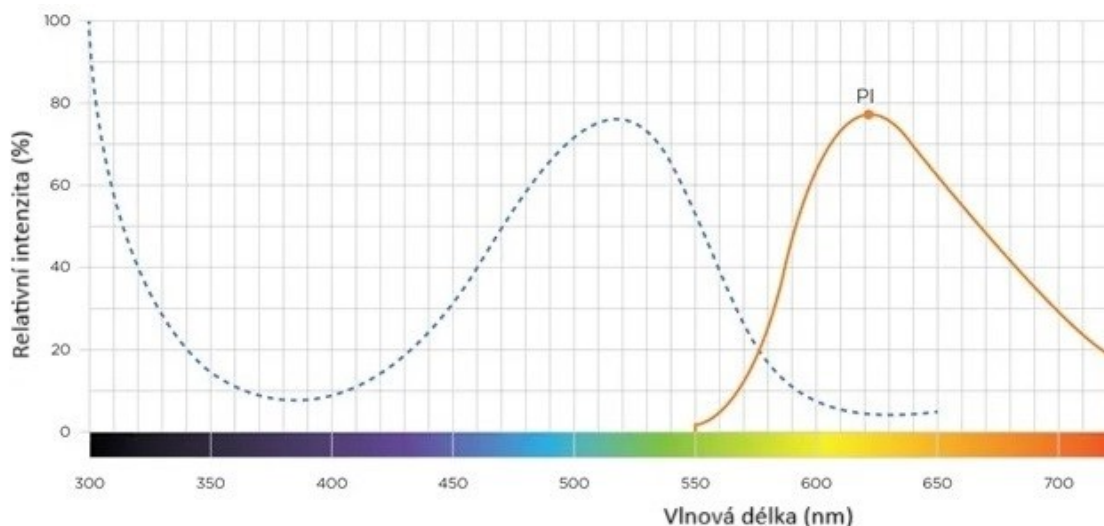
Fluorescenční barvivo SYTO 9 je patentováno, takže jeho struktura není zveřejněná. Barvivo SYTO 9 se váže na nukleové kyseliny (DNA i RNA). Dokáže prostupovat intracelulárně. V mikrobiologii se využívá v kombinaci s propidium jodidem k hodnocení viability mikrobiálních buněk. Ze spektra (Obrázek 9) vyplývá optimální excitační vlnová délka 485 nm, barvivo je následně detekováno v zelené oblasti spektra při emisním maximu 498 nm (53, 54).



Obrázek 9 Excitační a emisní spektrum fluorescenčního barviva SYTO 9.  
Převzato a upraveno (49)

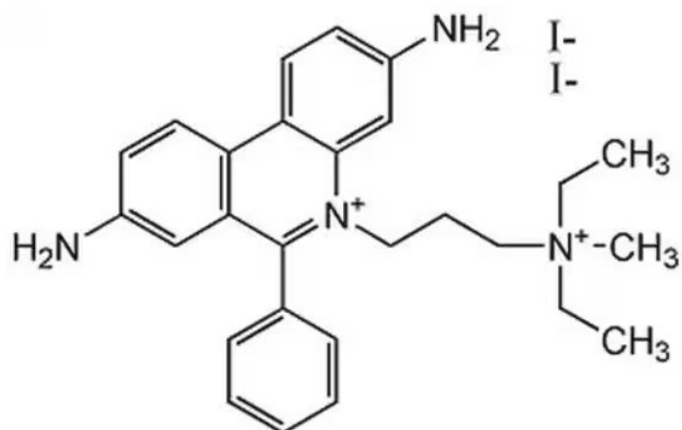
#### 6.4.4 Fluorescenční barvivo propidium jodid

Propidium jodid je fluorescenční interkalační barvivo, vážící se na DNA. Jak již bylo zmíněno, v kombinaci se SYTO 9 se využívá k hodnocení viability mikrobiálních buněk. V této kombinaci barví DNA buněk s narušenou cytoplazmatickou membránou, tj. poškozené anebo mrtvé buňky. Excitační maximum navázaného barviva na DNA je při 536 nm, emisní maximum navázaného barviva na DNA je v červené oblasti spektra při 617 nm (Obrázek 10). Struktura barviva je znázorněna na Obrázku 11 (55, 56).



Obrázek 10 Excitační a emisní spektrum navázaného fluorescenčního barviva propidium jodid na DNA.

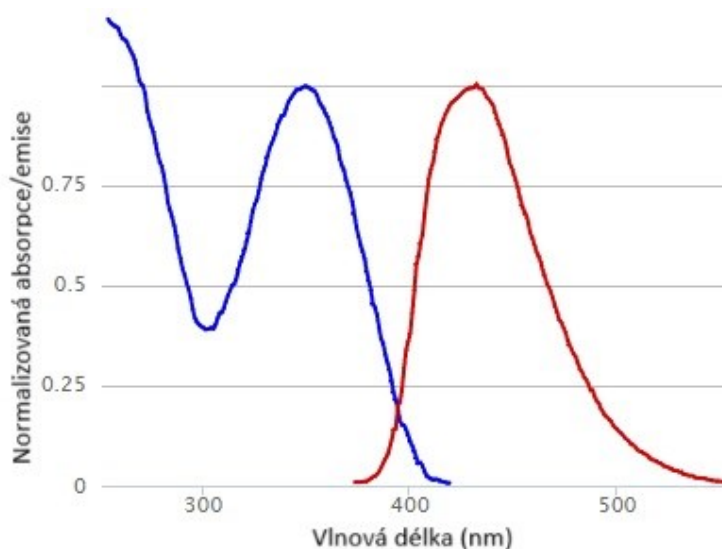
Převzato a upraveno (57)



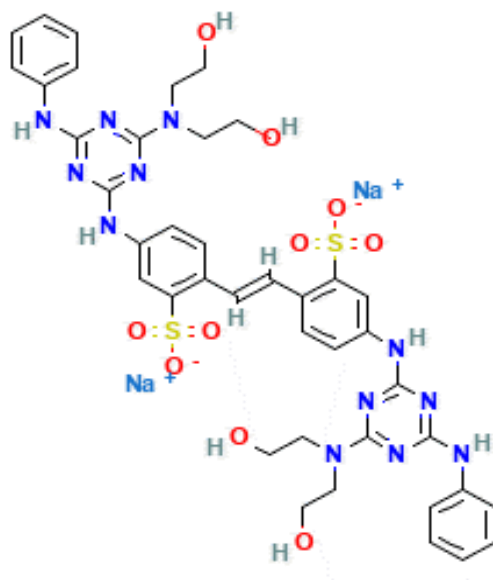
Obrázek 11 Struktura molekuly fluorescenčního barviva propidium jodid.  
Převzato (58)

#### 6.4.5 Fluorescenční barvivo kalkofluorová běloba

Toto fluorescenční barvivo našlo velké uplatnění při detekci kvasinek a plísni. Při hodnocení biofilmů slouží kalkofluorová běloba k detekci sacharidové matrice. Ze spektra (Obrázek 12) je patrné excitační maximum při 355 nm, barvivo emituje v modré oblasti spektra při emisním maximu 433 nm. Molekula kalkofluorové běloby (Obrázek 13) tvoří vodíkové můstky s  $\beta$ -1-3 a  $\beta$ -1-4 vazbami polysacharidů, po excitaci kalkofluorové běloby jsou pak tyto vazby označeny emitovaným modrým zářením (59–61).



Obrázek 12 Excitační a emisní spektrum fluorescenčního barviva kalkofluorová běloba.  
Převzato a upraveno (62)



Obrázek 13 Struktura molekuly fluorescenčního barviva kalkofluorová běloba.  
Převzato (63)

## 7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 7.1 Seznam použitého materiálu

#### Bakteriální kmen a kultivační média

- referenční bakteriální kmen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, ATCC 15692 (DSM 22644)
- Brain Heart Infusion medium, Sigma-Aldrich, USA
- Mueller-Hinton medium, Sigma-Aldrich, USA
- Bolton medium, Sigma-Aldrich, USA
- Soyabean Casein Digest Medium (Tryptic soy broth), Sigma-Aldrich, USA
- RPMI 1640 medium, Sigma-Aldrich, USA

#### Pracovní pomůcky a reagenty

- automatické pipety, různý rozsah, Eppendorf, Německo
- sterilní špičky, plastové, různý rozsah, Eppendorf, Německo
- sterilní mikrotitrační destičky s 96 jamkami a víčkem, Gamédium, Česká republika
- jednorázové očkovací kličky, Gamédium, Česká republika
- sterilní OD zkumavky, Gamédium, Česká republika
- sterilní mikrozukavky, Eppendorf, Německo
- stojánky na zkumavky a mikrozukavky, Gamédium, Česká republika
- sterilní laboratorní sklo, podložní a krycí sklíčka, P-lab, Česká republika
- plotny s Mueller-Hinton agarem, připraveny a poskytnuty pracovníky Skupiny mikrobiologie a imunologie, Katedry biologických a lékařských věd, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové
- lidská plasma, VWR, Česká republika
- lyzované beraní erytrocyty, LabMediaServis, Česká republika
- fyziologický roztok, Fresenius Kabi, Německo

- dimethylsulfoxid (DMSO), Merck, Německo
- FM 1-43, Invitrogen, USA
- SYPRO Ruby, Invitrogen, USA
- SYTO 9, Invitrogen, USA
- Propidium iodide (PI, propidium jodid), Sigma-Aldrich, USA
- Calcofluor White Stain (CW, kalkofluorová běloba), Sigma-Aldrich, USA

### Přístroje a programy

- laminární box Esco Class II type A2, Dynex laboratories s.r.o., Česká republika
- termostat Binder WTB, Fisher Scientific, Německo
- termobox Inkubator 1000, Heidolph, Německo
- epifluorescenční mikroskop Olympus Provis AX 70, Olympus, Japonsko
- kamera (připojená k mikroskopu a počítači) Nikon DS-Fi3, Nikon, Japonsko
- program NIS-Elements verze 5.00, Laboratory Imaging s.r.o., Česká republika
- denzitometr DEN-18 McFarland Densitometer Biosan, P-LAB, Česká republika
- vortex M52 Minishaker IKA, P-LAB, Česká republika
- kývačka MR-1 Mini Rocker-Shaker, Biosan, Litva

## **7.2 Použitá kultivační média**

### **7.2.1 Bujón infuze mozkové a srdeční tkáně (Brain-Heart Infusion, BHI)**

Jedná se o médium obsahující enzymaticky rozložené živočišné tkáně s mozkovou a srdeční infuzí. Bujón je navíc běžně suplementován glukózou a chloridem sodným a následně ještě pufrován, takže představuje velmi výživné médium pro široké spektrum mikroorganismů (64).

### **7.2.2 Mueller-Hinton bujón (MHB)**

Médium se využívá nejčastěji k testování antimikrobiálního účinku antibiotik – stanovení minimální inhibiční koncentrace. Skládá se z hovězí infuze, kaseinového hydrolyzátu a škrobu. První dvě složky slouží jako zdroj živin, škrob absorbuje toxické metabolity vznikající při růstu bakterií (65).

### **7.2.3 Trypto-kasein sójový bujón (Tryptic soy broth, TSB)**

Jedná se o médium kaseinu se sójovými peptony, je tak opět velmi výživné a umožňuje růst širokému spektru bakterií, kvasinek a plísní. V praxi se dále využívá k dlouhodobému uchovávání zásobních kultur s 10-20% přidavkem glycerolu, sloužící jakožto kryoprotektivum (66, 67).

TSB bylo suplementováno plasmou z 10 % (v/v) tak, že k 4,5 ml média bylo přidáno 0,5 ml lidské plasmy (LP).

### **7.2.4 RPMI médium**

RPMI je médium, které se využívá primárně za účelem kultivace tkáňových kultur ke studiu nádorů. Obohacené médium lze použít k hodnocení minimální inhibiční koncentrace antifungálních látek, dále se uplatňuje při kultivaci kandidových biofilmů. Bakterie se běžně v tomto médiu nekultivují. Obsahuje vitamíny, redukující složku glutathion, bikarbonátový pufr a další složky (68–71).

RPMI bylo suplementováno LP z 10 % (v/v) tak, že k 4,5 ml média bylo přidáno 0,5 ml LP.

### **7.2.5 Lubbockovo médium simulující chronickou ránu**

Jak z názvu vyplývá, jedná se o médium simulující model chronických ran *in vitro*. Vývoj Lubbock média byl poprvé popsán v časopise Wound Repair and Regeneration v článku od autorů Sun *et al.* v roce 2008, kde dle jejich metodiky tvoří základ Bolton bujón suplementovaný hovězí plasmou a koňskými erytrocyty. V tomto médiu velice snadno rostou bakterie a zároveň je zde dobře podněcován růst biofilmů (72, 73).



Médium bylo připraveno dle zmíněného článku s mírnými modifikacemi tak, že do zkumavky bylo přidáno 2,25 ml bujónu Bolton, k němu bylo napipetováno 2,5 ml LP a 0,25 ml lyzovaných beraních erytrocytů.

### **7.3 Příprava barvicích roztoků**

#### **7.3.1 Zásobní roztok FM 1-43**

Roztok tohoto fluorescenčního barviva byl připraven dle instrukcí výrobce tak, že do vialky s 1 mg práškového barviva bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  DMSO. Obsah vialky byl dále míchán pomocí vortexu do úplného rozpuštění barviva. Tímto krokem byl získán zásobní roztok barviva (roztok 1) o koncentraci 10 000  $\mu\text{g/ml}$ . Do další mikrozkuavky bylo dále pipetováno 990  $\mu\text{l}$  DMSO a 10  $\mu\text{l}$  roztoku 1, tím byl získán barvicí roztok (roztok 2) o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ . Optimální koncentrace barviva FM 1-43 pro samotné barvení je dle výrobce 1  $\mu\text{g/ml}$ , tato koncentrace je dosažena ředěním s dalšími fluorescenčními barvami (viz dále).

#### **7.3.2 Roztok FM 1-43 pro následnou kombinaci s CW**

Pro barvení v kombinaci s CW bylo potřeba připravit roztok barviva FM 1-43 přímo o cílové koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$ . V mikrozkuavce bylo tedy smícháno 10  $\mu\text{l}$  roztoku 2 s 990  $\mu\text{l}$  fyziologického roztoku. Takto připravené barvivo bylo použito v barvicí směsi 3 (viz níže Tabulka 1).

#### **7.3.3 Roztok SYPRO Ruby a FM 1-43 (kombinace A)**

SYPRO Ruby je roztok dodáván výrobcem v koncentraci 1 $\times$  připravené k použití. Ředěním 100  $\mu\text{l}$  roztoku 2 barviva FM 1-43 prostřednictvím 900  $\mu\text{l}$  fyziologického roztoku byl připraven roztok (roztok 3) o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ . Do mikrozkuavky bylo pipetováno 900  $\mu\text{l}$  barviva SYPRO Ruby, k němu pak bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  roztoku 3, tím byla získána finální koncentrace 1  $\mu\text{g/ml}$  barviva FM 1-43. SYPRO Ruby bylo o koncentraci 90 % (v/v). Takto připravená barvicí směs je dále označována jako směs 4a (viz Tabulka 1).

### **7.3.4 Roztok SYPRO Ruby a FM 1-43 (kombinace B)**

Barvicí roztok byl připraven v mikrozkuhavce pipetováním 490  $\mu\text{l}$  fyziologického roztoku, 10  $\mu\text{l}$  roztoku 2 barviva FM 1-43 a následným přidáním 500  $\mu\text{l}$  barviva SYPRO Ruby. Tím byla docílena požadovaná koncentrace FM 1-43 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), SYPRO Ruby mělo koncentraci 50 % (v/v). Tato kombinace je dále označena jako barvicí směs 4b (viz Tabulka 1).

### **7.3.5 Roztok SYPRO Ruby a FM 1-43 (kombinace C)**

Z roztoku 2 barviva FM 1-43 bylo pipetováno 12,5  $\mu\text{l}$  do 987,5  $\mu\text{l}$  fyziologického roztoku. Ze vzniklého roztoku o koncentraci 1,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bylo dále pipetováno 800  $\mu\text{l}$  ke 200  $\mu\text{l}$  SYPRO Ruby. Výsledkem byl opět zisk FM 1-43 o koncentraci 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a SYPRO Ruby o koncentraci 20 % (v/v). Barvicí směs je dále uváděna jako směs 4c a po kombinaci s CW jako směs 5 (viz Tabulka 1).

### **7.3.6 Roztok FM 1-43 a PI**

Barvivo PI je komerčně dodáváno jako roztok o koncentraci 1,0  $\text{mg}/\text{ml}$ . Do mikrozkuhavky bylo postupně přidáno 970  $\mu\text{l}$  fyziologického roztoku, 20  $\mu\text{l}$  PI a 10  $\mu\text{l}$  roztoku 2 barviva FM 1-43. FM 1-43 tak mělo požadovanou koncentraci 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a PI bylo o koncentraci 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Tato barvicí směs tvořila základ pro barvicí směs 6 (viz Tabulka 1).

### **7.3.7 Roztok SYTO 9 a PI**

Barvivo SYTO 9 je komerčně dodáváno jako roztok o koncentraci 5  $\text{mM}$ . Barvicí směs SYTO 9 a PI byla připravena v mikrozkuhavce suplementací 1  $\text{ml}$  fyziologického roztoku 20  $\mu\text{l}$  barviva PI (1,0  $\text{mg}/\text{ml}$ ) a 1  $\mu\text{l}$  SYTO 9 (5  $\text{mM}$ ). Výsledkem tak bylo PI o přibližné koncentraci 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a SYTO 9 o přibližné koncentraci 5  $\mu\text{M}$ . Roztok barviv je dále označován jako barvicí směs 2 a po kombinaci s CW je dále uváděna jako směs 1 (viz Tabulka 1).

### **7.3.8 Roztok SYTO 9 a SYPRO Ruby (kombinace A)**

Do mikrokumavky bylo přidáno 800  $\mu$ l fyziologického roztoku, 1  $\mu$ l SYTO 9 a 200  $\mu$ l SYPRO Ruby. SYPRO Ruby tak mělo koncentraci přibližně 20 % (v/v) a SYTO 9 bylo o přibližné koncentraci 5  $\mu$ M. Vzniklý roztok byl použit jako směs 7a (viz Tabulka 1).

### **7.3.9 Roztok SYTO 9 a SYPRO Ruby (kombinace B)**

V mikrokumavce bylo smícháno 500  $\mu$ l fyziologického roztoku, 1  $\mu$ l SYTO 9 a 500  $\mu$ l SYPRO Ruby. SYPRO Ruby tak získalo koncentraci přibližně 50 % (v/v) a SYTO 9 bylo o koncentraci přibližně 5  $\mu$ M. Směs byla dále označena jako barvicí směs 7b (viz Tabulka 1).

Tabulka 1 Finální barvicí směsi, jejich složení a koncentrace

fluorescenční barvivo	FM 1-43	SYPRO Ruby	SYTO 9	PI	CW
předpokládaná cílová struktura barviva	cytoplazmatická membrána	proteinová matrice	DNA; DNA živých buněk*	DNA mrtvých buněk + eDNA	polysacharidová matrice
zdroj	(48)	(50)	(55)	(55, 74)	(61)
<b>směs 1</b>	–	–	5 µM	20 µg/ml	+
<b>směs 2</b>	–	–	5 µM	20 µg/ml	–
<b>směs 3</b>	1 µg/ml	–	–	–	+
<b>směs 4a</b>	1 µg/ml	90 % (v/v)	–	–	–
<b>směs 4b</b>	1 µg/ml	50 % (v/v)	–	–	–
<b>směs 4c</b>	1 µg/ml	20 % (v/v)	–	–	–
<b>směs 5</b>	1 µg/ml	20 % (v/v)	–	–	+
<b>směs 6</b>	1 µg/ml	–	–	20 µg/ml	+
<b>směs 7a</b>	–	20 % (v/v)	5 µM	–	–
<b>směs 7b</b>	–	50 % (v/v)	5 µM	–	–

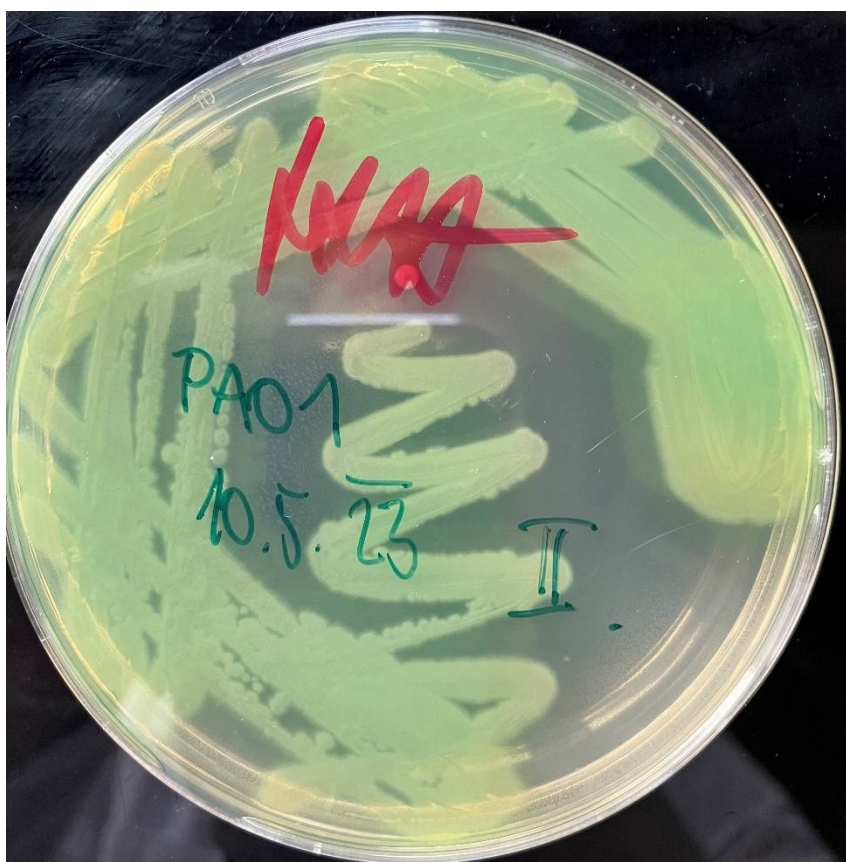
Nepřítomnost barviva ve směsi je označeno pomocí „–“. Biofilmy dodatečně barvené CW jsou označeny u příslušných směsí znaménkem „+“.

\*Značení DNA pouze živých buněk platí pro případ, je-li v kombinaci s barvivem PI.

## 7.4 Pracovní postup

### 7.4.1 Příprava

Pro efektivnější formování biofilmů bylo nejprve provedeno adherování bílkovin LP do jamek mikrotitrační destičky (tzv. coatování) tak, že do každé jamky bylo pipetováno 200  $\mu$ l LP. Zakoupený kmen *P. aeruginosa* (kmen PAO1) byl zaočkován na Mueller-Hinton agar. Destička a agar se následně nechaly inkubovat 24 hodin při 37 °C v termostatu. Na Obrázku 14 lze pozorovat naočkovanou *P. aeruginosa* po 24hodinové inkubaci.

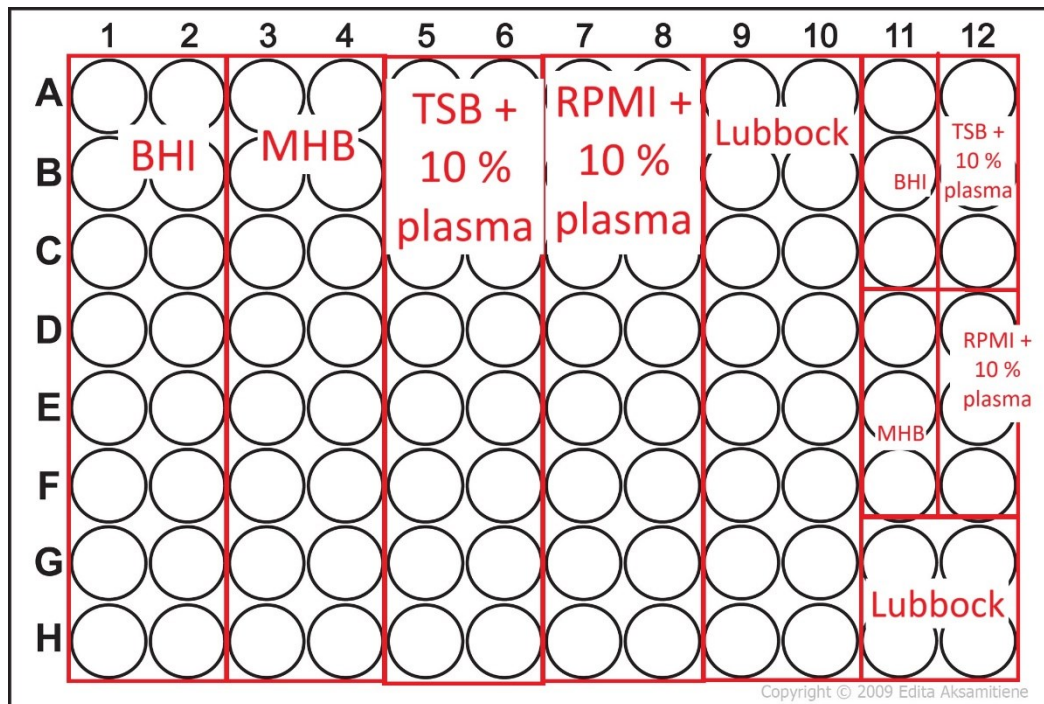


Obrázek 14 *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) na Mueller-Hinton agaru.  
Kultivováno 24 h při 37 °C  
E. Zachar, 2023

### 7.4.2 Formování biofilmů

Z naočkované destičky byla po 24hodinové inkubaci odpipetována veškerá LP, destička se následně nechala vyschnout v termoboxu při 65 °C po dobu 10 minut. V OD zkumavkách byly následně připraveny bakteriální suspenze o optické densitě

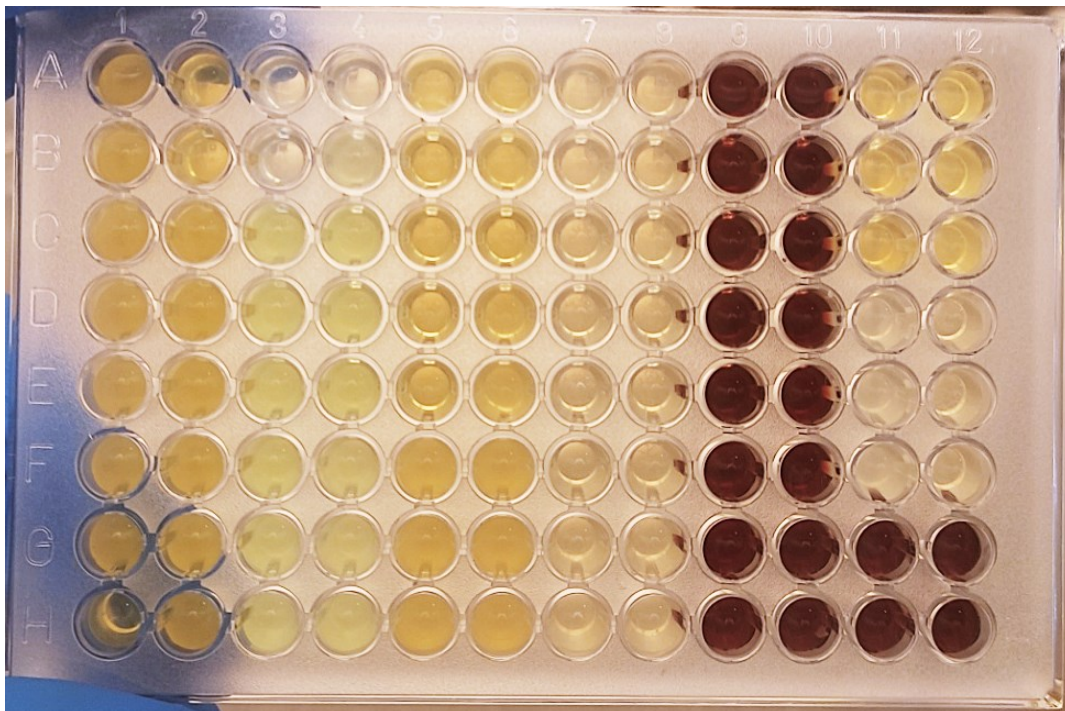
0,5 McFarlanda v příslušných kultivačních médiích po 5 ml. Připravené mikrobiální suspenze v jednotlivých kultivačních médiích byly následně rozpipetovány po 200 µl do jamek mikrotitrační destičky dle schématu (Obrázek 15). Destička se nechala inkubovat 24 hodin při 37 °C. Obrázek 16 zobrazuje napipetování suspenze *P. aeruginosa* v konkrétních kultivačních médiích v mikrotitrační destičce před inkubací. Na Obrázku 17 je snímek destičky po 24h inkubaci, média jsou již odpipetovaná a nahrazená fyziologickým roztokem. Patrný zákal v jamkách, je známkou přítomnosti biofilmů.



Obrázek 15 Schéma pipetování zaočkovaných médií bakterií *Pseudomonas aeruginosa* do jamek mikrotitrační destičky.

BHI – brain heart infusion (bujón infuze mozkové a srdeční tkáně), MHB – Mueller-Hinton bujón, TSB + 10 % plasma – tryptic soy broth (trypto-kasein sójový bujón) suplementováno z 10 % (v/v) lidskou plasmou, RPMI + 10 % plasma – RPMI médium suplementované z 10 % (v/v) lidskou plasmou, Lubbock – Lubbockovo médium simulující chronickou ránu

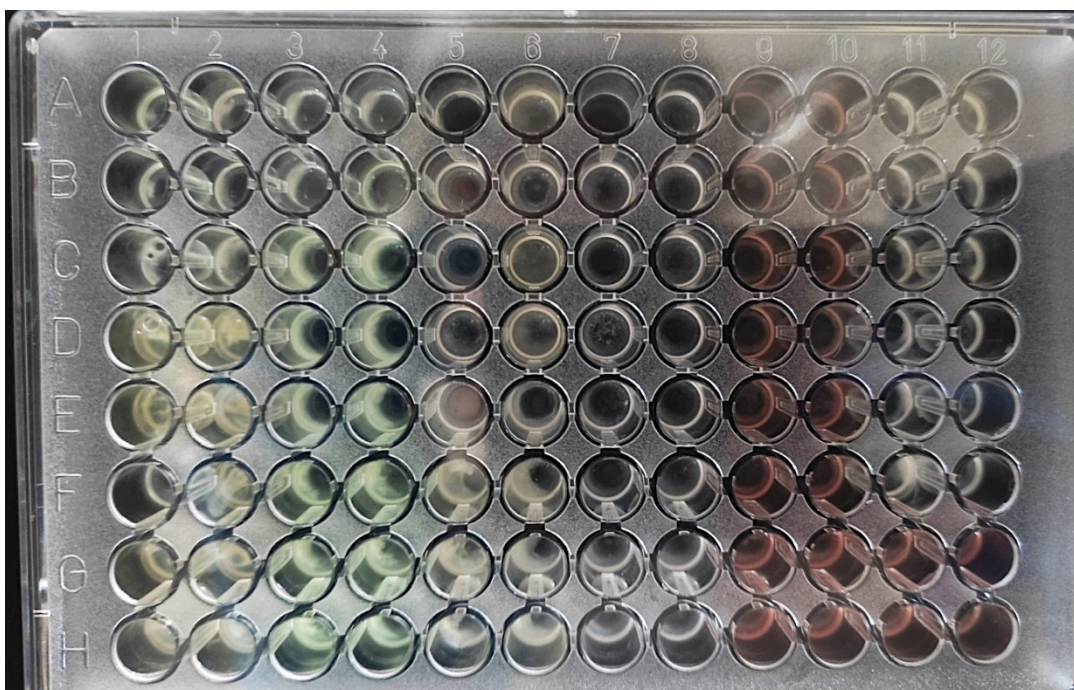
Převzato a upraveno (75)



Obrázek 16 Mikrotitrační destička se zaočkovanými médii bakterií *Pseudomonas aeruginosa* před 24h inkubací.

V jamkách mikrotitrační destičky jsou přítomná média: bujón infuze mozkové a srdeční tkáně (celý sloupec 1, 2 a řádky A až C ve sloupci 11), Mueller-Hinton bujón (celý sloupec 3, 4 a řádky D až F ve sloupci 11), trypto-kasein sójový bujón suplementovaný z 10 % (v/v) lidskou plasmou (sloupec 5, 6 a řádky A až C ve sloupci 12), RPMI suplementováno z 10 % (v/v) lidskou plasmou (sloupec 7, 8 a řádky D až F ve sloupci 12) a Lubbockovo médium simulující chronickou ránu (sloupec 9, 10 a řádky G a H ve sloupcích 11 a 12).

E. Zachar, 2023



Obrázek 17 Mikrotitrační destička s naformovanými biofilmy bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

Biofilmy byly kultivovány 24h při 37 °C v médiích: bujón infuze mozkové a srdeční tkáně (celý sloupec 1, 2 a řádky A až C ve sloupci 11), Mueller-Hinton bujón (celý sloupec 3, 4 a řádky D až F ve sloupci 11), trypto-kasein sójový bujón suplementovaný z 10 % (v/v) lidskou plasmou (sloupec 5, 6 a řádky A až C ve sloupci 12), RPMI suplementováno z 10 % (v/v) lidskou plasmou (sloupec 7, 8 a řádky D až F ve sloupci 12) a Lubbockovo médium simulující chronickou ránu (sloupec 9, 10 a řádky G a H ve sloupcích 11 a 12). Po inkubaci byla média odstraněna a nahrazena sterilním fyziologickým roztokem.

E. Zachar, 2023

### 7.4.3 Barvení a pozorování biofilmů

Po 24hodinové inkubaci byl z jamek odstraněn supernatant. Dále byly biofilmy promyty sterilním fyziologickým roztokem za účelem odstranění planktonických buněk. K naformovaným biofilmům byly následně pipetovány po 50 µl různé barvicí roztoky připravené týž den dle instrukcí v kapitole 7.3.

Naformované biofilmy byly inkubovány s barvicími roztoky na třepačce při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 30 minut. U barviv, které bylo potřeba odmyt, došlo po inkubaci k odpipetování barvicího roztoku, promytí jamky fyziologickým roztokem a následným opětovným napipetováním 50 µl fyziologického roztoku. Preparáty byly připraveny tak, že špičkou pipety byl ze dna jamek proveden intenzivní seškrab biofilmů a 10 µl obarvených biofilmových suspenzí bylo přeneseno na očištěná



a odmaštěná podložní sklíčka. U biofilmů dodatečně barvených pomocí CW byl postup obdobným, s tím rozdílem, že na podložní sklíčka bylo prvně nanášeno 7  $\mu$ l CW a následně přidáno 7  $\mu$ l obarvených biofilmových suspenzí. Podložní sklíčka s obarvenými biofilmovými suspenzemi byla přikryta krycími sklíčky, a takto připravené preparáty byly hodnoceny epifluorescenční mikroskopií při zvětšení 400 $\times$ .

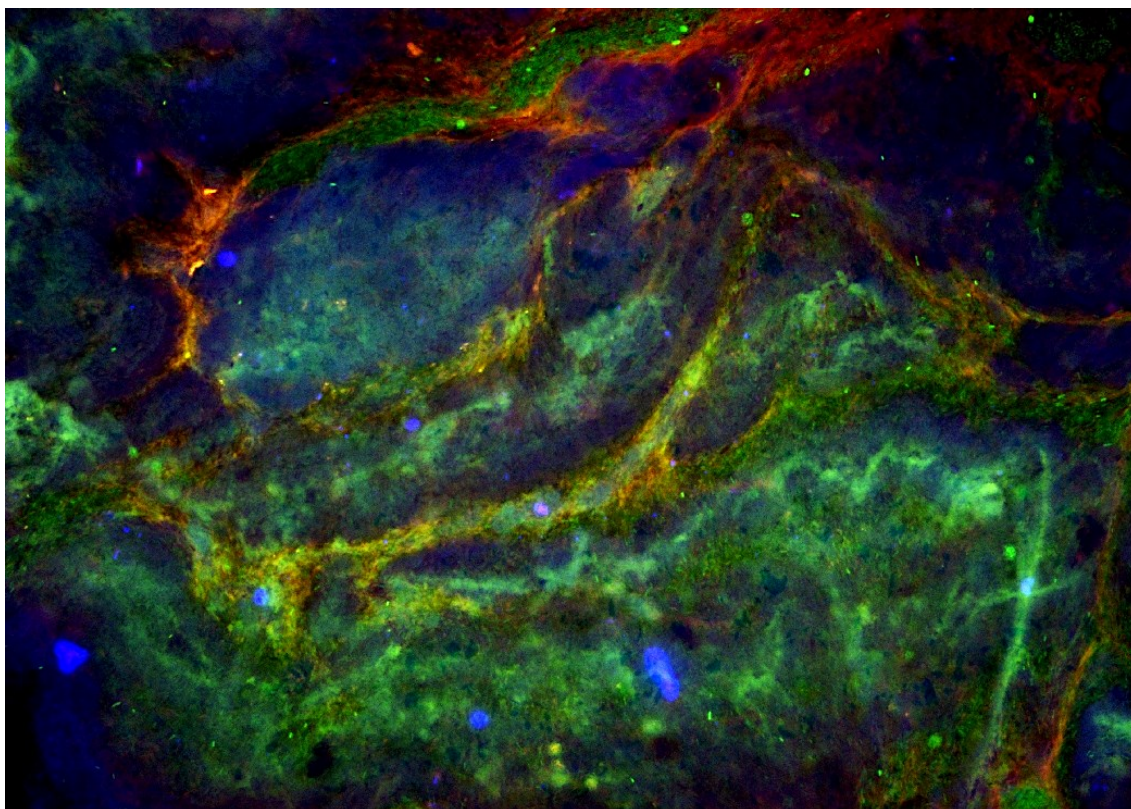
## 8. VÝSLEDKY

### 8.1 *Hodnocení vlivu kultivačních médií na formování biofilmů bakterie *Pseudomonas aeruginosa**

Pro zhodnocení vlivu pěti rozdílných kultivačních médií na tvorbu biofilmů byly 24hodinové biofilmy barveny dle zavedené metodiky laboratoře, kombinací fluorescenčních barviv SYTO 9, PI a CW (směs 1). U směsi 1 jsme očekávali SYTO 9 navázané na DNA živých buněk, PI navázané na DNA mrtvých buněk a CW navázané na sacharidovou matici. Matrice složená z eDNA měla být obarvena pomocí PI. Směs 1 po inkubaci s biofilmy nebyla odmyta, došlo k přímému seškrabu biofilmů z jamky a následnému pozorování a hodnocení. Byl hodnocen i makroskopický vzhled biofilmů, s přihlédnutím na optimální manipulaci. Mikroskopické hodnocení se opíralo o viabilitu buněk, přítomnost matrice a její množství, respektive její denzitu, ze které lze usuzovat 3D strukturu biofilmů.

#### 8.1.1 Vliv média BHI

Při vizuální inspekci destičky byly nažloutlé biofilmy formované v tomto médiu viditelné již pouhým okem (viz sloupečky 1 a 2 na Obrázku 17). I přes opatrnou manipulaci docházelo ale během promývání jamek k výrazné ztrátě této masy, pravděpodobně vlivem pokročilé maturace biofilmů. Značnou vyzrálost biofilmů naformovaných v BHI médiu potvrdila i fluorescenční mikroskopie (Obrázek 18), kde je patrné výrazné zastoupení matrice. Zelené barvivo SYTO 9 se dle očekávání navázalo na DNA živých buněk, buňky mrtvé byly označeny červeným PI. V preparátu lze navíc pozorovat charakteristickou morfologii tyčí *P. aeruginosa*. Na eDNA přítomnou v biofilmové matrici se pravděpodobně navázalo jak PI, tak SYTO 9, což dokládají neostře ohraničené překrývající se plochy červeno-oranžové, ale i zelené barvy. Na exopolysacharidy v biofilmové matrici se navázalo modré fluorescenční barvivo CW.



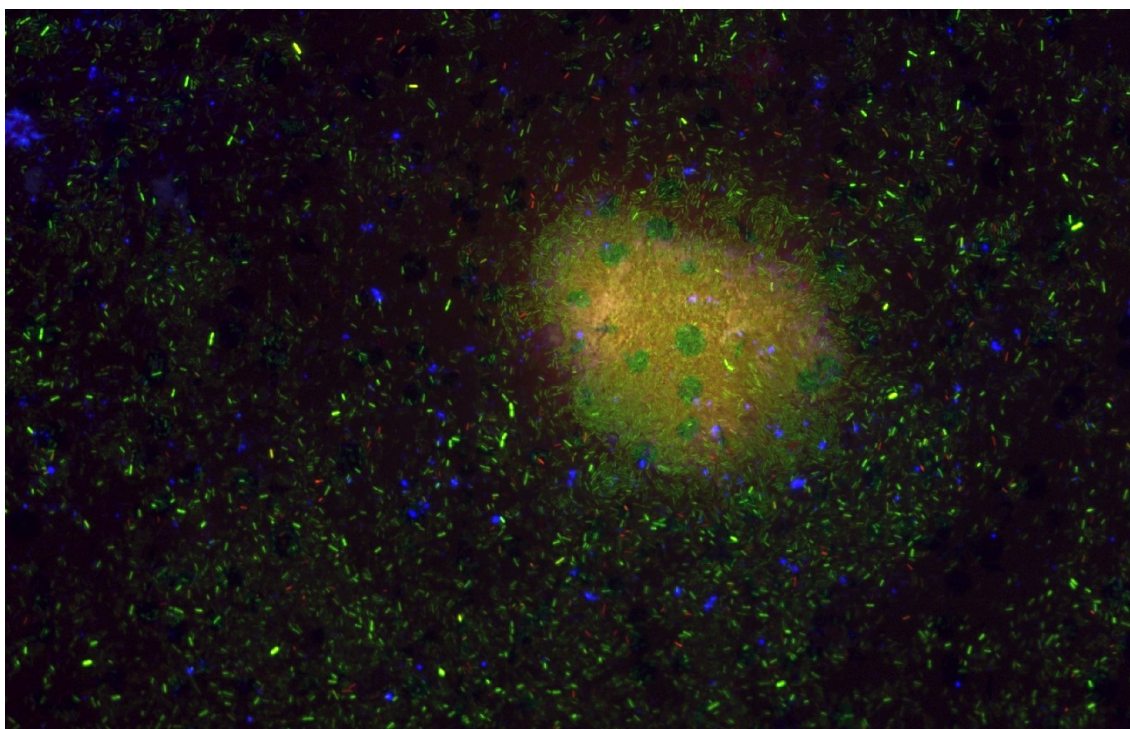
Obrázek 18 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v bujónu infuze mozkové a srdeční tkáně (brain-heart infusion).

Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv SYTO 9, propidium jodid a kalkofluorovou bělobou. Bakterie – zelené (živé) a červené (mrtvé) tyčinky. Biofilmová matrix – modré (polysacharidy), zelené a červené (extracelulární DNA) neostře ohraničené oblasti. Zvětšeno 400×.

### 8.1.2 Vliv média MHB

Makroskopická inspekce potvrdila nárůst nazelenalých biofilmů v médiu MHB v mikrotitrační destičce (viz sloupečky 3 a 4 na Obrázku 17). Díky lepší manipulaci během promývacích kroků lze usoudit, že biofilmy nebyly tak maturované jako v případě BHI. Mikroskopicky byl nárůst biofilmu také potvrzen (Obrázek 19), avšak biofilm zde nebyl skutečně tak maturovaný jako v případě kultivace v médiu BHI, což dokládá výrazně menší zastoupení matrice. Na Obrázku 19 lze pozorovat menší shluk biofilmu. Opět pravděpodobně došlo k navázání barviv PI i SYTO 9 na eDNA, čímž došlo ke skladbě červené a zelené emitované barvy, a tedy vzniku oranžovo-žluté plochy, což by mohlo nasvědčovat tomu, že matrice byla v tomto případě složena převážně z eDNA. Dále lze pozorovat morfologii tyčí *P. aeruginosa*, a to jak živé (zelené, navázané SYTO 9), tak mrtvé (červené, navázané PI). Zastoupení živých buněk na první pohled převažuje

nad buňkami mrtvými. Okraje shluku vykazují lehkou namodralou emisi, podobně v levé horní části snímku jsou patrné modré plochy, které odkazují na navázané barvivo CW, potvrzující přítomnost exopolysacharidové matrice.



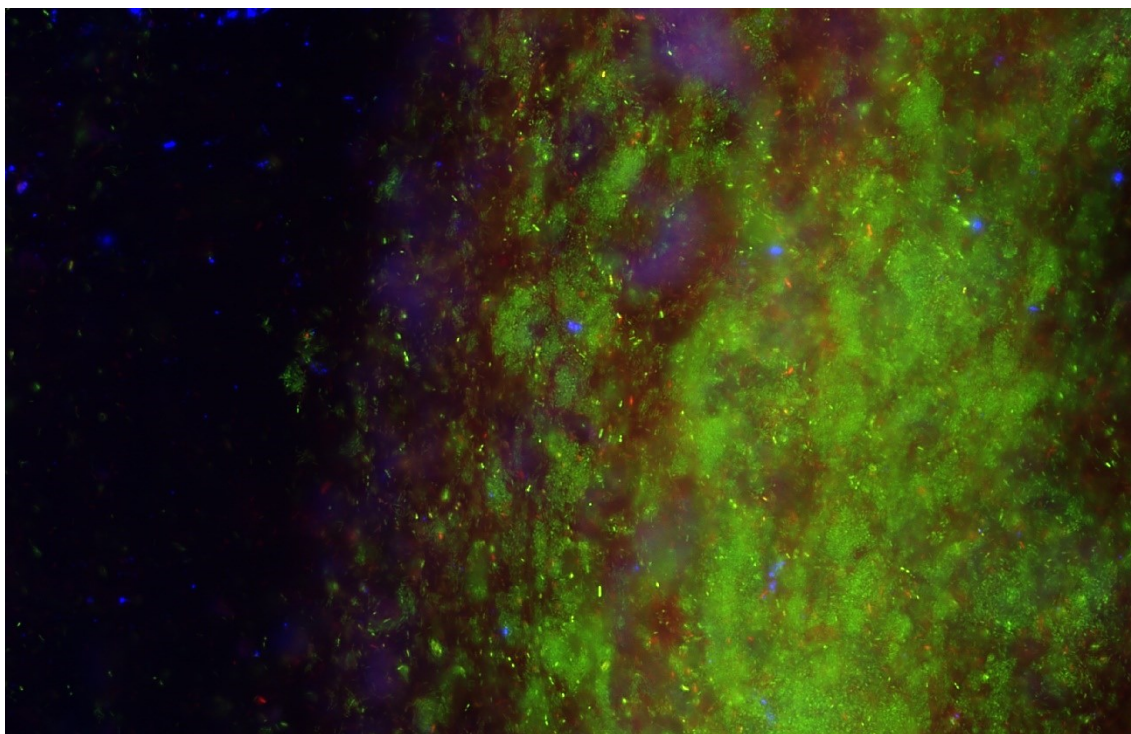
Obrázek 19 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v Mueller-Hinton bujónu.

Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv SYTO 9, propidium jodid a kalkofluorovou bělobou. Bakterie – zelené (živé) a červené (mrtvé) tyčinky. Biofilmová matrix – oranžový shluk neostře ohraničené oblasti (extracelulární DNA), namodralý okraj shluku (polysacharidy). Zvětšeno 400×.

### 8.1.3 Vliv média TSB + 10 % LP

Vizuální inspekce destičky po kultivaci (sloupečky 5 a 6 na Obrázku 17) opět prokázala nárůst lehce nažloutlých biofilmů, které byly na první pohled srovnatelné s biofilmy naformovanými v MHB. Na základě mikroskopického pozorování (Obrázek 20), kde bylo detekováno větší množství biofilmové matrice, lze usuzovat, že se jedná o vyzrálější biofilm než v případě formování v MHB. Na Obrázku 20 je patrný denzní nárůst živých bakteriálních buněk (zelené tyče obarvené pomocí SYTO 9), místy je možné pozorovat červené tyče (mrtvé buňky obarveny pomocí PI). V biofilmu je opět přítomna eDNA obarvená pravděpodobně oběma barvivy s afinitou k DNA (podsvěcující neostře načervenalé plochy obarvené díky PI a neostře ohraničené zelené plochy v okolí

zelených tyčí obarvené pomocí SYTO 9). Dále je patrná podsvěcující modrá sacharidová matrice obarvená pomocí CW.

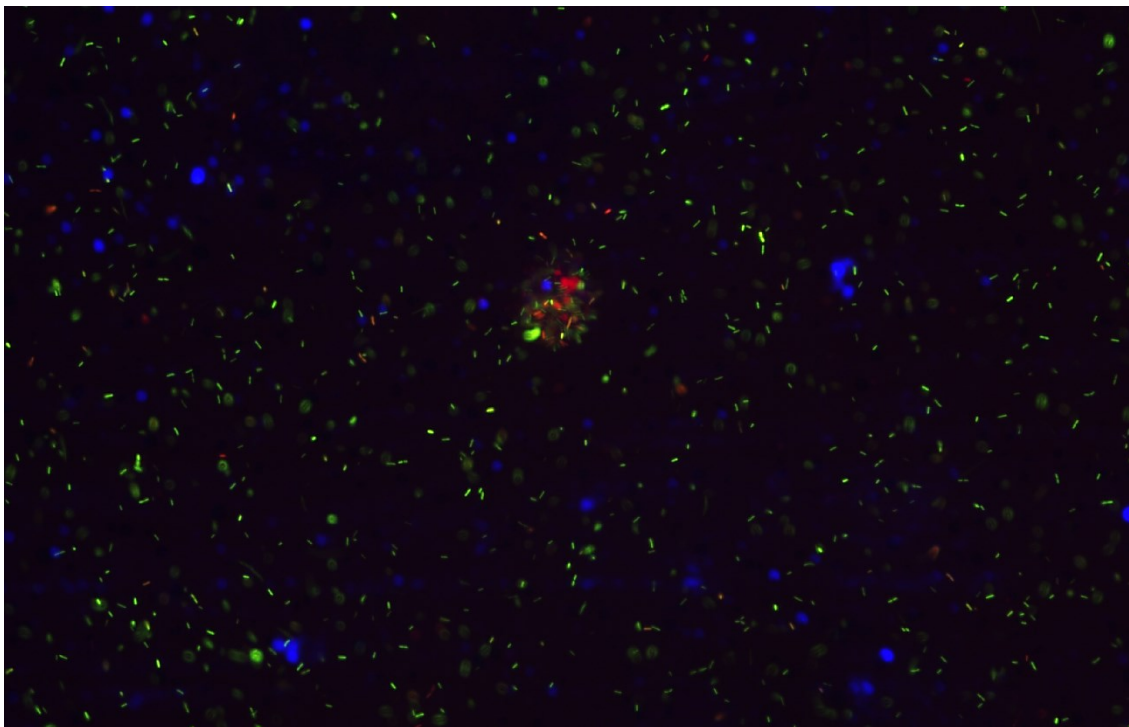


Obrázek 20 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v trypto-kasein sojovém bujónu suplementovaný lidskou plasmou.

Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv SYTO 9, propidium jodid a kalkofluorovou bělobou. Bakterie – zelené (živé) a červené (mrtvé) tyčinky. Biofilmová matrix – modré (polysacharidy), zelené a červené (extracelulární DNA) neostře ohraničené oblasti. Zvětšeno 400x.

#### 8.1.4 Vliv média RPMI + 10 % LP

Po inkubaci nebyl v jamkách s tímto médiem patrný významný nárůst biofilmů, byl prokázán pouze lehký mléčný zákal na dně jamek, což by mohly být adherované bakterie (sloupečky 7 a 8 na Obrázku 17). Významný nárůst biofilmů nebyl potvrzen ani na základě mikroskopického hodnocení (Obrázek 21). Jediný zaznamenaný shluk buněk totiž nevykazoval zcela jednoznačně atributy biofilmu. Na druhou stranu, RPMI, stejně jako ostatní média, umožnilo zachování bakteriální viability, protože zeleně zastoupené tyče (živé buňky značené SYTO 9) zcela jednoznačně převyšují počet červených mrtvých buněk (značené pomocí PI).

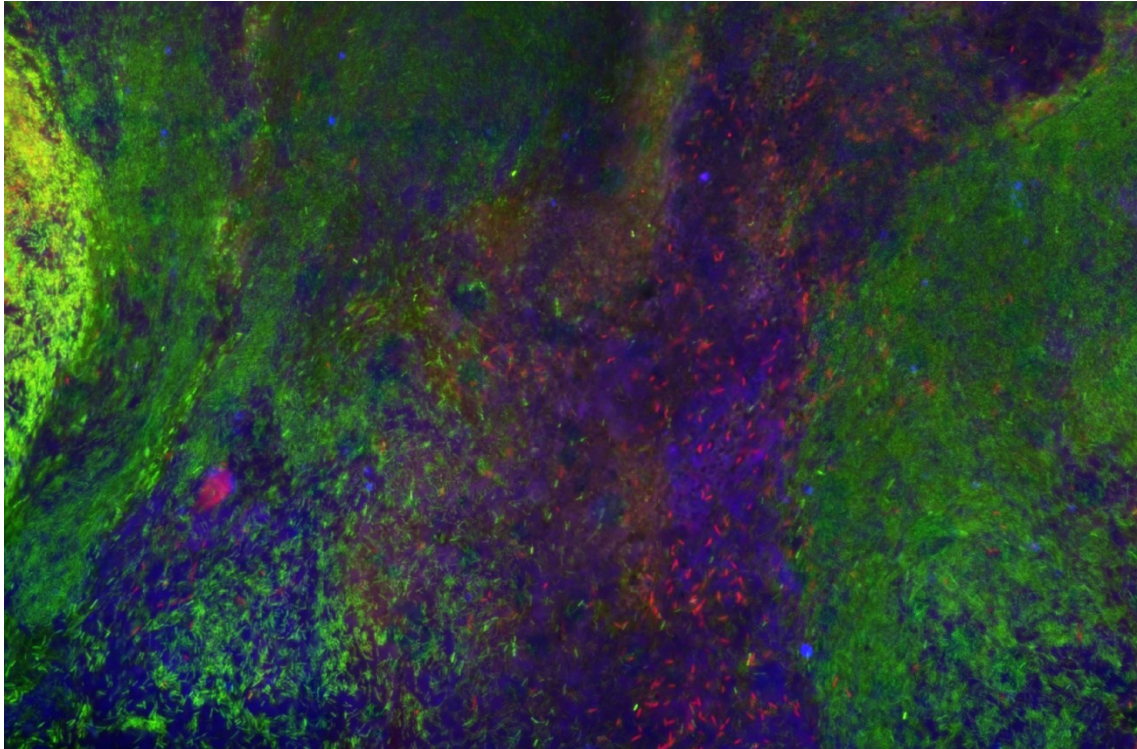


Obrázek 21 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v RPMI 1640 médiu suplementované lidskou plasmou.

Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv SYTO 9, propidium jodid a kalkofluorovou bělobou. Bakterie – zelené (živé) a červené (mrtvé) tyčinky. Nepatrná biofilmová matrix uprostřed. Zvětšeno 400x.

### 8.1.5 Vliv Lubbock média

Nárůst biofilmů v destičce v Lubbock médiu byl makroskopicky srovnatelný s množstvím biofilmů naformovaných v suplementovaném TSB (sloupečky 9 a 10 na Obrázku 17), s tím rozdílem, že biofilmy naformované v Lubbock médiu byly makroskopicky zbarveny červeně. Epifluorescenční mikroskopií byla vzhledem k výraznému zastoupení matrice potvrzena přítomnost vyvrážděných biofilmů (Obrázek 22). Na snímku je také dobře patrné 3D uspořádání struktury. Na Obrázku 22 lze pozorovat opět dobře morfologii tyčí *P. aeruginosa*, jak zelených (živých, značeno SYTO 9), které jsou přítomny ve vysoké denzitě, tak minoritně červených (mrtvých, značeno PI). Opět byla prokázána přítomnost matrice, kdy skladbou neostře ohraničené červené (eDNA značená PI) a modré (polysacharidy značené CW) plochy vznikla fialová plocha v centrální oblasti snímku.



Obrázek 22 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v Lubbockově médiu simulující chronickou ránu.

Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv SYTO 9, propidium jodid a kalkofluorovou bělobou. Bakterie – zelené (živé) a červené (mrtvé) tyčinky. Biofilmová matrix – modré (polysacharidy) a červené (extracelulární DNA) neostře ohraničené plochy. Zvětšeno 400×.

## **8.2 Optimalizace barvicích směsí pro vizualizaci biofilmů bakterie *Pseudomonas aeruginosa***

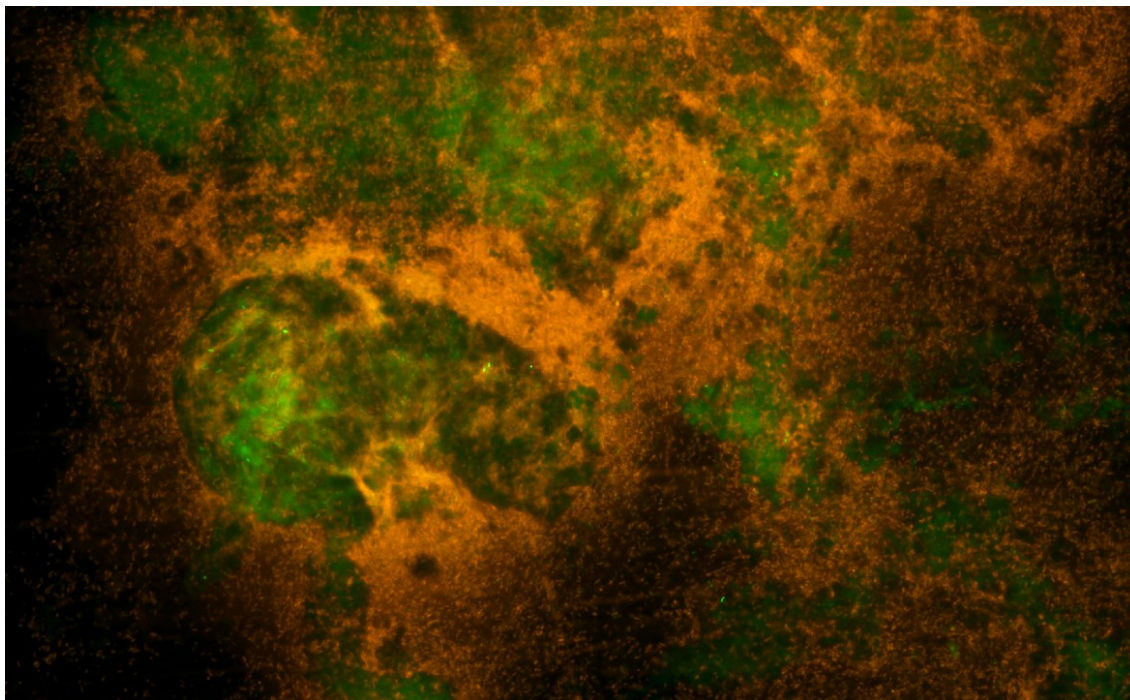
Pro optimalizaci barvicích směsí vhodných pro vizualizaci biofilmů bakterie *P. aeruginosa* byla na základě předchozích experimentů pro formování biofilmů vybrána kultivační média, kde byl patrný jednoznačný nárůst těchto konsorcií, tedy BHI, TSB + 10 % LP a Lubbock médium.

### **8.2.1 Barvení směsí 2**

Barvicí směs 2 obsahující SYTO 9 (5  $\mu$ M) a PI (20  $\mu$ g/ml) měla odlišit mrtvé buňky (červené), živé buňky (zelené) a zároveň zvýraznit eDNA v biofilmové matici. Barvicí směs nebyla po inkubaci s biofilmy odmyta.

Obrázek 23 zachycuje biofilm naformovaný v médiu BHI, který byl obarvený touto směsí. Tyče obarveny červeno-oranžově (mrtvé, či poškozené bakteriální buňky)

na tomto snímku dominují. Jasně morfologicky rozeznatelné zelené tyče obarvené pomocí SYTO 9 (živé buňky) se zde nachází minoritně. Bakterie jsou lemovány neostře ohraničenými červeno-oranžovými plochami (eDNA). eDNA je také výrazněji zastoupená v neostře ohraničených zelených plochách barvených opět velice pravděpodobně pomocí SYTO 9.



**Obrázek 23** Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v bujónu infuze mozkové a srdeční tkáně (brain-heart infusion).

Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv SYTO 9 a propidium jodid. Bakterie – zelené (živé) a červené (mrtvé) tyčinky. Biofilmová matrix – červené a zelené (extracelulární DNA) neostře ohraničené plochy. Zvětšeno 400×.

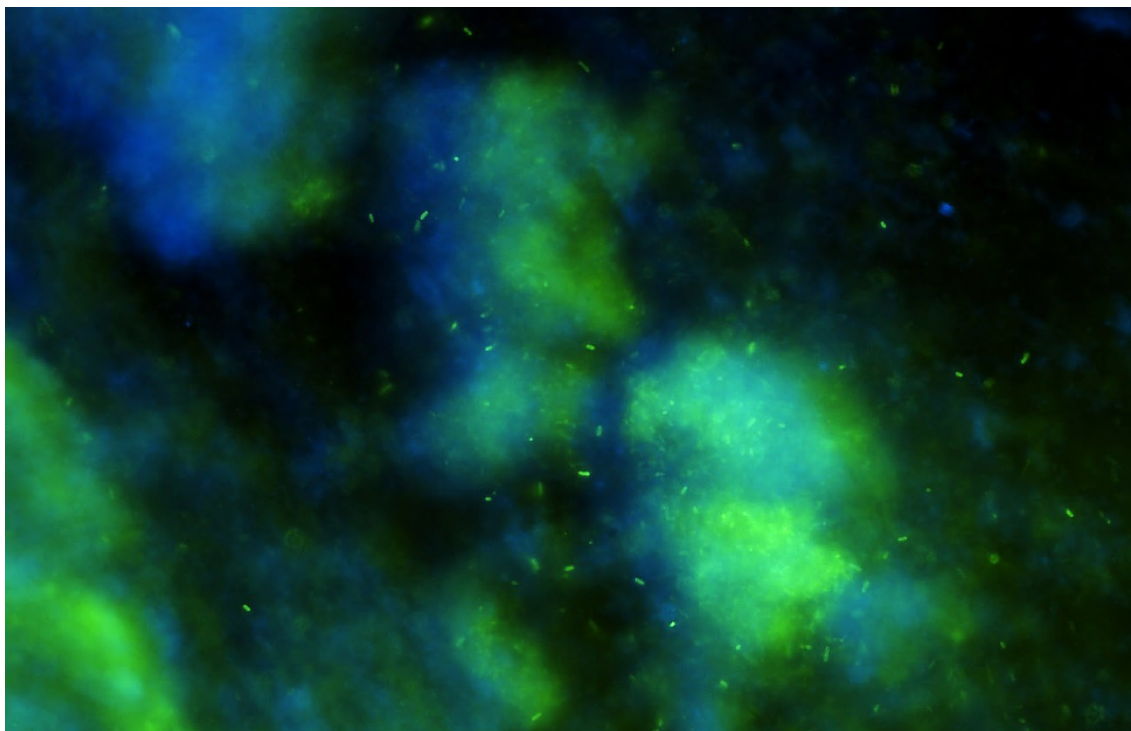
### 8.2.2 Barvení směsí 3

Barvení směsí 3 spočívá v použití fluorescenčního barviva FM 1-43 (1 µg/ml) a dodatkovém barvení pomocí CW. Tímto barvením mělo dojít k rozlišení bakteriálních buněk (vazba zeleného barviva FM 1-43) a polysacharidové matrice (vazba modré CW). Po inkubaci biofilmu s barvivem nedošlo k odmyvacímu kroku.

Obrázek 24, biofilm naformovaný v Lubbockově médiu, potvrzuje naši pracovní hypotézu. Bakteriální buňky jsou obarveny zeleně, je zde patrná morfologie tyčí, dále se zde nachází zelené plochy obsahující bakterie s hůře rozpoznatelnou, až nerozpoznatelnou morfologií, tj. denzní ložiska bakteriálních buněk. Polysacharidová



matrice značená pomocí CW je zde znázorněna neostře ohraničenými modrými plochami. Překrývající zelené a modré plochy vykazují výslednou tyrkysovou emisi.



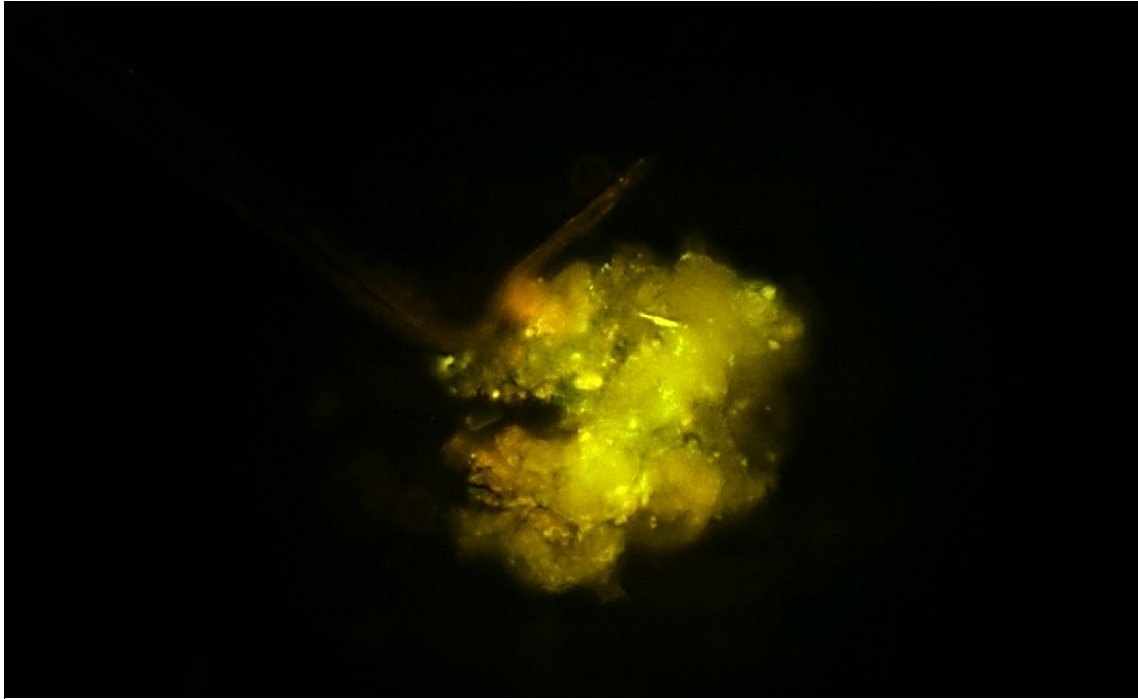
**Obrázek 24** Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v Lubbockově médiu simulující chronickou ránu.

Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv FM 1-43 a kalkofluorovou bělobou. Bakterie – zelené tyčinky. Biofilmová matrix – modré (polysacharidy) neostře ohraničené plochy. Zvětšeno 400×.

### 8.2.3 Barvení směsí 4a

U kombinace FM 1-43 (1 µg/ml) a SYPRO Ruby (90 % (v/v)) bylo předpokládáno značení proteinů v matrici červeně (SYPRO Ruby) a bakteriálních buněk zeleně (FM 1-43).

Obrázek 25 zobrazuje biofilm naformovaný v BHI médiu, u něhož došlo po inkubaci s barvicí směsí k odmytí nenavázaného barviva. Biofilm zde vykazuje majoritně žluto-oranžovou emisi znamenající přítomnost biofilmové matrice s bakteriálními buňkami. Lokálně lze pozorovat nepříliš dobře ohraničenou zelenou emisi, která by mohla znamenat přítomnost bakteriálních buněk, avšak jejich morfologie není patrná.



*Obrázek 25* Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v bujónu infuze mozkové a srdeční tkáně (brain-heart infusion).

Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv FM 1-43 a SYPRO Ruby, barviva byla po inkubaci odmyta. Bakterie – nazelenalá granula. Biofilmová matrix – žluto-oranžová (proteiny) plocha. Zvětšeno 400×.

Na Obrázku 26 je snímek biofilmu, u něhož nedošlo po inkubaci s barvicí směsí k odmytí nenavázaných barviv. Zde je patrné výraznější červené zbarvení amorfni hmoty (proteinové matrice), ale i bakteriálních buněk (červené tyče).



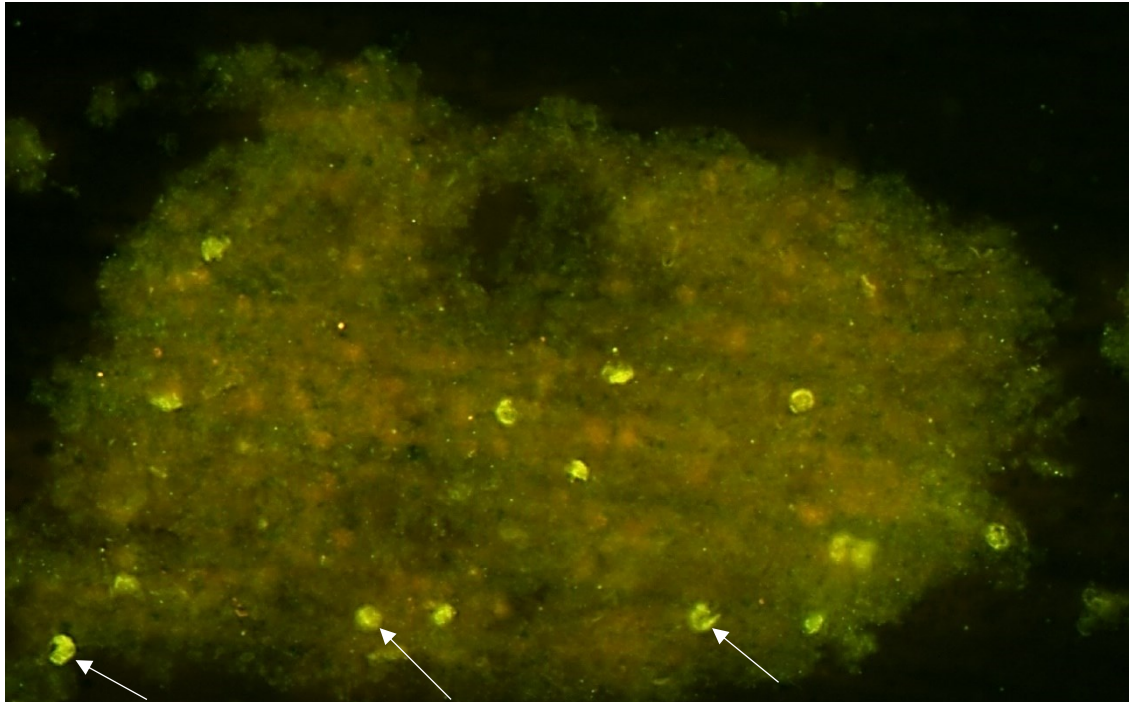
Obrázek 26 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v bujónu infuze mozkové a srdeční tkáně (brain-heart infusion).

Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv FM 1-43 a SYPRO Ruby, barviva nebyla po inkubaci odmyta. Bakterie – červené tyče. Biofilmová matrix – červená (proteiny) amorfnní plocha. Zvětšeno 400×.

#### 8.2.4 Barvení směsí 4b

Směs byla složená z fluorescenčních barviv FM 1-43 (1 µg/ml) a SYPRO Ruby (50 % (v/v)). Očekávané výstupy barvení byly shodné jako v případě barvení směsí FM 1-43 a SYPRO Ruby o koncentraci 90 % (v/v).

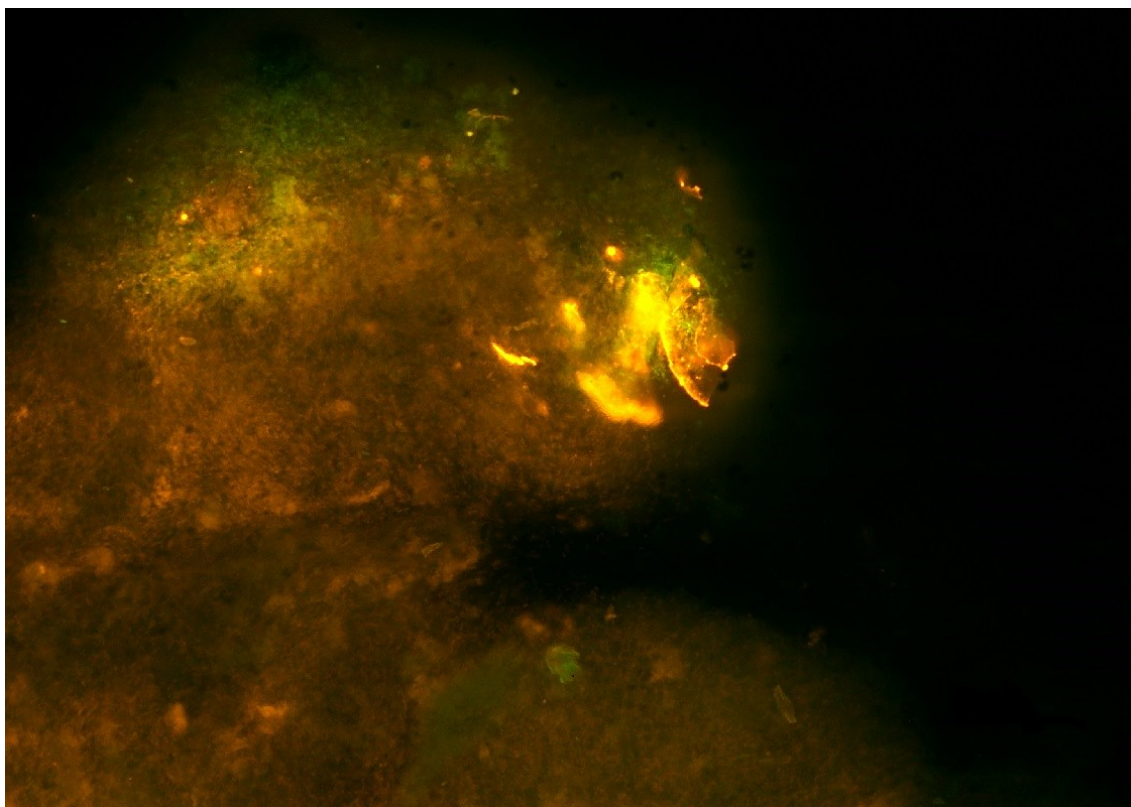
Na preparátu biofilmu kultivovaném v Lubbockově médiu obarveným směsí 4b, u kterého bylo nenavázané barvivo po inkubační době odmyto (Obrázek 27), je možné pozorovat jak proteinovou matici (červeno-oranžově prosvítající plochy), ale i přítomnost bakteriálních buněk (zelené granulární zóny). Jasnou tyčinkovitou strukturu *P. aeruginosa* však nebylo možné rozeznat. Na snímku jsou také přítomny jasně zeleně svítící artefakty (některé z nich označeny šipkou), což by mohly být pozůstatky lyzovaných erytrocytů přítomné v Lubbockově médiu.



Obrázek 27 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1<sup>1</sup> (ATCC 15692) formovaného 24 h v Lubbockově médiu simulující chronickou ránu.

Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv FM 1-43 a SYPRO Ruby, barviva byla po inkubaci odmyta. Bakterie – zelené granulární zóny. Biofilmová matrix – červeno-oranžové (proteiny) prosvítající plochy. Bílé šipky ukazují na některé ze zbytků membrán lyzovaných erytrocytů (zelené kulaté objekty). Zvětšeno 400×.

Snímek biofilmu kultivovaného v BHI s neodmytými barvivou směsí 4b po inkubaci (Obrázek 28) dokazuje přítomnost proteinové matrice (sytě oranžovo-červené plochy), lokálně je možné pozorovat přítomnost bakteriálních buněk (zelené granulární zóny). Jasnou tyčinkovitou strukturu *P. aeruginosa* nebylo možné rozeznat ani v tomto případě. Již na první pohled je ale patrné, v porovnání s preparátem, u kterého došlo k odmytí barviv po inkubaci, že SYPRO Ruby v tomto případě poskytuje intenzivnější emisi.



Obrázek 28 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v bujónu infuze mozkové a srdeční tkáně (brain-heart infusion).

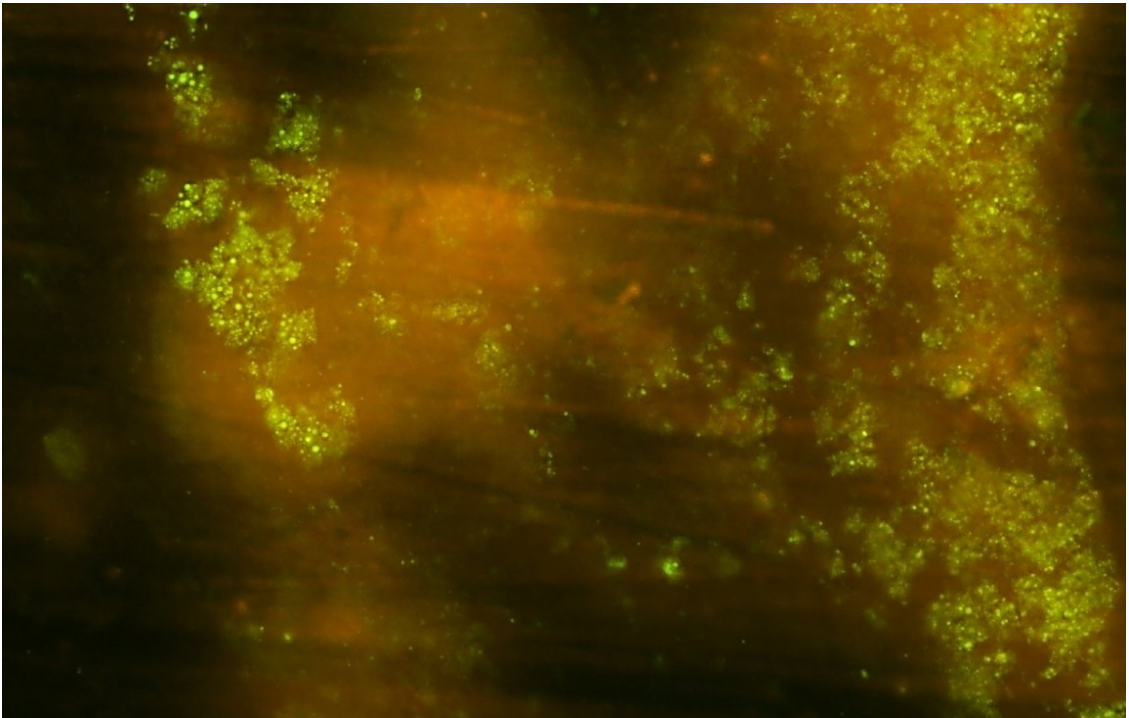
Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv FM 1-43 a SYPRO Ruby, barviva nebyla po inkubaci odmyta. Bakterie – zelené granulární zóny. Biofilmová matrix – červeno-oranžové (proteiny) plochy. Zvětšeno 400×.

### 8.2.5 Barvení směsí 4c

Směs 4c byla složena z FM 1-43 (1 µg/ml) a SYPRO Ruby (20 % (v/v)). Očekávané výstupy barvení byly shodné jako v předchozích případech kombinací barviv FM 1-43 a SYPRO Ruby.

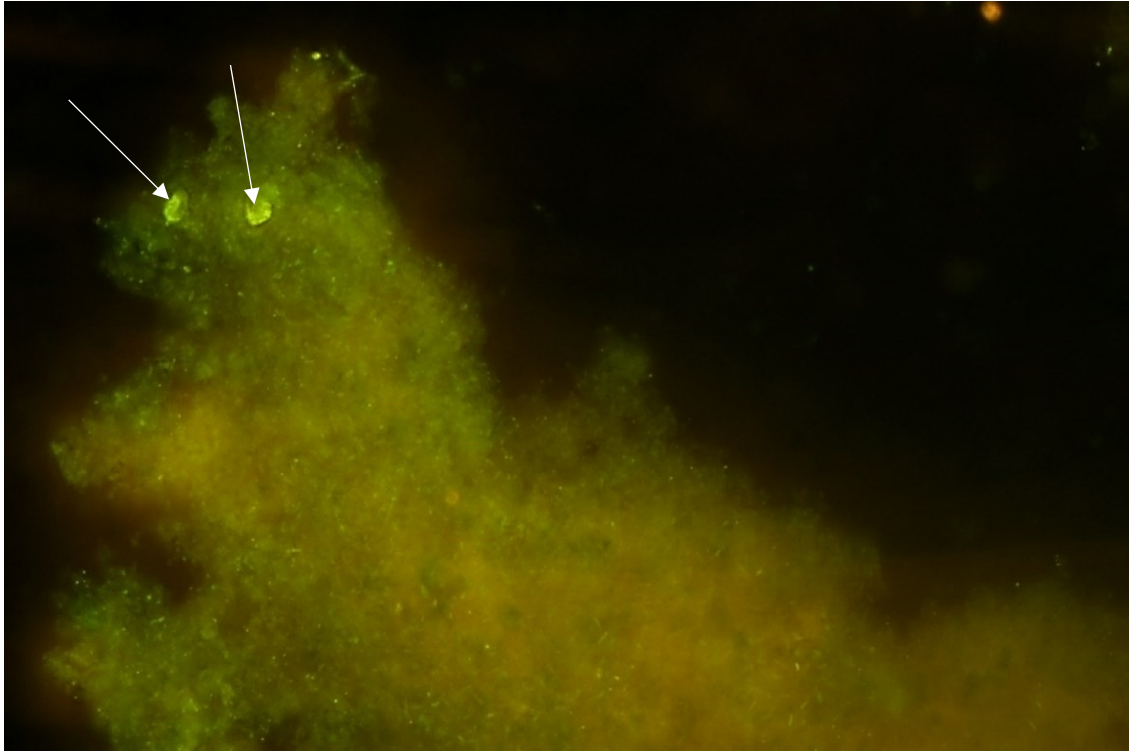
Na Obrázcích 29 a 30 je možné pozorovat preparáty biofilmů s neodmytými barvivy po inkubaci. Obrázek 29 zobrazuje biofilm kultivovaný v BHI médiu. Proteinová matrice je znázorněna podsvěčujícími oranžovo-červenými neostře ohraničenými plochami. Granulární zelená hmota svědčí o přítomnosti bakteriálních buněk, které ale ani zde nevykazují jasnou morfologii tyčí. Na Obrázku 30 je znázorněn biofilm kultivovaný v Lubbock médiu. Proteinová matrice je zobrazena jako podsvěčující oranžovo-červená neostře ohraničená plocha. Bakteriální buňky je zde možné pozorovat omezeně ve formě zelených tyčí. Vlevo nahoře jsou lokalizovány dva jasně zeleně svítící

kulaté objekty, opět se s největší pravděpodobností jedná o zbytky membrán lyzovaných erytrocytů.



Obrázek 29 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v bujónu infuze mozkové a srdeční tkáně (brain-heart infusion).

Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv FM 1-43 a SYPRO Ruby, barviva nebyla po inkubaci odmyta. Bakterie – zelené granulární zóny. Biofilmová matrix – červeno-oranžové (proteiny) plochy. Zvětšeno 400×.

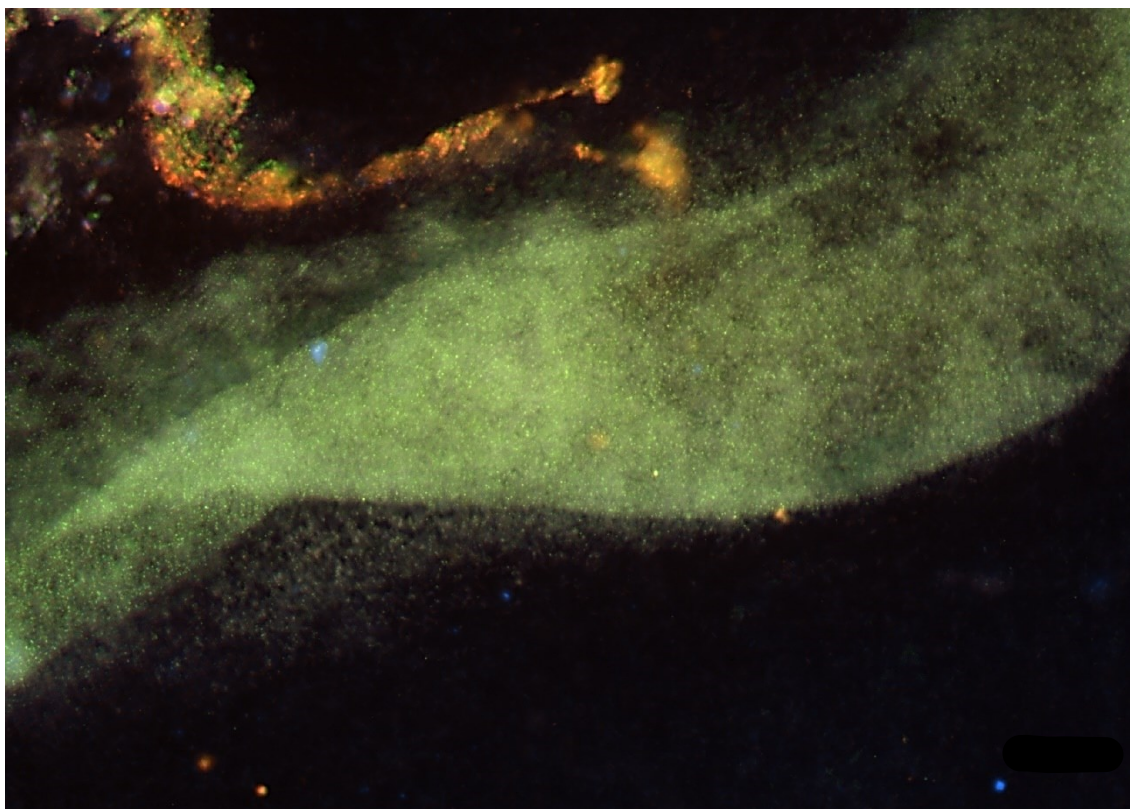


Obrázek 30 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v Lubbockově médiu simulující chronickou ránu. Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv FM 1-43 a SYPRO Ruby, barviva nebyla po inkubaci odmyta. Bakterie – slabě zelené tyče. Biofilmová matrix – červeno-oranžové (proteiny) prosvítající plochy. Bílé šipky ukazují na zbytky membrán lyzovaných erytrocytů (zelené kulaté objekty). Zvětšeno 400×.

### 8.2.6 Barvení směsí 5

Barvicí směs obsahovala FM 1-43 (1 µg/ml), SYPRO Ruby (20 % (v/v)) a dále CW. Bylo očekáváno, že bakteriální buňky budou značené zeleně, proteiny v matrixi značeny červeně a polysacharidy v matrixi značeny modře. Barviva nebyla po inkubaci odmyta.

Výstupem barvení je Obrázek 31 zobrazující biofilm naformovaný v BHI. Bakteriální buňky byly obarvené pomocí FM 1-43 (zelená granulární hmota), bez náznaku morfologie tyčí. Nahoře vlevo je také patrná proteinová matrix (oranžovo-červeně) značeno pomocí SYPRO Ruby. CW značící polysacharidovou matrixi není zcela patrná. Je však zřejmé, že zelená plocha (bakteriální buňky) nevykazuje tak jasnou zelenou emisi jako u jiných směsí obsahující FM 1-43, plocha působí spíše více tyrkysově. Je tedy vysoce pravděpodobné, že došlo ke skladbě zelené a modré plochy, tzn. exopolysacharidy biofilmové matrixe jsou pravděpodobně přítomny právě v této oblasti.



Obrázek 31 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v bujónu infuze mozkové a srdeční tkáně (brain-heart infusion).

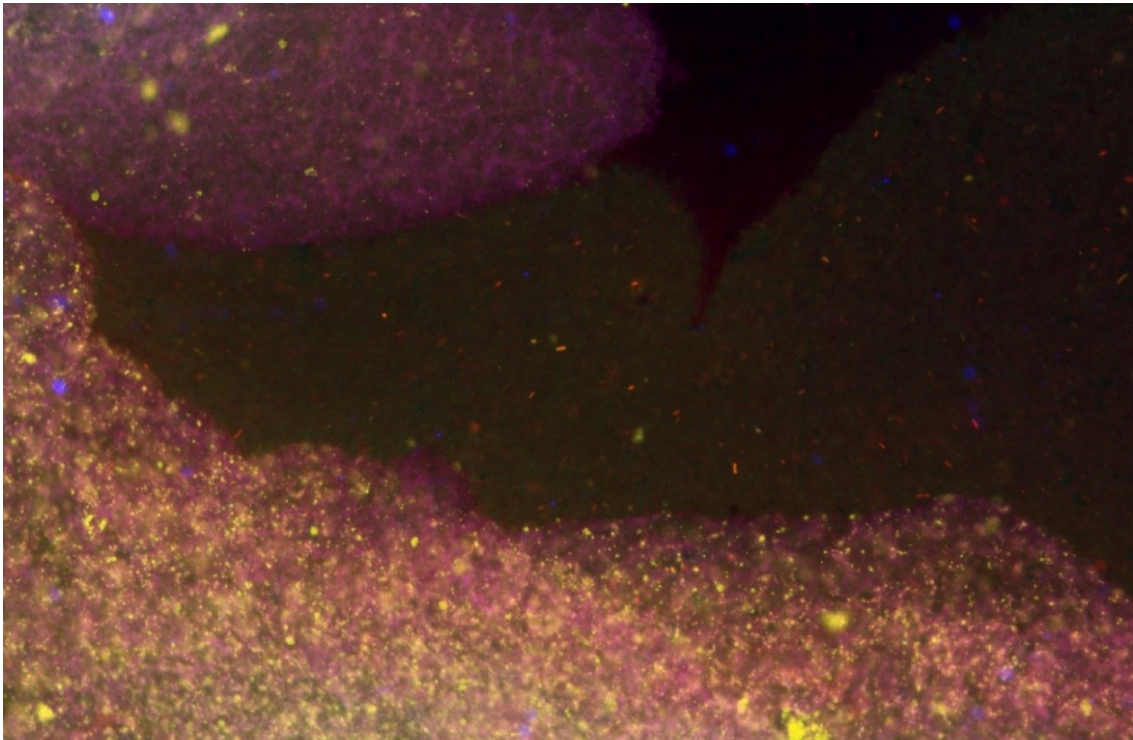
Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv FM 1-43, SYPRO Ruby a kalkofluorovou bělobou. Bakterie – zelené granulární zóny. Biofilmová matrix – červeno-oranžové (proteiny) plochy a tyrkysová (polysacharidy) plocha. Zvětšeno 400 $\times$ .

### 8.2.7 Barvení směsí 6

Barvicí směs 6 obsahovala fluorescenční barviva FM 1-43 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) a PI (20  $\mu\text{g/ml}$ ). Po inkubaci biofilmů s barvicí směsí nedošlo k odmytí nenavázaných barviv. Preparáty byly následně dodatečně obarveny pomocí CW. Bylo očekáváno, že na buněčnou membránu bakterií se naváže zeleně emitující FM 1-43 a na DNA mrtvých buněk navíc červeně emitující PI. Mrtvé bakteriální buňky by se pak měly jevit jako červené, případně zelené s červeným středem. V biofilmové matrici mělo dojít k vazbě červeného PI na eDNA a modré CW na sacharidovou matrici.



Výsledek barvení preparátu biofilmu naformovaného v BHI je zdokumentován na Obrázku 32. Buňky v centrální oblasti snímku a napravo vykazují morfologii červených tyčí obarvených pomocí PI (pravděpodobně mrtvé buňky). V denzní matici však nelze jednoznačně odlišit morfologii tyčí. Matrice obsahuje žlutou granulární hmotu, v tomto případě jde pravděpodobně o bakteriální buňky. Fialová matrice vznikla pravděpodobně skladbou červené a modré barvy, tedy důsledkem PI značící eDNA a CW zviditelňující sacharidovou matici. Pro významnou skladbu barev je však hodnocení tohoto snímku značně obtížné.



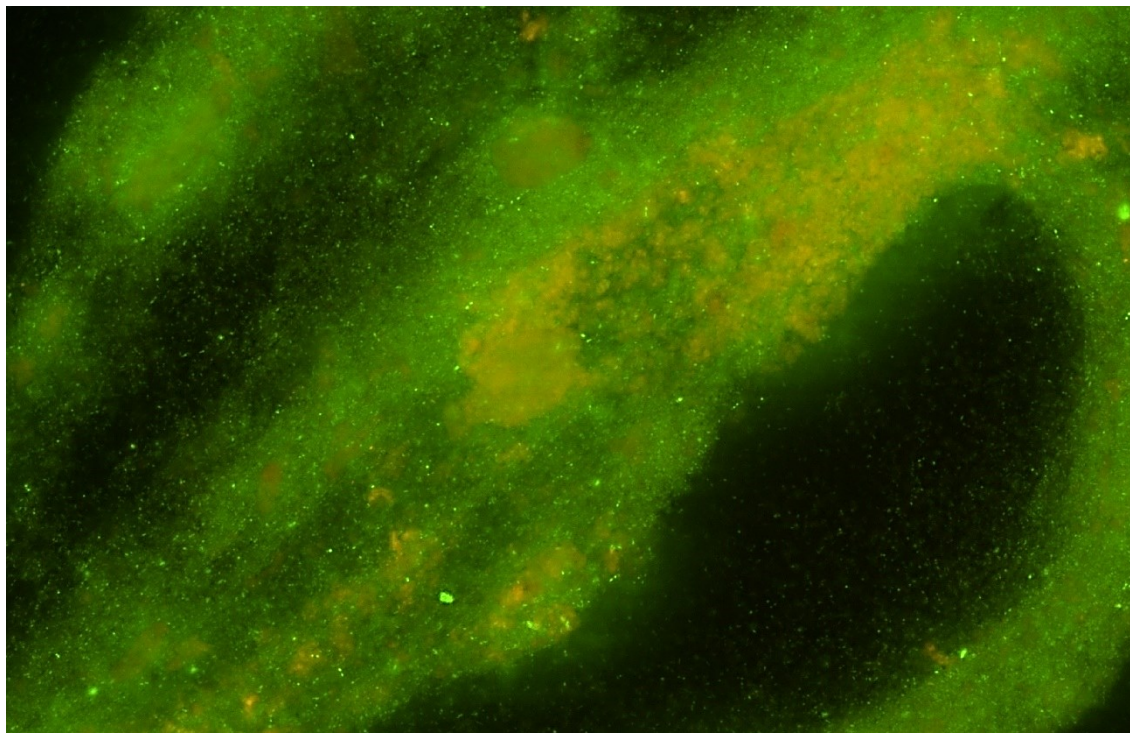
Obrázek 32 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v bujónu infuze mozkové a srdeční tkáně (brain-heart infusion).

Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv FM 1-43, propidium jodid a kalkofluorovou bělobou. Bakterie – žluté granulární zóny a červené tyče. Biofilmová matrix – fialová (polysacharidy a extracelulární DNA) plocha. Zvětšeno 400x.

### 8.2.8 Barvení směsí 7a

Barvicí směs obsahovala SYTO 9 (5  $\mu\text{M}$ ) a SYPRO Ruby (20 % (v/v)). Dle očekávání se na DNA bakteriálních buněk a eDNA mělo navázat zeleně emitující barvivo SYTO 9 a na proteiny v biofilmové matici červeně emitující SYPRO Ruby. Barvicí směs nebyla po inkubaci odmyta.

Na Obrázku 33 je biofilm bakterie *P. aeruginosa* naformovaný v Lubbockově médiu, který potvrzuje výše zmíněná očekávání. Bakteriální buňky jsou vizualizovány jako zelená granulární hmota. Zelené neostře ohraničené plochy v okolí bakteriálních buněk znázorňují eDNA. Přítomnost proteinů v biofilmové matrici dokládá oranžová emise.

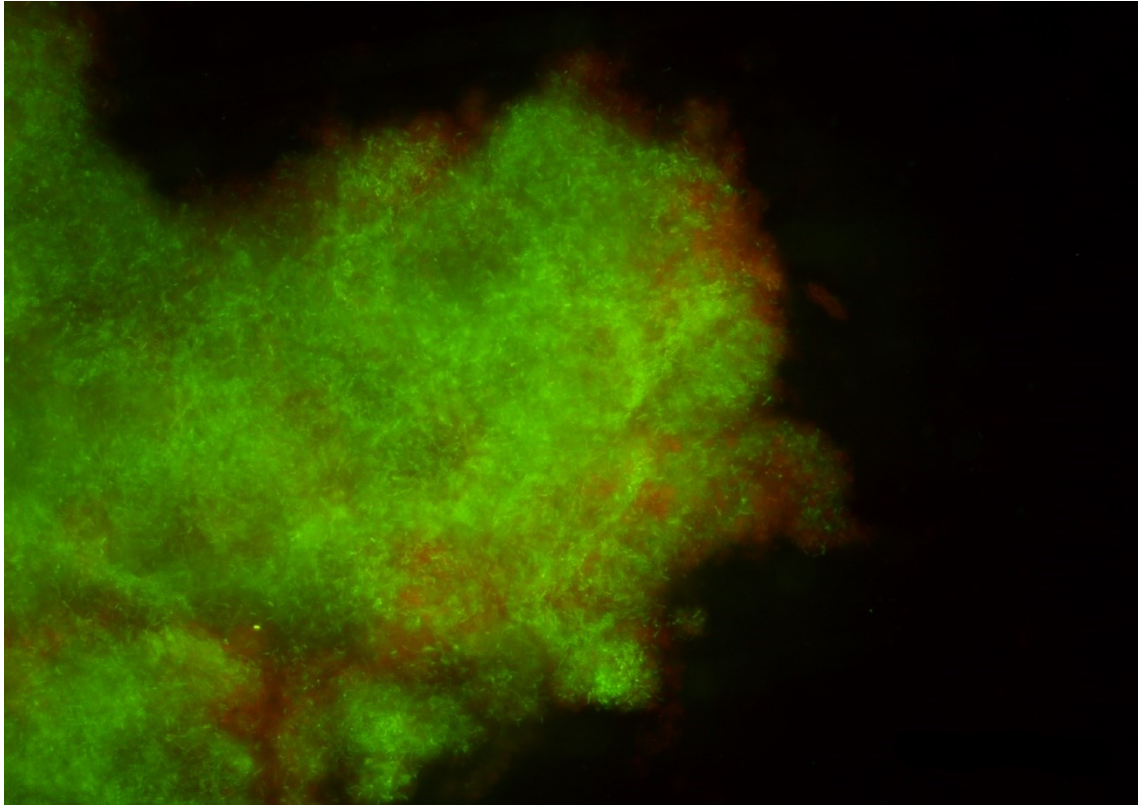


Obrázek 33 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v Lubbockově médiu simulující chronickou ránu. Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv SYTO 9 a SYPRO Ruby. Bakterie – zelené granulární zóny. Biofilmová matrix – lehce oranžové (proteiny) a zelené (extracelulární DNA) neostře ohraničené plochy. Zvětšeno 400×.

### 8.2.9 Barvení směsí 7b

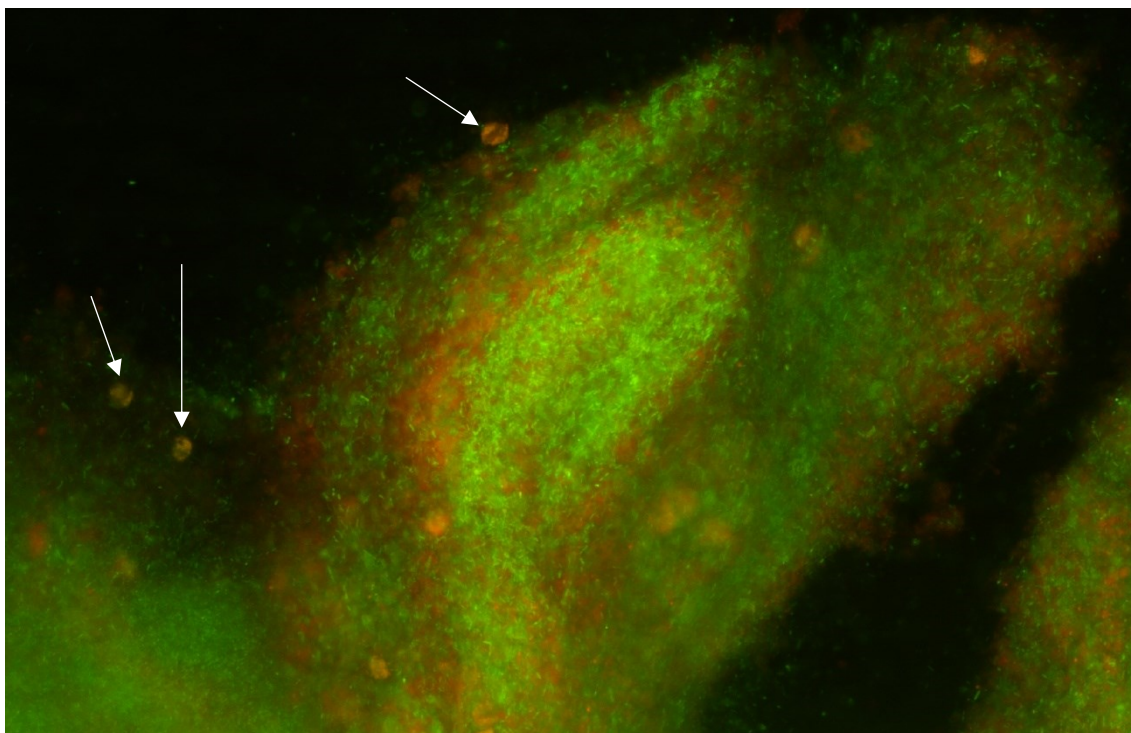
Barvicí směs obsahovala SYTO 9 (5  $\mu\text{M}$ ) a SYPRO Ruby (50 % (v/v)). Očekávané výstupy byly shodné jako v případě barvení směsí 7a.

Preparát biofilmu naformovaném v Lubbockově médiu, u něhož nedošlo k odmytí barvicí směsi po inkubaci (Obrázek 34) zobrazuje bakteriální buňky obarvené zeleně s rozeznatelnou morfologií tyčí. V jejich okolí se nachází neostře ohraničené zelené plochy (eDNA). Celou zachycenou část biofilmu podsvěcuje červeně značená proteinová matrice, nejvýrazněji viditelná při okrajích biofilmu.



**Obrázek 34** Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v Lubbockově médiu simulující chronickou ránu. Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv SYTO 9 a SYPRO Ruby, barviva nebyla po inkubaci odmyta. Bakterie – zelené tyče. Biofilmová matrix – červené (proteiny) a zelené (extracelulární DNA) neostře ohraničené plochy. Zvětšeno 400×.

Preparát biofilmu naformovaného v Lubbockově médiu s odmytými barvivy po inkubaci (Obrázek 35) poskytuje shodné výsledky jako v případě preparátu s neodmytými barvivy. Barvicí směs opět efektivně odlišila proteinovou matici (červeno-oranžové plochy) a bakteriální buňky (zelené tyče). V okolí bakteriálních buněk lze opět pozorovat zelené neostře ohraničené zelené plochy, tedy eDNA. Na Obrázku 35 je opět možné pozorovat červeně obarvené pozůstatky lyzovaných erytrocytů (některé z nich jsou označeny šipkami).



Obrázek 35 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v Lubbockově médiu simulující chronickou ránu.

Biofilm byl obarven kombinací fluorescenčních barviv SYTO 9 a SYPRO Ruby, barviva byla po inkubaci odmyta. Bakterie – zelené tyče. Biofilmová matrix – červeno-oranžové (proteiny) a zelené (extracelulární DNA) neostře ohraničené plochy. Bílé šipky ukazují na některé ze zbytků membrán lyzovaných erytrocytů (oranžové kulaté objekty).

Zvětšeno 400×.

## 9. DISKUSE

Kosmopolitně rozšířená bakterie *Pseudomonas aeruginosa* jakožto významný producent biofilmů znamená i přes dnešní moderní postupy v medicíně náročnou klinickou výzvu. Kvůli její rezistenci vůči širokému spektru antibiotik, a důsledkem přidané rezistence způsobené schopností tvořit biofilmy, je potřeba věnovat se výzkumu nových sloučenin či alternativních přístupů limitující, nebo ještě lépe likvidující její růst jak v planktonní formě, tak v rámci biofilmů. Na tento fakt dlouhodobě upozorňuje i Světová zdravotnická organizace (6).

Ke zjištění, zda nové kandidátní antibiotické a antibiofilmové látky či alternativní přístupy v terapii bakteriálních biofilmových infekcí efektivně fungují, je zapotřebí využít vhodného hodnocení. Jedna z dílčích efektivních metod tohoto hodnocení je i přímé sledování s použitím specifických fluoroforů pomocí fluorescenční mikroskopie.

I přes doporučené pracovní protokoly od výrobců je vždy nutné si danou metodiku přizpůsobit individuálním podmínkám vědeckého pracoviště. Primárním cílem této práce byla tedy optimalizace metodiky vizualizace biofilmových společenství bakterie *P. aeruginosa* prostřednictvím fluorescenční mikroskopie. Aby bylo možné jednotlivé barvicí směsi efektivně zhodnotit, bylo nutné naformování reprezentativních biofilmů. Proto byl stanoven dílčí cíl: zhodnocení vlivu kultivačních médií na samotné formování biofilmové biomasy bakterie *P. aeruginosa*.

Bylo vybráno pět nutričně rozdílných kultivačních médií. V praxi se využívá řada médií sloužící ke kultivaci biofilmů *P. aeruginosa* jmenovitě Luria-Bertani médium (76), M9 minimální živné médium (77), ale i další média použitá v naší práci, tedy BHI a Lubbockovo médium simulující chronické rány (78), MHB a TSB (79), nebo třeba RPMI médium (80). U stafylokokových biofilmů byla prokázána zvýšená tvorba biofilmové biomasy při suplementaci kultivačního média LP, proto byla LP zařazena i do našich experimentů (81). Média TSB, RPMI byla suplementovaná 10 % (v/v) LP. V Lubbockově médiu je podíl LP dokonce 50 % (v/v).

Biofilm může být definován jako společenství mikroorganismů pevně přisedlé k povrchu nebo k sobě navzájem. Vyznačuje se především 3D strukturou a přítomností biofilmové matrice.

Pro posouzení vlivu konkrétních nutričních podmínek byly biofilmy obarveny již dříve optimalizovanou kombinací fluorescenčních barviv SYTO 9 (5  $\mu$ M, vizualizace živých buněk), PI (20  $\mu$ g/ml, vizualizace mrtvých buněk a eDNA v matrici) a doplňkově CW (vizualizace cukernatých komponent biofilmové matrice). Hodnotícími kritérii byla přítomnost matrice, viabilita buněk a 3D prostorové uspořádání, ačkoli to bylo vlivem přípravy preparátů značně narušeno.

Největší zastoupení biofilmové matrice spolu s přítomností bakteriálních buněk ve vysoké denzitě (znamenantící přítomnost 3D struktury) bylo pozorováno v případě kultivačních médií BHI, Lubbock a TSB + 10 % LP. Vzhledem k pokročilé maturaci biofilmů v médiu BHI však docházelo k obtížné manipulaci, v médiích Lubbock a TSB + 10 % LP nebyl tento jev pozorován. Naopak v kultivačních médiích MHB a RPMI + 10 % LP nebyla ve velkém množství pozorována přítomnost matrice ani významná 3D struktura. Nicméně nutriční dostupnost všech médií byla k zachování viability bakterie *P. aeruginosa* dostačující, což dosvědčuje převažující množství jasně morfologicky rozeznatelných zelených tyčí.

Naše zjištění o vhodnosti kultivačních médií korelují i s Wijesinghe *et al.*, kde bylo kultivační médium BHI ve srovnání s RPMI vyhodnoceno jako vhodnější pro formování biofilmů bakterie *P. aeruginosa* (70).

Naopak naše výsledky se rozcházejí se závěry práce Lopes *et al.*, kde byl porovnáván vliv kultivačních médií BHI, MHB a TSB na tvorbu biofilmové biomasy bakterie *P. aeruginosa*. Největší množství biofilmové biomasy bylo zaznamenáno v médiu MHB, a až poté následovala média TSB a BHI. Je však potřeba zdůraznit, že zde bylo pro hodnocení biofilmové biomasy použito hodnocení *in situ* spektrofotometricky pomocí krystalové violeti (82). V naší práci jsme však hodnotili biofilmy mikroskopicky *ex situ* po přenosu biofilmů na podložní skla. Při tomto přenosu hrozí riziko ztráty biofilmové biomasy, což může vést ke zkreslení výsledků. Předmětem této práce byla ale primárně optimalizace vizualizace biofilmů bakterie *P. aeruginosa* pomocí fluorescenční mikroskopie, a proto další metody porovnávající jednotlivá společenství nebyly zahrnuty.

K další optimalizaci barvicích směsí byly tedy použity biofilmy bakterie *P. aeruginosa* naformované v médiích BHI, Lubbock a TSB + 10 % LP.

Na všech snímcích zachycujících biofilmy obarvené barvicí směsí SYTO 9 + PI + CW (Obrázky 18-22) jsou také dobře patrné modré artefakty, které byly zpravidla vždy rozprostřeny po celém preparátu. Fluorofor CW se váže na  $\beta$ -1-3 a  $\beta$ -1-4 vazby polysacharidů (60). Některé studie popisují, že alginát, obsahující mimo jiné zmíněnou vazbu, se vyskytuje jako povrchový polysacharid obalující bakteriální buňku (83, 84). Modré artefakty pak mohly poukazovat právě na tento fenomén, a CW by v tomto případě mohla sloužit jako fluorescenční sonda značící povrchový alginát.

Již zavedená metodika s použitím barvicí směsi SYTO 9 + PI + CW a směsi SYTO 9 + PI dokázala zviditelnit a rozlišit jednotlivé složky biofilmů. Zvláštní pozornost byla však při vizuálním hodnocení mikroskopických snímků věnována barvení eDNA. Udává se, že při kombinaci SYTO 9 a PI dochází ke značení eDNA výhradně prostřednictvím PI (74, 85). To by mělo být způsobené vyšší afinitou barviva PI k DNA než je tomu u barviva SYTO 9 a mechanismem fluorescenčního rezonančního přenosu energie (fluorescence resonance energy transfer, FRET) (55). V naší práci však neostře ohraničené plochy přisuzované eDNA byly obarveny jak červeně, tak zeleně, tzn. na eDNA musela být navázána obě barviva, tedy jak SYTO 9, tak PI (viz Obrázky 18, 19, 20, 22, 23). Toto zjištění koreluje s prací Wang *et al.*, kde je možnost překrývajících se ploch eDNA značených pomocí PI a SYTO 9 uváděna (86).

Překvapivé výsledky lze pozorovat u barvicí směsi SYTO 9 + PI (Obrázek 23). V tomto případě se zdá, jako by fluorofory obarvily požadované složky biofilmu zcela opačně. Barvením byla dosažena zelená matrice a majoritně červené tyče, tedy mrtvé buňky. Rosenberg *et al.* však poukazuje na to, že hodnocení viability bakteriálních buněk pomocí kombinace barviv PI a SYTO 9 může nadhodnotit počet mrtvých buněk, což může být případ našeho snímku. Signál PI navázaného na eDNA kolem buněk může zastínit emisi SYTO 9 lokalizovaného intracelulárně. V případě bakterie *Salmonella typhimurium* byly prokázány interakce membránových povrchových amyloidních fibril s eDNA, což způsobilo emisi PI lokalizovaného pouze periferně vně buňky (87). Pro bakterii *P. aeruginosa* by při těchto interferencích mohly být zásadní interakce povrchových pili typu IV a eDNA, jelikož tyto struktury k sobě navzájem mají silnou afinitu (10).

Použití barvicí směsi FM 1-43 + CW vedlo k dobrému odlišení sacharidů obsažených v biofilmové matrici a bakteriálních buněk, jejichž morfologie byla

v nepřekrývajících se místech dobře rozpoznatelná. Tato kombinace byla použita i k obarvení biofilmu bakterie *Clostridium perfringens* v práci Charlebois *et al.* (88). V naší práci byl však vynechán promývací krok, čímž bylo dosaženo zjednodušení pracovního postupu při zachování kvality výsledků.

V rámci optimalizace směsí FM 1-43 a SYPRO Ruby o klesající koncentraci bylo vycházeno z pracovních protokolů výrobce, kde se udává optimální koncentrace barviva FM 1-43 1 µg/ml a barvivo SYPRO Ruby je dodávané od výrobce v koncentraci připravené k použití. Fluorescenční barvivo FM 1-43 vykazuje emisi pouze po navázání se na cytoplazmatickou membránu, a není tedy nutné jeho odmytí. U barviva SYPRO Ruby se tato informace nepodařila dohledat, a proto bylo v rámci optimalizace zohledněno promývání a nepromývání nenavázaného barviva ve směsi FM 1-43 a SYPRO Ruby.

V případě směsi FM 1-43 + SYPRO Ruby 90 % (v/v) nebyly výsledky barvení optimální, jelikož nebylo jednoznačně možné odlišit bakteriální buňky a proteiny v matrici biofilmu. Složení směsi FM 1-43 + SYPRO Ruby 50 % (v/v) vycházelo z metodiky práce Pham *et al.* (89). Vzhled preparátu po odmytí nenavázaných fluorescenčních barviv v podstatě naplnil požadovaná očekávání. Nicméně ani v tomto případě nebylo možné pozorovat jednoznačnou tyčkovitou morfologii bakterie *P. aeruginosa*.

Jelikož pro směsi obsahující SYPRO Ruby o koncentracích 90 a 50 % (v/v) vykazovaly preparáty, u nichž nebyla nenavázaná barviva odmyta, vyšší signál pozadí (červené celkové podsvícení), je možné, že barvivo SYPRO Ruby vykazuje, na rozdíl od FM 1-43, určitou míru fluorescence, aniž by bylo navázané.

Pro zjednodušení postupu, a tím pádem i snížení rizika vnesení chyby, bylo přistoupeno k ještě většímu snížení koncentrace barviva SYPRO Ruby na 20 % (v/v) a vynechání odmyvacího kroku. Tímto krokem bylo dosaženo podobného výsledku, jako v případě barvicí směsi, kde bylo SYPRO Ruby o koncentraci 50 % (v/v) v kombinaci s odmyvacím krokem. Ani v tomto případě však nebylo možné pozorovat morfologii tyčí *P. aeruginosa*.

Pro komplexnější analýzu matrice biofilmů *P. aeruginosa* byly zařazeny barvicí směsi FM 1-43 + SYPRO Ruby + CW, kde bylo předpokládáno, kromě odlišení buněk



tvořících biofilm, také rozlišení proteinů a sacharidů v matrici a směs FM 1-43 + PI + CW, kde bylo očekáváno rozlišení životaschopných bakterií od mrtvých, a navíc vizualizaci eDNA a sacharidů v matrici. Bohužel výsledné mikroskopické snímky nebyly optimální, a tyto hypotézy tak nebylo možné potvrdit.

Poslední barvená kombinace se opírala o práce Vermilyea *et al.*, Frank a Patel (90, 91). Byla zde použita barviva SYTO 9 + SYPRO Ruby, kdy SYPRO Ruby bylo o koncentracích 50 a 20 % (v/v). Nejlepších výsledků bylo v tomto případě dosaženo za použití barvicí směsi se SYPRO Ruby o koncentraci 50 % (v/v), v tomto případě byla pozorována jasná morfologie tyčí, a navíc bylo zjištěno, že odmyvací krok nenavázaného barviva je možné vynechat, čímž dojde opět k zefektivnění práce a snížení rizika vnesení chyby.

Je známo, že mikroorganismy jsou schopné do matrice svých biofilmů inkorporovat debris exogenního původu (92). Například bakterie *P. aeruginosa* do matrice biofilmů v chronických ranách začleňuje kolagen, eDNA po NETóze neutrofilů, případně ionty z okolí (93). Kandidové biofilmy dokáží integrovat do své matrice i hostitelské epiteliální buňky (94). V rámci naší práce se nám tento fenomén podařilo zaznamenat. Lubbockovo médium obsahovalo mimo jiné lyzované ovčí erytrocyty, jejichž zbytky membrán byly pozorovány ve strukturách biofilmů při použití fluorescenčních barviv FM 1-43 značící cytoplazmatickou membránu (Obrázky 27 a 30) a SYPRO Ruby značící proteiny, v případě erytrocytů šlo tedy pravděpodobně o proteiny zabudované ve struktuře cytoplazmatické membrány (Obrázek 35).

## 10. ZÁVĚR

Tato práce v rámci teoretické části uvádí recentní informace o monodruhových biofilmech bakterie *P. aeruginosa*, jejich složení a mechanismech tvorby. Dále přibližuje klinický dopad biofilmů bakterie *P. aeruginosa*, zejména v případech infekcí u pacientů s cystickou fibrózou, u lidí trpících chronickými ranami a při kontaminacích lékařských přístrojů a dalších zdravotnických pomůcek. V závěru teoretické části je přiblížena problematika vizualizace biofilmů pomocí fluorescenční mikroskopie se zaměřením na fluorofory použité v rámci experimentální části (FM 1-43, SYPRO Ruby, SYTO 9, propidium jodid a kalkofluorová běloba).

Během experimentální části práce bylo zjištěno, že jako nejvhodnější kultivační média pro kultivaci biofilmů bakterie *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) se v našem metodickém uspořádání jeví média BHI, Lubbock a TSB + 10 % LP. Je však potřeba zdůraznit, že pro hodnocení vlivu kultivačních médií na růst biofilmů nebyly použity žádné speciální kvantifikační metody, růst byl hodnocen pouze subjektivně na základě makroskopického a mikroskopického pozorování.

Efektivní vizualizace biofilmů byla dosažena pomocí již optimalizované kombinace barviv SYTO 9 + PI + CW a SYTO 9 + PI. V případě kombinování barviv SYTO 9 a PI je však potřeba dbát na možné nežádoucí nadhodnocení mrtvých buněk. Další účinnou směsí bez nutnosti odmývání barviv se jevila kombinace FM 1-43 a SYPRO Ruby (20 % (v/v)). SYPRO Ruby však pravděpodobně dokáže emitovat fluorescenční záření i v případě nenavázání se na cílovou strukturu, a proto je třeba brát tuto skutečnost v úvahu. Jako další směsi účinně zviditelňující složky biofilmů bez nutnosti odmývání barviv se osvědčily kombinace barviv FM 1-43 + CW a SYTO 9 + SYPRO Ruby (50 % (v/v)).

## 11. POUŽITÉ ZKRATKY

Zkratka	Význam	Původ
BHI	infuze mozkové a srdeční tkáně	<u>b</u> rain- <u>h</u> ear <u>t</u> i <u>n</u> fusion; angl.
Ca <sup>2+</sup>	vápenaté ionty	
CAUTIs	s katétrem spojené infekce močových cest	<u>c</u> atheter- <u>a</u> ssociated <u>u</u> rinary <u>t</u> ract i <u>n</u> fections; angl.
c-di-GMP	cyklický diguanosinmonofosfát	<u>c</u> yclic <u>d</u> iguanosine- <u>m</u> onophosphate; angl.
CF	cystická fibróza	
CFTR	protein regulátoru transmembránové vodivosti cystické fibrózy	<u>c</u> ystic <u>f</u> ibrosis <u>t</u> ransmembrane conductance <u>r</u> egulator; angl.
CLSM	konfokální laserová skenovací mikroskopie	<u>c</u> onfocal <u>l</u> aser <u>s</u> canning <u>m</u> icroscopy; angl.
CW	kalkofluorová běloba	<u>c</u> alcofluor <u>w</u> hite; angl.
DMSO	<u>d</u> imethyl <u>s</u> ulf <u>o</u> xid	
DNA	deoxyribonukleová kyselina	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid; angl.
eDNA	extracelulární deoxyribonukleová kyselina	<u>e</u> xtracellular <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid; angl.

ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter</i> spp.	
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie	fluorescence resonance energy transfer; angl.
LP	lidská plasma	
Mg <sup>2+</sup>	hořečnaté ionty	
MHB	Mueller-Hinton bujón	
Mn <sup>2+</sup>	manganaté ionty	
N <sub>2</sub> O	oxid dusný	
NO <sup>2-</sup>	nitrit	
NO <sup>3-</sup>	nitrát	
OD	optická densita	
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
PI	propidium jodid	propidium iodide; angl.
RNA	ribonukleová kyselina	ribonucleic acid; angl.
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina	ribosomal ribonucleic acid; angl.
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
TSB	trypto-kasein sójový bujón	tryptic soy broth; angl.

VAP	pneumonie ventilovaných nemocných	<u>v</u> entilator- <u>a</u> ssociated <u>p</u> neumonia; angl.
WHO	Světová zdravotnická organizace	<u>W</u> orld <u>H</u> ealt <u>O</u> rganization; angl.
Zn <sup>2+</sup>	zinečnaté ionty	

## **12. SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Finální barvicí směsi, jejich složení a koncentrace .....	36
---	----

## 13. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Fenotypy bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na pseudomonádovém izolativním agaru. ....	14
Obrázek 2 Schéma formování biofilmu.....	17
Obrázek 3 Charakteristika častých biofilmových infekcí <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	18
Obrázek 4 Schéma optické dráhy epifluorescenčního mikroskopu.....	24
Obrázek 5 Excitační a emisní spektrum fluorescenčního barviva FM 1-43.....	25
Obrázek 6 Struktura molekuly fluorescenčního barviva FM 1-43.....	25
Obrázek 7 Excitační a emisní spektrum fluorescenčního barviva SYPRO Ruby. ....	26
Obrázek 8 Struktura molekuly fluorescenčního barviva SYPRO Ruby. ....	26
Obrázek 9 Excitační a emisní spektrum fluorescenčního barviva SYTO 9.....	27
Obrázek 10 Excitační a emisní spektrum navázaného fluorescenčního barviva propidium jodid na DNA. ....	27
Obrázek 11 Struktura molekuly fluorescenčního barviva propidium jodid. ....	28
Obrázek 12 Excitační a emisní spektrum fluorescenčního barviva kalkofluorová běloba. ....	28
Obrázek 13 Struktura molekuly fluorescenčního barviva kalkofluorová běloba.....	29
Obrázek 14 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1) na Mueller-Hinton agaru.....	37
Obrázek 15 Schéma pipetování zaočkovaných médií bakterií <i>Pseudomonas aeruginosa</i> do jamek mikrotitrační destičky. ....	38
Obrázek 16 Mikrotitrační destička se zaočkovanými médii bakterií <i>Pseudomonas aeruginosa</i> před 24h inkubací.....	39
Obrázek 17 Mikrotitrační destička s naformovanými biofilmy bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	40
Obrázek 18 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v bujónu infuze mozkové a srdeční tkáně (brain-heart infusion). ...	43
Obrázek 19 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v Mueller-Hinton bujónu.....	44
Obrázek 20 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v trypto-kasein sojovém bujónu suplementovaný lidskou plasmou. ....	45
Obrázek 21 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v RPMI 1640 médiu suplementované lidskou plasmou.....	46
Obrázek 22 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v Lubbockově médiu simulující chronickou ránu.....	47
Obrázek 23 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v bujónu infuze mozkové a srdeční tkáně (brain-heart infusion). ...	48
Obrázek 24 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v Lubbockově médiu simulující chronickou ránu.....	49
Obrázek 25 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v bujónu infuze mozkové a srdeční tkáně (brain-heart infusion). ...	50
Obrázek 26 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v bujónu infuze mozkové a srdeční tkáně (brain-heart infusion). ...	51
Obrázek 27 Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v Lubbockově médiu simulující chronickou ránu.....	52

<i>Obrázek 28</i> Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v bujónu infuze mozkové a srdeční tkáně (brain-heart infusion). ...	53
<i>Obrázek 29</i> Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v bujónu infuze mozkové a srdeční tkáně (brain-heart infusion). ...	54
<i>Obrázek 30</i> Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v Lubbockově médiu simulující chronickou ránu.....	55
<i>Obrázek 31</i> Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v bujónu infuze mozkové a srdeční tkáně (brain-heart infusion). ...	56
<i>Obrázek 32</i> Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v bujónu infuze mozkové a srdeční tkáně (brain-heart infusion). ...	57
<i>Obrázek 33</i> Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v Lubbockově médiu simulující chronickou ránu.....	58
<i>Obrázek 34</i> Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v Lubbockově médiu simulující chronickou ránu.....	59
<i>Obrázek 35</i> Mikroskopický snímek biofilmu bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) formovaného 24 h v Lubbockově médiu simulující chronickou ránu.....	60



## 14. POUŽITÁ LITERATURA

1. WU, Weihui, Yongxin JIN, Fang BAI a Shouguang JIN. Chapter 41 - *Pseudomonas aeruginosa*. V knize: Yi-Wei TANG, Max SUSSMAN, Dongyou LIU, Ian POXTON a Joseph SCHWARTZMAN, ed. *Molecular Medical Microbiology* [online]. 2. vydání. Boston: Academic Press, 2015, s. 753–767. ISBN 978-0-12-397169-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X
2. HURYCH, Jakub, Roman ŠTÍCHA, Ivana HANZALOVÁ, Ľudmila KŘÍŽOVÁ a Kateřina TICHÁ. *Lékařská mikrobiologie – repetitorium*. 1. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, 2020. ISBN 978-80-7553-844-4.
3. SPAGNOLO, Anna Maria, Marina SARTINI a Maria Luisa CRISTINA. *Pseudomonas aeruginosa* in the healthcare facility setting. *Reviews and Research in Medical Microbiology* [online]. 2021, **32**(3). Dostupné z: doi:10.1097/MRM.0000000000000271
4. MULANI, Mansura S., Ekta E. KAMBLE, Shital N. KUMKAR, Madhumita S. TAWRE a Karishma R. PARDESI. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2019, **10**. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.00539
5. DE OLIVEIRA, David M. P., Brian M. FORDE, Timothy J. KIDD, Patrick N. A. HARRIS, Mark A. SCHEMBRI, Scott A. BEATSON, David L. PATERSON a Mark J. WALKER. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2020, **33**(3). Dostupné z: doi:10.1128/cmr.00181-19
6. WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. *World Health Organization* [online]. 2017 [vid. 2023-03-23]. Dostupné z: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
7. KVASNIČKOVÁ, Eva. Biofilmy: Život mikroorganismů v jednotném společenství - Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. [www.vscht.cz](http://www.vscht.cz) [online]. 2016 [vid. 2023-03-25]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/popularizace/doktorandi-pisou/biofilmy>
8. GHAFOR, Aamir, Iain D. HAY a Bernd H. A. REHM. Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2011, **77**(15). Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00637-11
9. MAURICE, Nicholas M., Brahmchetna BEDI a Ruxana T. SADIKOT. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* [online]. 2018, **58**(4). Dostupné z: doi:10.1165/rcmb.2017-0321TR
10. HARMSEN, Morten, Liang YANG, Sünje J. PAMP a Tim TOLKER-NIELSEN. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* [online]. 2010, **59**(3). Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00690.x
11. THÖMING, Janne G. a Susanne HÄUSSLER. *Pseudomonas aeruginosa* Is More Tolerant Under Biofilm Than Under Planktonic Growth Conditions: A Multi-Isolate Survey. *Frontiers*

- in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2022, **12**. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2022.851784
12. BYRD, Matthew S., Irina SADOVSKAYA, Evgueny VINOGRADOV, Haiping LU, April B. SPRINKLE, Stephen H. RICHARDSON, Luyan MA, Brad RALSTON, Matthew R. PARSEK, Erin M. ANDERSON, Joseph S. LAM a Daniel J. WOZNAK. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Molecular Microbiology* [online]. 2009, **73**(4). Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x
  13. WEI, Qing a Luyan Z. MA. Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2013, **14**(10). Dostupné z: doi:10.3390/ijms141020983
  14. JENNINGS, Laura K., Kelly M. STOREK, Hannah E. LEDVINA, Charlene COULON, Lindsey S. MARMONT, Irina SADOVSKAYA, Patrick R. SECOR, Boo Shan TSENG, Michele SCIAN, Alain FILLOUX, Daniel J. WOZNAK, P. Lynne HOWELL a Matthew R. PARSEK. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2015, **112**(36). Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1503058112
  15. SKARIYACHAN, Sinosh, Vaishnavi Sneha SRIDHAR, Swathi PACKIRISAMY, Supreetha Toplar KUMARGOWDA a Sneha Basavaraj CHALLAPILLI. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiologica* [online]. 2018, **63**(4). Dostupné z: doi:10.1007/s12223-018-0585-4
  16. DAMRON, F. Heath a Joanna B. GOLDBERG. Proteolytic regulation of alginate overproduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* [online]. 2012, **84**(4). Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08049.x
  17. SARKAR, Subendu. Release mechanisms and molecular interactions of *Pseudomonas aeruginosa* extracellular DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2020, **104**(15). Dostupné z: doi:10.1007/s00253-020-10687-9
  18. REICHHARDT, Courtney, Cynthis WONG, Daniel PASSOS DA SILVA, Daniel J. WOZNAK a Matthew R. PARSEK. CdrA Interactions within the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix Safeguard It from Proteolysis and Promote Cellular Packing. *mBio* [online]. 2018, **9**(5). Dostupné z: doi:10.1128/mbio.01376-18
  19. REICHHARDT, Courtney, Holly M. JACOBS, Michael MATWICHUK, Cynthis WONG, Daniel J. WOZNAK a Matthew R. PARSEK. The Versatile *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix Protein CdrA Promotes Aggregation through Different Extracellular Exopolysaccharide Interactions. *Journal of Bacteriology* [online]. 2020, **202**(19). Dostupné z: doi:10.1128/jb.00216-20
  20. MANN, Ethan E. a Daniel J. WOZNAK. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2012, **36**(4). Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x
  21. JURADO-MARTÍN, Irene, Maite SAINZ-MEJÍAS a Siobhán MCCLEAN. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors.

- International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(6). Dostupné z: doi:10.3390/ijms22063128
22. THI, Minh Tam Tran, David WIBOWO a Bernd H. A. REHM. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(22). Dostupné z: doi:10.3390/ijms21228671
  23. TUON, Felipe Francisco, Leticia Ramos DANTAS, Paula Hansen SUSS a Victoria Stadler TASCIA RIBEIRO. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens* [online]. 2022, **11**(3). Dostupné z: doi:10.3390/pathogens11030300
  24. MOSER, Claus, Peter Østrup JENSEN, Kim THOMSEN, Mette KOLPEN, Morten RYBTKE, Anne Sofie LAULAND, Hannah TRØSTRUP a Tim TOLKER-NIELSEN. Immune Responses to *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Frontiers in Immunology* [online]. 2021, **12**. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2021.625597
  25. CENDRA, Maria del Mar a Eduard TORRENTS. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their partners in crime. *Biotechnology Advances* [online]. 2021, **49**. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2021.107734
  26. TOLKER-NIELSEN, Tim. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: From molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS* [online]. 2014, **122**(s138). Dostupné z: doi:10.1111/apm.12335
  27. AKIYAMA, Tatsuya, Kerry S. WILLIAMSON, Robert SCHAEFFER, Shawna PRATT, Connie B. CHANG a Michael J. FRANKLIN. Resuscitation of *Pseudomonas aeruginosa* from dormancy requires hibernation promoting factor (PA4463) for ribosome preservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2017, **114**(12). Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1700695114
  28. EHSAN, Zarmina a John P CLANCY. Management of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients using inhaled antibiotics with a focus on nebulized liposomal amikacin. *Future Microbiology* [online]. 2015, **10**(12). Dostupné z: doi:10.2217/fmb.15.117
  29. BHAGIRATH, Anjali Y., Yanqi LI, Deepti SOMAYAJULA, Maryam DADASHI, Sara BADR a Kangmin DUAN. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulmonary Medicine* [online]. 2016, **16**. Dostupné z: doi:10.1186/s12890-016-0339-5
  30. SOUCHE, Aubin, François VANDENESCH, Anne DOLÉANS-JORDHEIM a Karen MOREAU. How *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Hijack the Host Immune Response in the Context of Cystic Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2023, **24**(7). Dostupné z: doi:10.3390/ijms24076609
  31. WAGNER, Victoria E. a Barbara H. IGLEWSKI. *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* [online]. 2008, **35**(3). Dostupné z: doi:10.1007/s12016-008-8079-9
  32. JUNG, In Young, Su Jin JEONG, Kang-Mu LEE, Jin Young AHN, Nam Su KU, Sang Hoon HAN, Jun Yong CHOI, Dongeun YONG, Sang Sun YOON, Young Goo SONG, Seok Hoon JEONG, June Myung KIM a Kyungwon LEE. Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia: Clinical impact of mucA gene mutation. *Respiratory Medicine* [online]. 2018, **140**. Dostupné z: doi:10.1016/j.rmed.2018.05.017

33. SMITH, Wynne D., Emmanuelle BARDIN, Loren CAMERON, Claire L. EDMONDSON, Katie V. FARRANT, Isaac MARTIN, Ronan A. MURPHY, Odel SOREN, Andrew R. TURNBULL, Natasha WIERRE-GORE, Eric W. ALTON, Jacob G. BUNDY, Andrew BUSH, Gary J. CONNETT, Saul N. FAUST, Alain FILLOUX, Paul S. FREEMONT, Andrew L. JONES, Zoltan TAKATS, Jeremy S. WEBB, Huw D. WILLIAMS a Jane C. DAVIES. Current and future therapies for *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *FEMS microbiology letters* [online]. 2017, **364**(14). Dostupné z: doi:10.1093/femsle/fnx121
34. HATTEMER, Angela, Alan HAUSER, Maureen DIAZ, Marc SCHEETZ, Nirav SHAH, Jonathan P. ALLEN, Jahan PORHOMAYON a Ali A. EL-SOLH. Bacterial and Clinical Characteristics of Health Care- and Community-Acquired Bloodstream Infections Due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2013, **57**(8). Dostupné z: doi:10.1128/aac.02467-12
35. GIL-PEROTIN, Sara, Paula RAMIREZ, Veronica MARTI, Jose Miguel SAHUQUILLO, Eva GONZALEZ, Isabel CALLEJA, Rosario MENENDEZ a Juan BONASTRE. Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. *Critical Care* [online]. 2012, **16**(3). Dostupné z: doi:10.1186/cc11357
36. BADAL, Divakar, Abhijith Vimal JAYARANI, Mohammed Ameen KOLLARAN, Aloke KUMAR a Varsha SINGH. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on endotracheal tubes requires multiple two-component systems. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2020, **69**(6). Dostupné z: doi:10.1099/jmm.0.001199
37. HAN, Haijie, Yifan GAO, Mengyin CHAI, Xiaobo ZHANG, Shaorui LIU, Yue HUANG, Qiao JIN, Andrzej GRZYBOWSKI, Jian JI a Ke YAO. Biofilm microenvironment activated supramolecular nanoparticles for enhanced photodynamic therapy of bacterial keratitis. *Journal of Controlled Release* [online]. 2020, **327**. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2020.09.014
38. RYBTKE, Morten, Louise Dahl HULTQVIST, Michael GIVSKOV a Tim TOLKER-NIELSEN. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2015, **427**(23). Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2015.08.016
39. TURNER, Keith H., Jake EVERETT, Urvish TRIVEDI, Kendra P. RUMBAUGH a Marvin WHITELEY. Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* Acute Burn and Chronic Surgical Wound Infection. *PLOS Genetics* [online]. 2014, **10**(7). Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1004518
40. NIDADAVOLU, Pushpalatha, Wail AMOR, Phat L. TRAN, Janet DERTIEN, Jane A. COLMER-HAMOOD a Abdul N. HAMOOD. Garlic ointment inhibits biofilm formation by bacterial pathogens from burn wounds. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2012, **61**(5). Dostupné z: doi:10.1099/jmm.0.038638-0
41. WILSON, Christina, Rachel LUKOWICZ, Stefan MERCHANT, Helena VALQUIER-FLYNN, Jeniffer CABALLERO, Jasmin SANDOVAL, Macduff OKUOM, Christopher HUBER, Tessa Durham BROOKS, Erin WILSON, Barbara CLEMENT, Christopher D. WENTWORTH a Andrea E. HOLMES. Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Research & Reviews. Journal of Engineering and Technology* [online]. 2017, **6**(4). Dostupné z: <https://www.rroij.com/open-access/quantitative-and-qualitative-assessment-methods-for-biofilm-growth-a-minireview-.pdf>

42. KISHEN, Anil a Markus HAAPASALO. Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endodontic Topics* [online]. 2012, **22**(1). Dostupné z: doi:10.1111/j.1601-1546.2012.00285.x
43. REICHHARDT, Courtney a Matthew R. PARSEK. Confocal Laser Scanning Microscopy for Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Architecture and Matrix Localization. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2019, **10**. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.00677
44. MONTAÑEZ-IZQUIERDO, Vanessa Y., Dora I. SALAS-VÁZQUEZ a José J. RODRÍGUEZ-JEREZ. Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. *Food Control* [online]. 2012, **23**(2). Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2011.08.016
45. WIRTANEN, Gun, Timo ALANKO a Tiina MATTILA-SANDHOLM. Evaluation of epifluorescence image analysis of biofilm growth on stainless steel surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 1996, **5**(6). Dostupné z: doi:10.1016/0927-7765(95)01226-5
46. JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH. *Možnosti využití zobrazovací fluorescence chlorofylu a* [online]. 2020 [vid. 2024-04-18]. Dostupné z: [https://kebr.prf.jcu.cz/download/lectures/KEBR220/KEBR220\\_U03-Kutikularni\\_propustnost\\_fluorescencne-2020.pdf](https://kebr.prf.jcu.cz/download/lectures/KEBR220/KEBR220_U03-Kutikularni_propustnost_fluorescencne-2020.pdf)
47. LICHIOUS, Alexander a Susanne ZEILINGER. Application of Membrane and Cell Wall Selective Fluorescent Dyes for Live-Cell Imaging of Filamentous Fungi. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* [online]. 2019, (153). Dostupné z: doi:10.3791/60613
48. INVITROGEN. FilmTracer™ FM® 1-43 Green Biofilm Cell Stain Catalog no. F10317. *ThermoFisher Scientific* [online]. 2009 [vid. 2024-01-29]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp10317.pdf>
49. THERMOFISHER. Fluorescence SpectraViewer. *ThermoFisher Scientific* [online]. nedatováno [vid. 2024-01-30]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer>
50. INVITROGEN. FilmTracer™ SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain Catalog no. F10318. *ThermoFisher Scientific* [online]. 2009 [vid. 2024-01-30]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp10318.pdf>
51. YARMOLUK, Sergiy, Vladyslava KOVALSKA a Kateryna VOLKOVA. Optimized Dyes for Protein and Nucleic Acid Detection. V knize: Alexander DEMCHENKO, ed. *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology III* [online]. 1. vydání. Heidelberg: Springer Berlin, 2011, s. 161–199. ISBN 978-3-642-18034-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-18035-4\_5
52. THERMOFISHER. SYPRO™ Ruby Protein Blot Stain. *ThermoFisher Scientific* [online]. nedatováno [vid. 2024-01-30]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S11791>

53. GEBRU, Tamirat, Benjamin MORDMÜLLER a Jana HELD. Effect of Fluorescent Dyes on *In Vitro*-Differentiated, Late-Stage *Plasmodium falciparum* Gametocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2014, **58**(12). Dostupné z: doi:10.1128/AAC.03772-14
54. LIFE TECHNOLOGIES. SYTO® Green-Fluorescent Nucleic Acid Stains. *ThermoFisher Scientific* [online]. 2014 [vid. 2024-01-30]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp07572.pdf>
55. DENG, Ying, Lili WANG, Yujia CHEN a Yan LONG. Optimization of staining with SYTO 9/propidium iodide: interplay, kinetics and impact on *Brevibacillus brevis*. *BioTechniques* [online]. 2020, **69**(2). Dostupné z: doi:10.2144/btn-2020-0036
56. THERMOFISHER. Propidium Iodide. *ThermoFisher Scientific* [online]. nedatováno [vid. 2024-04-18]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/propidium-iodide.html>
57. BECKMAN. Propidium Iodide Excitation and Emission Spectrum. *Beckman Coulter Life Sciences* [online]. nedatováno [vid. 2024-04-18]. Dostupné z: <https://www.beckman.com/reagents/coulter-flow-cytometry/cell-health-research-assays/propidium-iodide-spectrum>
58. SIGMA-ALDRICH. Propidium Iodide. *Merck Sigma-Aldrich* [online]. nedatováno [vid. 2024-01-30]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/mm/537059>
59. SIGMA-ALDRICH. *Technical Bulletin Calcofluor White Stain Suitable for microbiology Catalog Number 18909* [online]. 2021 [vid. 2024-01-30]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/383/810/18909bul-mk.pdf>
60. FLORCZUK, Aleksandra, Michał ZAŁĘCKI a Marek ALJEWICZ. The applicability of Calcofluor White (CWS) and Fluorescent Brightener (CFB) dyes for confocal laser microscopic analysis (CLSM) of various  $\beta$ -glucans in selected dairy products and water. *Food Chemistry* [online]. 2023, **404**. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2022.134508
61. BISHT, Karishma, Alex R. LUECKE a Catherine A. WAKEMAN. Temperature-specific adaptations and genetic requirements in a biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2023, **13**. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2022.1032520
62. ANONYMOUS. Calcofluor white 2MR. *Fluorophores Tu Graz* [online]. nedatováno [vid. 2024-01-30]. Dostupné z: <https://fluorophores.tugraz.at/substance/273>
63. PUBCHEM. Fluorescent Brightener 28. *PubChem National Library of Medicine* [online]. nedatováno [vid. 2024-01-30]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6434593>
64. SIGMA-ALDRICH. Brain Heart Infusion Broth for microbiology BHI Broth. *Merck Sigma-Aldrich* [online]. nedatováno [vid. 2023-10-30]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sial/53286>
65. SIGMA-ALDRICH. *70192 Mueller Hinton Broth (M-H Broth)* [online]. nedatováno [vid. 2023-10-30]. Dostupné

z: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/152/408/70192dat.pdf>

66. SIGMA-ALDRICH. Tryptic Soy Broth general purpose microbial culture media. *Merck Sigma-Aldrich* [online]. nedatováno [vid. 2023-10-30]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sial/22092>
67. THERMOFISHER. *Quality matters: stock culture maintenance protocol* [online]. 2021 [vid. 2023-12-07]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/brochures/QC-Stock-Culture-Maintenance-Protocol-EN.pdf>
68. THERMOFISHER. RPMI 1640 Medium. *ThermoFisher Scientific* [online]. nedatováno [vid. 2023-10-30]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11875093>
69. GULATI, Megha, Matthew B. LOHSE, Craig L. ENNIS, Ruth E. GONZALEZ, Austin M. PERRY, Priyanka BAPAT, Ashley Valle AREVALO, Diana L. RODRIGUEZ a Clarissa J. NOBILE. *In Vitro* Culturing and Screening of *Candida albicans* Biofilms. *Current protocols in microbiology* [online]. 2018, **50**(1). Dostupné z: doi:10.1002/cpmc.60
70. WIJESINGHE, Gayan, Ayomi DILHARI, Buddhika GAYANI, Nilwala KOTTEGODA, Lakshman SAMARANAYAKE a Manjula WEERASEKERA. Influence of Laboratory Culture Media on *in vitro* Growth, Adhesion, and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Medical Principles and Practice* [online]. 2018, **28**(1). Dostupné z: doi:10.1159/000494757
71. EUCAST. *EUCAST antifungal MIC method for yeasts* [online]. 2017 [vid. 2023-12-07]. Dostupné z: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Files/EUCAST\\_E\\_Def\\_7\\_3\\_1\\_Yeast\\_testing\\_definitive.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_7_3_1_Yeast_testing_definitive.pdf)
72. DIBAN, Firas, Silvia DI LODOVICO, Paola DI FERMO, Simonetta D'ERCOLE, Sara D'ARCANGELO, Mara DI GIULIO a Luigina CELLINI. Biofilms in Chronic Wound Infections: Innovative Antimicrobial Approaches Using the *In Vitro* Lubbock Chronic Wound Biofilm Model. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2023, **24**(2). Dostupné z: doi:10.3390/ijms24021004
73. SUN, Yan, Scot E. DOWD, Ethan SMITH, Dan D. RHOADS a Randall D. WOLCOTT. *In vitro* multispecies Lubbock chronic wound biofilm model. *Wound Repair and Regeneration* [online]. 2008, **16**(6). Dostupné z: doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00434.x
74. OKSHEVSKY, Mira a Rikke Louise MEYER. Evaluation of fluorescent stains for visualizing extracellular DNA in biofilms. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2014, **105**. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2014.07.010
75. AKSAMITIENE, Edita. Templates. *Cell Signaling Network* [online]. 2012 [vid. 2023-10-21]. Dostupné z: <https://www.cellsignet.com/media/templ.html>
76. SHE, Pengfei, Yanle WANG, Yiqing LIU, Fang TAN, Lihua CHEN, Zhen LUO a Yong WU. Effects of exogenous glucose on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *MicrobiologyOpen* [online]. 2019, **8**(12). Dostupné z: doi:10.1002/mbo3.933

77. KANNAN, Ashwin a Pennathur GAUTAM. A quantitative study on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *SpringerPlus* [online]. 2015, **4**(1). Dostupné z: doi:10.1186/s40064-015-1029-0
78. POUGET, Cassandra, Catherine DUNYACH-REMY, Alix PANTEL, Sophie SCHULDINER, Albert SOTTO a Jean-Philippe LAVIGNE. New Adapted *In Vitro* Technology to Evaluate Biofilm Formation and Antibiotic Activity Using Live Imaging under Flow Conditions. *Diagnostics* [online]. 2021, **11**(10). Dostupné z: doi:10.3390/diagnostics11101746
79. ROBINSON, Victoria H., Sue PATERSON, Cheryl BENNETT a Stephen I. STEEN. Biofilm production of *Pseudomonas spp.* isolates from canine otitis in three different enrichment broths. *Veterinary Dermatology* [online]. 2019, **30**(3). Dostupné z: doi:10.1111/vde.12738
80. BUYCK, Julien M., Patrick PLÉSIAT, H. TRAORE, F. VANDERBIST, Paul M. TULKENS a Françoise VAN BAMBEKE. Increased Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Macrolides and Ketolides in Eukaryotic Cell Culture Media and Biological Fluids Due to Decreased Expression of oprM and Increased Outer-Membrane Permeability. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2012, **55**(4). Dostupné z: doi:10.1093/cid/cis473
81. CARDILE, Anthony P., Carlos J. SANCHEZ, Meghan E. SAMBERG, Desiree R. ROMANO, Sharanda K. HARDY, Joseph C. WENKE, Clinton K. MURRAY a Kevin S. AKERS. Human plasma enhances the expression of Staphylococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules promoting biofilm formation and increases antimicrobial tolerance *In Vitro*. *BMC Research Notes* [online]. 2014, **7**(1). Dostupné z: doi:10.1186/1756-0500-7-457
82. SOARES LOPES, Leonardo Quintana, Pedro GUERIM, Roberto Christ VIANNA SANTOS, Flavia MARQUEZAN KOLLING a Patrícia MARQUEZAN. The influence of different culture media on *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Bioscience Journal* [online]. 2023, **39**. Dostupné z: doi:10.14393/BJ-v39n0a2023-68631
83. RYAN WITHERS, T., F. HEATH DAMRON, Yeshi YIN a Hongwei D. YU. Truncation of type IV pilin induces mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO579. *MicrobiologyOpen* [online]. 2013, **2**(3). Dostupné z: doi:10.1002/mbo3.86
84. ZAIDI, Tanweer S., Tauqeer ZAIDI a Gerald B. PIER. Role of Neutrophils, MyD88-Mediated Neutrophil Recruitment, and Complement in Antibody-Mediated Defense against *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* [online]. 2010, **51**(4). Dostupné z: doi:10.1167/iops.09-4139
85. MINYARD, Morgan L., Mary Ann BRUNS, Laura J. LIERMANN, Heather L. BUSS a Susan L. BRANTLEY. Bacterial Associations with Weathering Minerals at the Regolith-Bedrock Interface, Luquillo Experimental Forest, Puerto Rico. *Geomicrobiology Journal* [online]. 2012, **29**(9). Dostupné z: doi:10.1080/01490451.2011.619640
86. WANG, Shiwei, Xi LIU, Hongsheng LIU, Li ZHANG, Yuan GUO, Shan YU, Daniel J. WOZNAK a Luyan Z. MA. The exopolysaccharide Psl–eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology Reports* [online]. 2015, **7**(2). Dostupné z: doi:10.1111/1758-2229.12252



87. ROSENBERG, Merilin, Nuno F. AZEVEDO a Angela IVASK. Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(1). Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-42906-3
88. CHARLEBOIS, Audrey, Mario JACQUES a Marie ARCHAMBAULT. Biofilm formation of *Clostridium perfringens* and its exposure to low-dose antimicrobials. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2014, **5**. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2014.00183
89. PHAM, Le Hoang Phu, Khanh Loan LY, Mariliz COLON-ASCANIO, Jin OU, Hao WANG, Sang Won LEE, Yi WANG, John S. CHOY, Kenneth Scott PHILLIPS a Xiaolong LUO. Dissolvable alginate hydrogel-based biofilm microreactors for antibiotic susceptibility assays. *Biofilm* [online]. 2023, **5**. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioflm.2022.100103
90. VERMILYEA, Danielle M., Gregory K. OTTENBERG a Mary E. DAVEY. Citrullination mediated by PPAD constrains biofilm formation in *P. gingivalis* strain 381. *npj Biofilms and Microbiomes* [online]. 2019, **5**(1). Dostupné z: doi:10.1038/s41522-019-0081-x
91. FRANK, Kristi L. a Robin PATEL. Poly-N-Acetylglucosamine Is Not a Major Component of the Extracellular Matrix in Biofilms Formed by icaADBC-Positive *Staphylococcus lugdunensis* Isolates. *Infection and Immunity* [online]. 2007, **75**(10). Dostupné z: doi:10.1128/iai.00640-07
92. SONGTANIN, Busara, Christopher J. PETERSON, Adebayo J. MOLEHIN a Kenneth NUGENT. Biofilms and Benign Colonic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(22). Dostupné z: doi:10.3390/ijms232214259
93. WELLS, Marilyn J., Hailey CURRIE a Vernita D. GORDON. Physiological Concentrations of Calcium Interact with Alginate and Extracellular DNA in the Matrices of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Impede Phagocytosis by Neutrophils. *Langmuir* [online]. 2023, **39**(48). Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.3c01637
94. NETT, Jeniel E., Robert ZARNOWSKI, Jonathan CABEZAS-OLCOZ, Erin G. BROOKS, Jörg BERNHARDT, Karen MARCHILLO, Deane F. MOSHER a David R. ANDES. Host Contributions to Construction of Three Device-Associated *Candida albicans* Biofilms. *Infection and Immunity* [online]. 2015, **83**(12). Dostupné z: doi:10.1128/iai.00931-15