

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY
V PRAZE

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Tvorba biofilmů u bakterií

Zuzana Sochorová

Školitel: RNDr. Jaroslav Weiser, CSc.

2009/2010

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama, s použitím uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Praha 2010

Zuzana Sochorová

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Jaroslavu Weiserovi, CSc. za pomoc a cenné rady při psaní mé bakalářské práce. Dále mé poděkování patří rodině a příteli za podporu nejen při psaní této práce, ale i během celého studia.

Abstrakt

Biofilmy jsou útvary tvořené mikroorganismy žijícími pohromadě v hydratované extracelulární matrix. Formace takových uskupení přináší bakteriím řadu výhod. Tou hlavní je zvýšená rezistence k antibiotikům. Vytváření biofilmu je analogické k vývoji mnohobuněčného organismu. Buňky v biofilmu spolu navzájem komunikují signálními molekulami, což tvoří biofilm kompaktnější strukturou. Extracelulární matrix, ve které bakterie žijí, udržuje strukturu biofilmu, ovlivňuje adhezi buněk a chrání buňky před vlivy prostředí. Prostřednictvím extracelulární matrix bakterie také komunikují s okolím. Matrix je tvořena různými biopolymery a proteiny. Biofilmy jsou častou příčinou infekcí spojených s implantáty. Způsobů, jak se bakterie v biofilmu brání působení antibiotik, je několik. Patří mezi ně zpomalená difúze látek, pomalý růst nebo adaptace na stres. Příčinou jejich přežití je i vytvoření perzistentních buněk, které jsou k antibiotiku tolerantní a ze kterých může vzniknout nová populace. Důležitým prvkem pro vznik biofilmu jsou povrchové proteiny, které napomáhají adhezi a následnému vzniku biofilmu. Prvním proteinem, který byl identifikován, byl protein Bap. Později byly nalezeny i jeho homology, například BapA, Esp, LapA či Bhp. Mezi bakterie, které tvoří biofilmy, patří mykobakterie. Na utváření jejich biofilmů má vliv mnoho faktorů, ať už přítomnost glykopeptidolipidů, mykolové kyseliny v jejich buněčné stěně či dostupnost CO₂.

Klíčová slova: biofilm, tvorba biofilmu, extracelulární polymerní substance, quorum sensing, rezistence bakterií v biofilmu, perzistence, povrchové proteiny, mykobakterie

Abstract

Biofilms are formed by microorganisms living together in a hydrated extracellular matrix. Formation of such clusters of bacteria brings many benefits. The increased resistance to antibiotics is the main one. Creating a biofilm is analogous to the development of multicellular organisms. Biofilm cells communicate with each other with signaling molecules. Signaling molecules make the biofilm more compact structure. Extracellular matrix, in which bacteria live, maintains biofilm structure, affects cell adhesion and protects cells against environmental influences. Bacteria also interact with the environment through the extracellular matrix. The matrix is composed of various biopolymers and proteins. Biofilms are a common cause of infections associated with implants. There are several ways to prevent bacteria in biofilm to antibiotics. These include a slow diffusion of substances, a slow growth or an adaptation to stress. The formation of persistent cells that are tolerant to the antibiotics is the cause of their survival as well as a new population may arise from them. The surface proteins are important elements for the formation of biofilms, they facilitate adhesion and subsequent establishment of biofilm. A protein Bap was the first identified protein. Later its homologues were found, such as BapA, Esp, LapA or Bhp. Mycobacteria belong to the bacteria that form biofilms. The formation of biofilms of mycobacteria is influenced by many factors: glycopeptidolipids, mycolic acids in their cell wall, or the availability of CO₂.

Key words: biofilm, formation of biofilm, extracellular polymeric substance, quorum sensing, resistance of bacteria in biofilms, persistence, surface proteins, mycobacteria

Osnova

Seznam použitých zkratk	7
1. Úvod	8
2. Bakteriální biofilmy	8
2.1. Obecná charakteristika	8
2.2. Vývoj biofilmu	9
2.3. Quorum sensing	10
2.3.1. QS u Gram-negativních bakterií	11
2.3.2. QS u Gram-pozitivních bakterií	12
2.4. Extracelulární polymerní substance	12
2.5. Bakteriální biofilmy a povrchy	13
3. Biofilmy a rezistence k antibiotikům	15
3.1. Antibiotika	15
3.2. Mechanismy rezistence	15
3.3. Bakteriální perzistence	17
3.4. Možnosti odstranění biofilmů	19
4. Biofilmy a bakteriální povrchové proteiny	19
4.1. Bap	19
4.2. Homology Bap	21
4.2.1. BapA	21
4.2.2. Esp	22
4.2.3. LapA	23
4.2.4. Bhp	23
4.3. <i>Ica</i> lokus a adhesin PIA/PNAG	24
4.4. Proteiny vázající glukany	25
5. Biofilmy u Mykobakterií	25
5.1. Mykobakterie	25
5.2. Faktory mající vliv na utváření biofilmu	26
5.2.1. Glykopeptidolipidy	26
5.2.2. Mykolové kyseliny	27
5.2.3. Ostatní faktory	27
6. Kultivace <i>Mycobacterium smegmatis</i> ve formě biofilmu a planktonické kultury	28
7. Závěr	30
8. Seznam použité literatury	31

Seznam použitých zkratek

PIA	polysaccharide intercellular adhesin; polysacharidový mezibuněčný adhesin
QS	quorum sensing
AHL	acetylated homoserine lacton; acetylovaný homoserin lakton
EPS	extracellular polymeric substance; extracelulární polymerní substance
PNAG	poly β -1,6-N-acetylglucosamine; poly β -1,6-N-acetylglukosamin
PMNs	polymorphonuclear neutrophils; polymorfní neutrofilly
PEG	polyethylenglycol; polyethylenglykol
ppGpp	guanosine tetrphosphate; guanosin tetrafosfát
PPK	polyphosphate kinase; polyfosfát kináza
TA	toxin-antitoxin
GlpD	glycerol-3-phosphate dehydrogenase; glycerol-3-fosfát dehydrogenáza
PlsB	glycerol-3-phosphate acetyltransferase; glycerol-3-fosfát acetyltranferáza
Bap	biofilm-associated protein; protein přidružený k biofilmu
Esp	enterococcal surface protein; povrchový protein bakterie <i>Enterococcus</i>
LapA	large associated protein; velký přidružený protein
Bhp	Bap homologue protein; protein homologní k Bap
Gbps	glucan binding proteins; proteiny vázající glukan
GPLs	glycopeptidolipids; glykopeptidolipidy
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex; komplex <i>Mycobacterium avium</i>
ssGPLs	serovar-specific glycopeptidolipids; serovar-specifické glykopeptidolipidy
nsGPLs	nonserovar-specific glycopeptidolipids; serovar-nespecifické glykopeptidolipidy
NPRGM	nonpigmented rapidly growing mycobacteria; nepigmentované rychle rostoucí mykobakterie

1. Úvod

V přírodě se mikroorganismy vyskytují v planktonní formě. Spoustu z nich ale ulpívá na povrchu a vytváří trojrozměrné útvary – biofilmy. Shromážděné bakterie jsou zanořené v hydratované matrix tvořené extracelulární polymerní substancí. Takovýto způsob života přináší mikroorganismům řadu výhod. Buňky v biofilmu spolu navzájem komunikují, což zvyšuje efektivitu biofilmu. Jsou více tolerantní k antibiotikům než planktonní buňky, tudíž jsou zodpovědné za mnoho akutních i chronických infekcí, vyskytují se na implantátech či kontaminují rozvody pitné vody. Jsou příčinou onemocnění lidí, živočichů i rostlin. Díky své zvýšené rezistenci k antibiotikům a jiným ochranným mechanismům je obtížné jimi způsobenou chorobu vyléčit nebo biofilmy zcela odstranit. Předmětem výzkumu dnešních mikrobiologů zabývajících se mikrobiálními biofilmy proto je převážně bližší studium jejich vývoje a snaha o porozumění tomu, jak biofilmy působí na svého hostitele a jeho imunitní systém. Na základě toho pak zlepšovat existující léčebné postupy a v neposlední řadě zjišťování postupů nových.

2. Bakteriální biofilmy

2.1. Obecná charakteristika

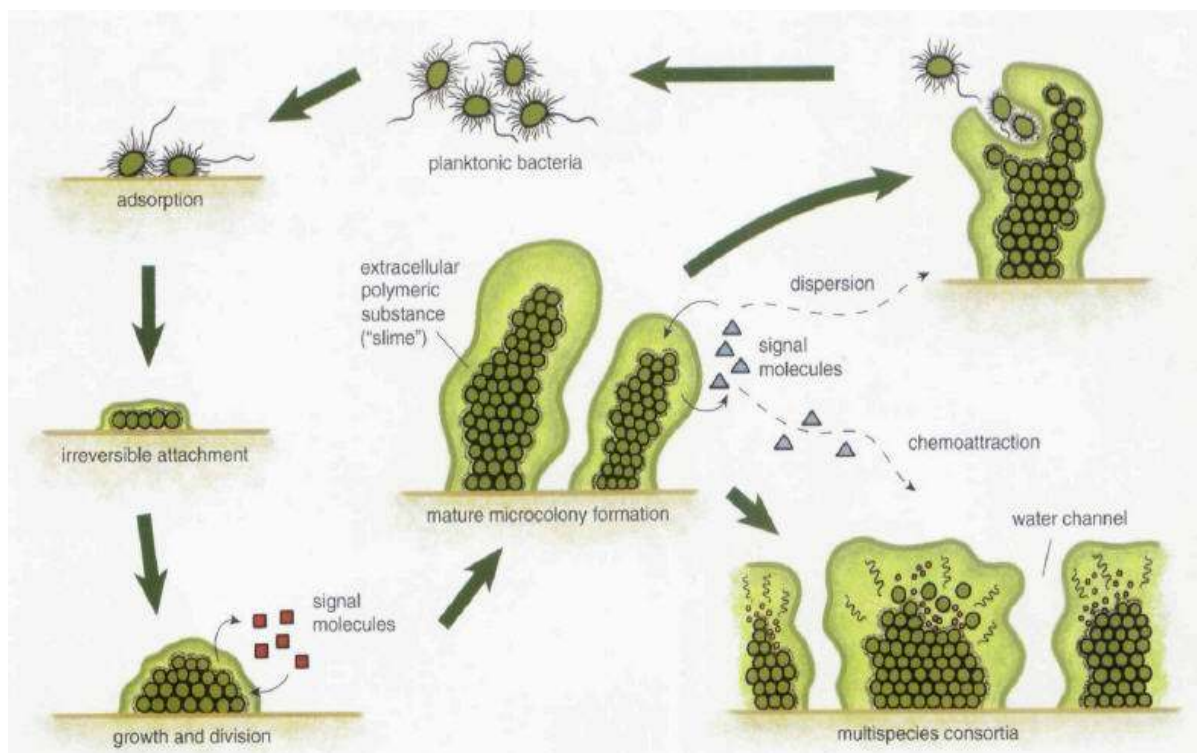
Mikroorganismy žijící pohromadě v hydratované extracelulární matrix jsou známy jako biofilmy. Mohou se vyvíjet na neživých i živých površích, jsou zdrojem různých infekcí [1] a často jsou tvořeny rozmanitou škálou druhů. Všudypřítomnost biofilmů v přírodě naznačuje, že život v uskupeních je klíčový pro ekologii a evoluci bakterií [2]. Selekcční tlak v některých prostředích způsobuje preferování růstu biofilmu oproti planktonním buňkám. Fyzikální a chemický charakter biofilmu přispívá ke zvýšené rezistenci k antimikrobiálním činidlům [3]. Vrstva biofilmu je většinou tak dostatečně silná, že je vidět pouhým okem. Právě proto se biofilmy řadily mezi první předměty zkoumání rozvíjející se mikrobiologie. Anton Van Leeuwenhoek použil svůj mikroskop a jako první pozoroval mikroorganismy z povrchu zubů (dentální plak) [4]. Metody pochopení molekulárních mechanismů a charakteristiky architektury biofilmu se velmi rozvíjí v posledních letech. Použití technik mikroskopických, jako je skenovací elektronová mikroskopie, a jiných je dnes běžné. Povrch biofilmu je různorodý. Mění se z hladkého na drsný či nerovnoměrný. Struktura povrchu je ovlivňována několika faktory. Jedním z nich je dostupnost živin [5]. Buňky na okrajích biofilmu získávají živiny difúzí z okolního prostředí a mají vliv na dostupnost živin pro buňky

uprostřed biofilmu. Výsledkem toho pak je, že buňky na okrajích rostou rychleji. Tloušťka biofilmu je závislá na rychlosti difúze živin a na rychlosti jejich zpracování. Když je živin dostatek, proniknou hlouběji a biofilm je pak silnější [5]. Bakterie vnímá hustotu buněk díky speciálnímu signálnímu systému zvanému quorum sensing. Při něm dochází k sekreci a detekci malých difúzních molekul označovaných jako autoinduktory [6]. Díky této signalizaci může bakterie monitorovat změny v hustotě populace, změny v prostředí a díky tomu regulovat genovou expresi a přizpůsobit ji tak potřebám biofilmu. Po první interakci s povrchem se spustí regulace mnoha genů. Prigent-Combaret et al. [7] uvedli, že dochází k rozdílné regulaci 38% genů *E. coli* v biofilmu oproti planktonním buňkám. V biofilmu dochází ke zvýšení metabolické účinnosti, buňky se tak rychleji zbavují zplodin metabolismu i škodlivých látek [1]. Produkují vyšší koncentrace toxinů a dokážou se vyhýbat imunitní obraně hostitele. Přisedlé bakterie uvolňují antigeny a stimulují produkci protilátek. Tyto protilátky ale nejsou účinné pro zabíjení bakterií chráněných v biofilmu a mohou způsobit imunitní poškození okolních tkání [1]. Biofilm je také ideálním prostředím pro horizontální genový přenos. Buňky jsou v bližším kontaktu a působí zde minimální střížné síly bránící poškození přenášené DNA. Plasmidy často kódují geny rezistence a toto je ideální cesta k jejich šíření [4]. Dochází ke zvyšování virulence mikroorganismů.

2.2. Vývoj biofilmu

Proces vývoje biofilmu je regulovaný pochod, kdy se jednobuněčné organismy seskupují a vytváří mnohobuněčný útvar. Lemon et al. [8] popsal obecný model vývoje biofilmu. V něm rozlišili vývoj u nepohyblivých a pohyblivých druhů. Když nastanou příznivé podmínky pro vznik biofilmu u nepohyblivých druhů, bakterie zvýší expresi adhesinů na svém povrchu. Zlepší se tím jak koheze buněk mezi sebou, tak adheze k povrchu. U rodu *Staphylococcus* jsou to převážně povrchové proteiny Bap [9]. Pohyblivé druhy za příhodných podmínek ztrácí svou pohyblivost a začnou produkovat extracelulární matrix, díky které drží pohromadě [8]. Vytváření biofilmu je analogické k vývoji mnohobuněčného organismu [10]. Zahrnuje několik kroků (viz obr. 1):

- 1) prvotní vazba bakterie k povrchu – adsorpce
- 2) vytváření jednovrstevného biofilmu
- 3) růst buněk a jejich dělení, migrace za účelem vzniku vícevrstevnaté kolonie
- 4) produkce extracelulární matrix
- 5) maturace (zrání) biofilmu a vytváření trojrozměrné struktury



Obr. 1 – Vytváření biofilmu [10].

Prvotní vazba je indukovaná signály z prostředí jako je koncentrace živin, pH, teplota, koncentrace kyslíku, osmolarita a další [1]. Prvotní vazbě napomáhají bičíky a její průběh trvá pouze několik sekund. Tato fáze je ještě vratná. Několik minut nato začínají další fáze, kdy se bakterie množí a komunikují chemickými signály. Produkovaná extracelulární matrix udržuje strukturu kolonie. Z jejích okrajů se mohou uvolnit planktonní buňky, které mohou jinde založit biofilm nový. Signální molekuly uvolňované z biofilmu mohou sloužit jako atraktant pro nalákání jiných druhů bakterií [10].

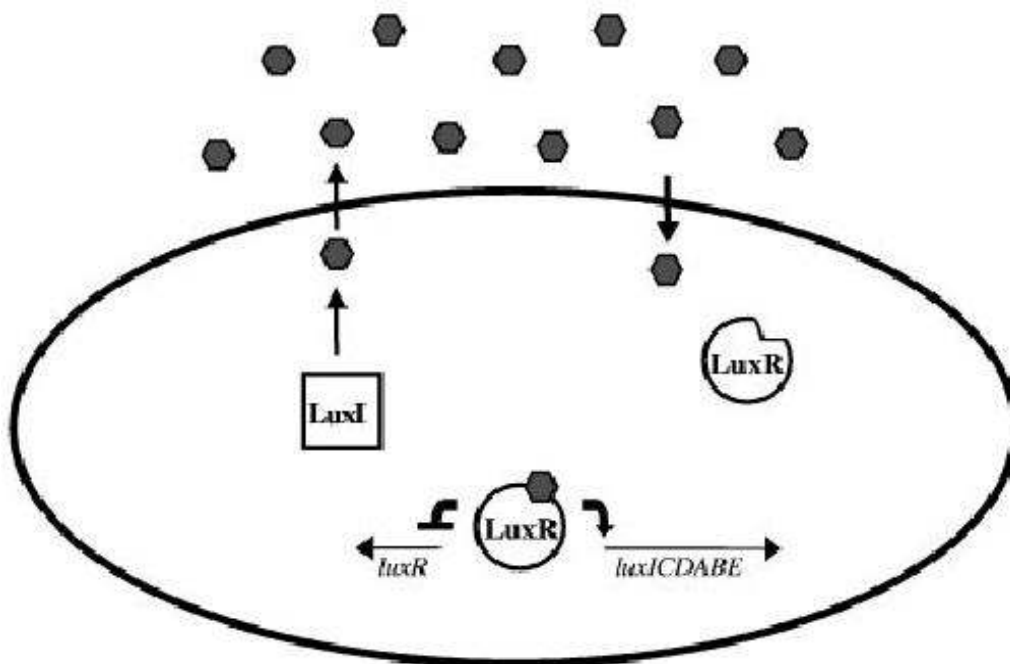
2.3. Quorum sensing

Jak již bylo řečeno, bakterie díky quorum sensing (QS) dokáže regulovat genovou expresi na základě vnímání hustoty populace. Buňka produkuje signální molekuly – autoinduktory. Jejich koncentrace se odvíjí od hustoty buněk. Pod kontrolou tohoto systému jsou i různé fyziologické aktivity jako je tvorba biofilmu, sporulace, bioluminiscence, produkce extracelulární matrix a další [11, 12]. QS se začalo zkoumat u luminiscentní bakterie *Vibrio fischeri*. Tyto bakterie produkují světlo pouze při vysoké koncentraci populace. Geny účastníci se vnímání hustoty populace byly analyzovány poprvé v roce 1983 právě u tohoto druhu. Zjistilo se, že důležitou roli zde hrají regulační proteiny LuxI

a LuxR [12]. Cílem dnešních mikrobiologů je pochopit evoluční vývoj QS a s ním související fenotypy biofilmu.

2.3.1. QS u Gram-negativních bakterií

Signální molekuly u Gram-negativních bakterií jsou specifické acetylované homoserin laktony (AHL). Jejich biosyntéza je pod kontrolou homologu regulačního proteinu LuxI *V. fischeri* [11]. Homolog LuxR proteinu váže signální molekulu, tento komplex se váže na promotor a aktivuje transkripci genů. Dochází k pozitivní regulaci a jsou tak syntetizovány další molekuly autoinduktorů [12]. QS založené na proteinových homolozích LuxI a LuxR bylo popsáno také u *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens* či *Erwinia carotovora* [11].



Obr. 2 – Schéma LuxI/LuxR u *V. fischeri* [11]. U *V. fischeri* je pět strukturních genů pro luciferázu (*luxCDABE*) a dva regulační geny (*luxI* a *luxR*) potřebné pro luminiscenci kontrolovanou QS. LuxI protein je zodpovědný za syntézu AHL signální molekuly, jeho koncentrace se zvýší, když je zvýšená hustota populace. LuxR protein váže autoinduktor a tento komplex se váže na promotor a aktivuje transkripci, současně reprimuje přepis genu *luxR*.

2.3.2. QS u Gram-pozitivních bakterií

U Gram-pozitivních bakterií slouží jako autoinduktory sekretované peptidy. Ty jsou transportovány z buňky pomocí ABC přenašeče. Signální dráha zde funguje na principu fosforylace a defosforylace [11]. Ta končí fosforylací regulačního proteinu, který se tak naváže na DNA a spustí přepis genů. QS bylo studováno u několika druhů bakterií, například *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* či *Staphylococcus aureus* [11].

2.4. Extracelulární polymerní substance

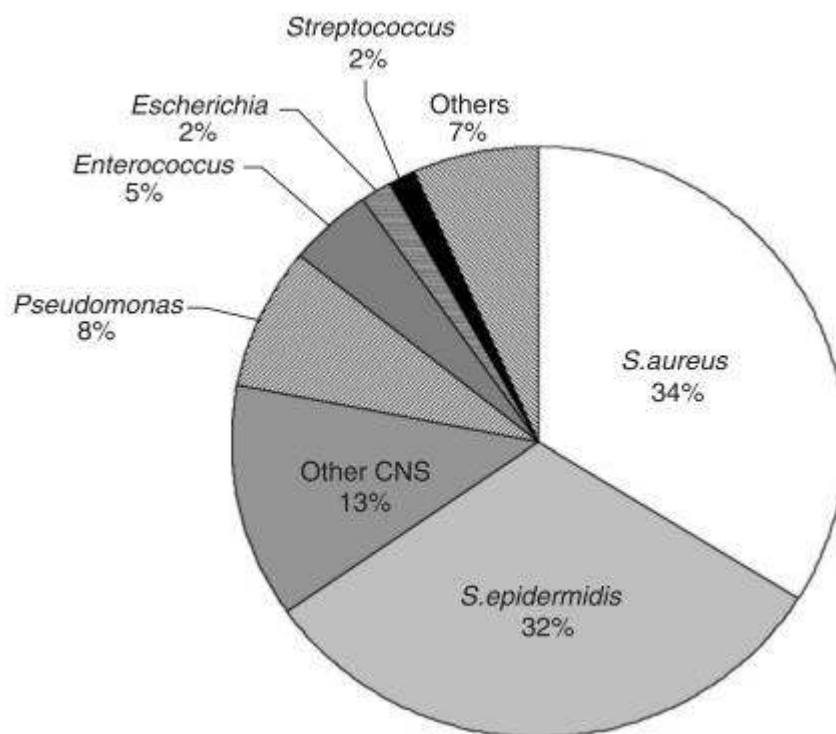
Extracelulární polymerní substanci (EPS) vytváří buňky vznikajícího biofilmu. Tato substance udržuje jeho strukturu a ovlivňuje aktuální podmínky v biofilmu. Mimo jiné také hraje roli při adhezi buněk a chrání buňky před vlivy prostředí [10]. EPS je tvořena biopolymery, obsahuje mnoho proteinů, polysacharidů, glykoproteinů, glykolipidů a množství extracelulární DNA (e-DNA) [13]. Biopolymery EPS jsou vysoce hydratované a vytváří matrix, která drží buňky biofilmu pohromadě a zadržuje vodu [13]. Matrix komunikuje s okolním prostředím a poskytuje biofilmu živiny. EPS produkují samy bakterie. Tvorba EPS je ovlivněna mnoha faktory, například druhem bakterie, fází růstu, dostupností živin či podmínkami prostředí [14]. Zjistilo se, že mnoho druhů bakterií je schopno produkovat celulózu jako složku EPS [15]. Dalším polysacharidem tvořícím matrix biofilmu je intercelulární adhesin PIA (polysaccharide intercellular adhesin) u rodu *Staphylococcus*, kódovaný *ica* lokusem [16], který napomáhá adhezi buněk k povrchu. Jádrem PIA tvoří poly β -1,6-N-acetylglukosamin (PNAG). Bylo zjištěno, že polymery podobné PIA vytváří i některé Gram-negativní bakterie [15]. Polysacharid alginát byl zkoumán jako důležitá složka EPS u mukoidní *Pseudomonas aeruginosa* [13]. U nemukoidních kmenů dochází k expresi *psl* operonu. Produkce polysacharidu Psl zvyšuje adhezi bakterií k povrchu a je udržována struktura biofilmu po přichycení [13]. V poslední době se pozornost obrací také k nukleovým kyselinám v EPS. e-DNA v biofilmech *Pseudomonas aeruginosa* je odvozena z genomové DNA [17]. Má s ní řadu podobností, ale i rozdílů. Allesen-Holm et al. [17] zaznamenali, že e-DNA v biofilmech *Pseudomonas aeruginosa* je organizovaná v různých strukturách. V raných biofilmech je e-DNA uspořádána jako síťovitá struktura na podkladu biofilmu, ve vyšší koncentraci na povrchu kolonie. Ve starších biofilmech se e-DNA vyskytuje na podkladu a na stopkovité části biofilmu, který vytváří útvar podobný houbě. Nejvyšší koncentrace e-DNA je zde mezi stopkou a „kloboukem“. V ještě pozdějších biofilmech je e-DNA lokalizována skrz celý útvar [17]. e-DNA má stabilizující roli v biofilmu a její

uvolnění je řízeno QS a regulováno železem [18]. Nízká koncentrace železa indukuje vývoj biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*, způsobí up-regulaci *pqs* genů (systém QS) a utváření e-DNA. Naproti tomu vysoká koncentrace železa potlačí vývoj biofilmu, způsobí down-regulaci *pqs* genů a tvorbu e-DNA [18].

EPS se také podílí na vzniku rezistence vůči různým antimikrobiálním činidlům. Matrix neinhibuje penetraci antibiotik do biofilmu, ale zpomaluje, a tím poskytuje čas pro indukci exprese genů rezistence [19]. Hostitelský organismus reaguje na přítomnost bakteriální infekce spuštěním obranných imunitních reakcí. Avšak bakterie na ně náležitě odpovídají. Biofilmy *Staphylococcus epidermidis* se brání proti fagocytóze polymorfními neutrofily (PMNs) pomocí intracelulárního adhesinu PIA [20]. PIA pravděpodobně odděluje bakterii a asociované protizánětlivé složky, vytváří mechanickou bariéru, tím blokuje efekty antibakteriálních peptidů a inhibuje PMN fagocytózu. Biofilmy *Pseudomonas aeruginosa* odolávají fagocytóze makrofágy aktivovanými interferonem- γ díky exopolysacharidu alginátu, který je obsažen v EPS [21]. Jensen et al. [22] ukázali, že *Pseudomonas aeruginosa* produkuje toxin rhamnolipid B, který zabíjí PMNs. Produkce toxinu je řízena pomocí QS.

2.5. Bakteriální biofilmy a povrchy

Patogeneze mnoha ortopedických infekcí je spojena s přítomností biofilmu mikroorganismů. Při chirurgickém zásahu do organismu se zvyšuje náchylnost k infekcím, pacient má aktivovaný imunitní systém. Implantované náhrady jako jsou srdeční chlopně, umělé cévy, kloubní náhrady nebo katetry jsou ideálním místem pro vznik bakteriální infekce. Některé druhy bakterií mají adhesiny [16], které ukotvují buňku k hostitelským extracelulárním proteinům jako je kolagen, fibrinogen, fibronectin nebo elastin. Tyto proteiny jsou adsorbované na povrchu biomateriálu a napomáhají tak bakteriím k vytvoření biofilmu [23]. Jednou z výhod, které poskytuje bakteriím biofilm, je zvýšená rezistence k antibiotikům [24]. Proto samotné vyčištění rány a následná léčba antibiotiky není vždy účinná. Implantát se tak většinou musí vyndat nebo vyměnit [23]. Většina infekcí spojených s implantáty (78%) je způsobena stafylokoky [23], z velké míry *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*. Zbytek tvoří například *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* a další (viz obr. 3).



Obr. 3 – Frekvence hlavních patogenních druhů z ortopedických izolátů infekcí asociovaných s implantáty [23].

Běžnými materiály, které se používají jako kostní implantáty, jsou nerezavějící ocel, titan nebo titanové slitiny, přičemž s ocelí jsou infekce asociovány častěji [25]. Jednou z možností, jak předcházet těmto infekcím, je modifikace povrchů implantátů, např. zjemňování povrchů [26]. Další možností je obalit materiály ionty dusíku, což ovlivní odpor a chemickou topografii povrchu [27]. Způsobem, jak omezit vazbu bakterií a tvorbu biofilmu, je použití proteinových obalů jako např. heparin nebo albumin, obalů založených na polyethylenglykolu (PEG) nebo kyselině hyaluronové [25]. Na léčbu bakteriálních infekcí se používají antibiotika. Proto je účinné přímé pokrytí implantátu tenkou vrstvou polymeru s antibiotikem. To je pomalu uvolňováno až k vysoké koncentraci. Byl studován vliv různých antibiotik – gentamycinu, ciprofloxacinu, vankomycinu a dalších [25]. Výhodné je také použití obalů uvolňujících kovy jako je měď či stříbro, případně použití stříbrného sulfadiazinu.

3. Biofilmy a rezistence k antibiotikům

3.1. Antibiotika

Antimikrobiální činidlo je přírodní nebo syntetická chemická látka, která zabíjí nebo inhibuje růst mikroorganismů. Látky, které bakterie zabíjí, jsou baktericidní, ty, které blokují růst, jsou označovány jako bakteriostatické. Bakteriostatická činidla často inhibují syntézu proteinů a vážou se na ribozomy. Baktericidní látky zabíjí buňku, ale nezpůsobují její lýzu. Mezi důležitá a často používaná antibiotika patří penicilin ze skupiny β -laktamových antibiotik. Obsahuje β -laktamový kruh a inhibuje syntézu buněčné stěny. Váže se na transpeptidázu, která katalyzuje zesíťování dvou peptidových řetězců v buněčné stěně, a tím narušuje její funkci. Buněčná stěna je pak slabá. Mezi antibiotika, která inhibují syntézu proteinů, patří například tetracyklin, streptomycin, kanamycin, erytromycin nebo chloramfenikol. Polymyxiny působí na plazmatickou membránu, ciprofloxacin náleží mezi quinolony a interaguje s DNA gyrázou.

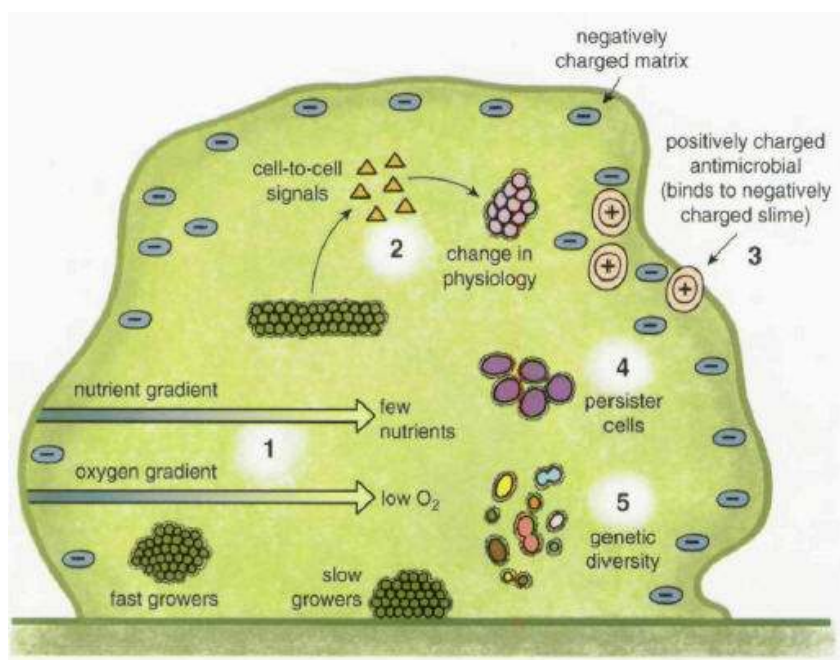
3.2. Mechanismy rezistence

Jeden z důvodů, proč bakterie vytváří biofilmy, je nesporně jejich zvýšená rezistence k antibiotikům. Bakterie, která nemá rezistenci geneticky podloženou, může snížit vnímavost k antibiotikům tím, že vytvoří biofilm [24]. Stewart a Costerton také naznačovali, že rezistence bakterií v biofilmech není získaná mutací nebo mobilními genetickými elementy (transpozony atd.), protože když se buňka odloučí z biofilmu, stane se rychle citlivou k antibiotiku. Tuto skutečnost vyslovili také Levin a Rozen, kteří tvrdili, že bakterie vzdoruje antibiotiku tím, že změní svůj fenotyp a oddálí tak chvíli, kdy se antibiotikum stane účinným [28]. Tato nedědičná rezistence je výsledkem antimikrobiální terapie, kdy se bakterie postupně přizpůsobuje. Bakterie mění svůj fenotyp jako odpověď na podmínky prostředí a tato změna ovlivňuje jejich vnímavost k antibiotikům.

Bylo vysloveno několik hypotéz, jakými mechanismy se bakterie v biofilmu brání antibiotikům. Jednou z nich je omezené pronikání antimikrobiálních činidel do biofilmu [29]. Buňky v biofilmu jsou obklopené v extrapolymerární matrix, která zpomaluje difúzi látek. Matrix je negativně nabitá a vážou tak pozitivně nabitá antibiotika. Poskytuje biofilmu rezistenci k velkým molekulám jako je lysozym nebo molekuly komplementu [29]. Anderl et al. [30] testovali penetraci ampicilinu u biofilmu *Klebsiella pneumoniae*.

Ukázalo se, že antibiotikum není schopno pronikat do biofilmu a že bakterie produkují degradující enzym β -laktamázu. U mutant bez β -laktamázy došlo k penetraci antibiotika, ale buňky nebyly kupodivu zcela usmrceny. Je tedy možné usoudit, že k rezistenci bakterií k antibiotikům přispívají i jiné mechanismy. Byl zkoumán také rozdíl v penetraci peroxidu vodíku u slabého a silného biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*. Zjistilo se, že u slabého biofilmu je průnik látky pozorován ihned, zatímco u silného je penetrace výrazně zpomalována [3]. Když se ale použije silný biofilm tvořený mutantou *P. aeruginosa* defektní v genu pro katalázu *katA*, která neutralizuje peroxid vodíku, činidlo penetruje [31].

Jedním z dalších možných mechanismů rezistence je pomalý růst [3]. Antibiotika jsou všeobecně účinnější v zabíjení rychle rostoucích buněk. Například penicilin nebo ampicilin nezabijí nerostoucí buňky vůbec. Bakterie na povrchu biofilmu mají větší přístup k živinám a kyslíku oproti těm ve středu biofilmu, které tím pádem rostou pomaleji a tudíž jsou více rezistentní k antibiotikům [10].

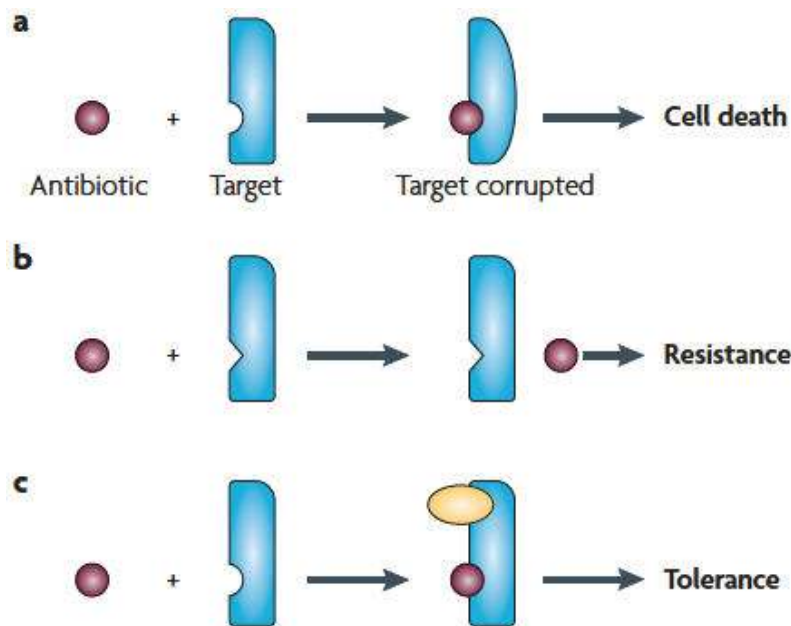


Obr. 4 – Tolerance k antibiotikům u biofilmů je podmíněna několika faktory [10]. Bakterie ve středu kolonie rostou velmi pomalu, protože jsou vystaveny nízké koncentraci kyslíku a živin (1). Díky intracelulárním signálům se může změnit fyziologie biofilmu, buňky spouští molekulární pumpy, které čerpají antibiotikum z buňky a kolonie roste i za působení této látky (2). Matrix je negativně nabitá a váže pozitivně nabitá antimikrobiální činidla (3). Speciální populace perzistentních buněk (4) neroste v přítomnosti antibiotika, ale ani nevymře. Když je látka odstraněna, perzistentní buňky opět rostou a vytvoří kolonii. Populační, genetická a fyziologická diverzita (5) zvyšuje šanci, že některé buňky v biofilmu přežijí.

V důsledku gradientu živin, odpadních látek a signálních faktorů roste každá buňka biofilmu rozdílnou rychlostí a dochází tak k různorodosti biofilmu. V závislosti na těchto gradientech dokáže buňka změnit svou fyziologickou aktivitu a reagovat tak na působení antibiotika [3, 32]. Bakterie se dokáží aktivně bránit i adaptací na stres. Mohou zapnout geny reagující na stres a změnit svůj fenotyp na více tolerantní k pozměněným podmínkám [32]. Regulátorem stresové odpovědi je σ -faktor RpoS u Gram-negativních bakterií, který je indukován vysokou koncentrací buněk [3], která v biofilmu je. Kontroluje syntézu genů trehalózy a genů stresové odpovědi. Exprese *rpoS* genu je pozitivně regulována množstvím guanosin tetrafosfátu (ppGpp; guanosine tetraphosphate) [33]. Dalšími regulátory jsou QS nebo polyfosfátkináza (PPK; polyphosphate kinase) [32]. Inaktivace *ppk* genu u *Pseudomonas aeruginosa* způsobí neschopnost tvorby silného a rozlišeného biofilmu a ovlivní i QS. Tato inaktivace vede k selhání exprese *rpoS* genů [34]. Sigma faktory jsou klíčovými prvky v odpovědi na stres. Například bakterie s chybějícím σ -faktorem E má zvýšenou vnímavost k oxidativnímu stresu během stacionární fáze [35].

3.3. Bakteriální perzistence

Když vystavíme populaci bakterií působení antibakteriálního činidla, většina buněk je usmrcena. Pokud se po čase antibiotikum odstraní, v populaci zůstává malá frakce buněk, která přežívá [36]. Tyto buňky nemají geneticky podmíněnou rezistenci k antibiotiku. Jev se nazývá bakteriální perzistence a je možné ho pozorovat i u bakteriálních biofilmů. Perzistentní buňky v biofilmu jsou k antibiotiku tolerantní, tzn. že jejich schopnost přežití nesouvisí s expresí nebo použitím mechanismů rezistence [37]. Tolerance funguje na principu blokace cílového místa antibiotika jinou molekulou. Tím pádem antibiotikum nepůsobí na metabolismus buňky a ta je pak tolerantní (viz obr. 5). Antibiotikum se může do cílového místa navázat, ale neovlivňuje jeho funkci. Perzistentní buňky jsou ve stavu dormance – mají zpomalený metabolismus a nedělí se [37]. Když se sníží koncentrace antibiotika, buňky vytvoří novou populaci biofilmu. Zdá se, že tento mechanismus je jednou z hlavních příčin vzniku chronických infekcí a návratů infekcí po léčbě antibiotiky.



Obr. 5 – Rezistence versus tolerance k antibiotikům [37]. a) Antibiotikum (fialová) se naváže do cílového místa (modrá) a způsobí smrt buňky. b) Cílové místo pro antibiotikum je pozměněno, činidlo se tak nenaváže a buňka se stává rezistentní. c) Jiná molekula (žlutá) inhibuje cílové místo, navázání antibiotika ho tak neovlivní a buňka je tolerantní k jeho působení.

Profil genové exprese perzistentních buněk obsahuje toxin-antitoxin (TA) moduly a jiné geny, které blokují důležité buněčné funkce, jako je translace [38]. Mezi tyto proteiny patří například RMF proteiny, které inhibují translaci nebo UmuDC proteiny, které inhibují replikaci. Keren et al. [38] identifikovali v izolovaných perzistentních buňkách asi 300 genů, které byly hodně exprimované. Toxin tvoří neaktivní komplex s antitoxinem, kde toxin je trvanlivý, zatímco antitoxin je degradovatelný. Antitoxin funguje jako represor TA modulu [39], takže pokud klesne hladina antitoxinu, dojde k indukci transkripce. Homology TA modulů byly nalezeny na plasmidech [39]. Exprese HipA, toxinu *hipBA* TA modulu, vede ke zvýšení tolerance, zatímco delece *hipBA* vede k rychlému snížení množství perzistentních buněk jak ve stacionární fázi planktonních buněk, tak v biofilmu [38]. Keren et al. shrnuli [38], že HipA je první ověřený gen perzistence. Dalším z genů, který je více exprimován v perzistentních buňkách, je gen pro glycerol-3-fosfát dehydrogenázu (*glpD*; glycerol-3-phosphate dehydrogenase) [40]. Kmeny se zvýšenou expresí tohoto proteinu se ukázaly jako tolerantní k ampicilinu a ofloxacinu, zatímco kmen s deletovaným *glpD* měl sníženou úroveň perzistence ve stacionární fázi. Glycerol-3-fosfát acetyltransferáza (PlsB) je esenciální protein perzistentních buněk, který je možným cílem pro terapii [40].

3.4. Možnosti odstranění biofilmů

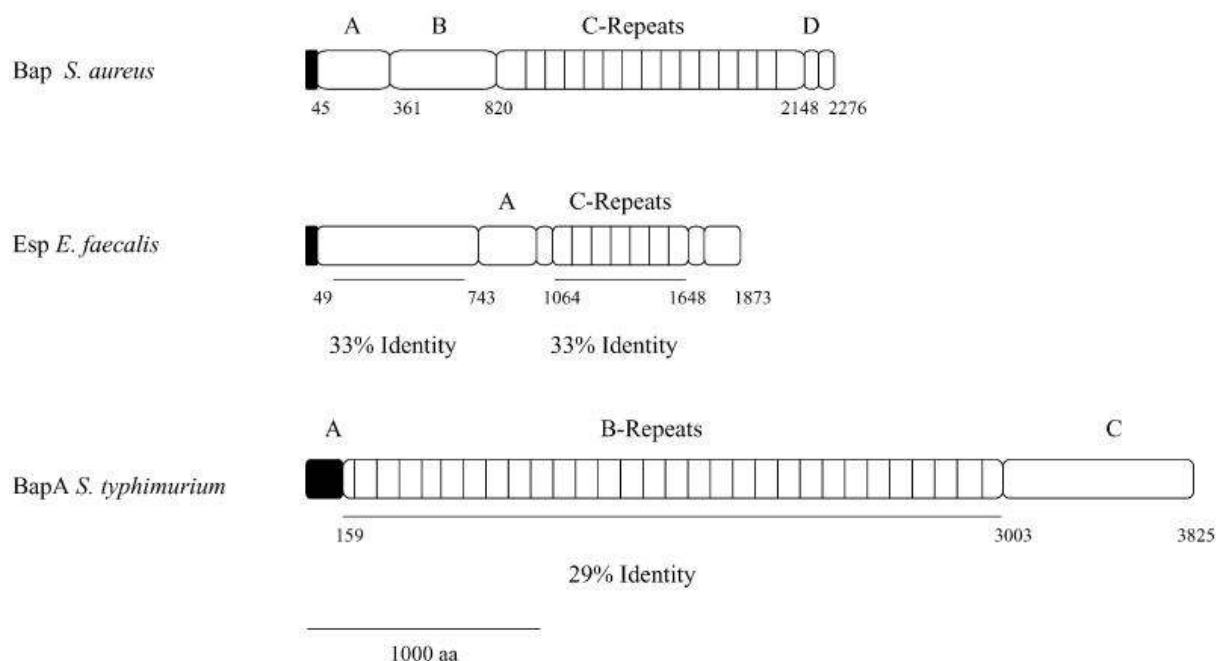
Jelikož je rezistence biofilmů založena na mnoha faktorech, je těžké je zcela odstranit. Většina antibiotik je účinná proti rostoucím buňkám. Bakterie v biofilmu jsou ale velmi heterogenní. Jedním z možných řešení je zvýšit efektivitu existujících antibiotik na základě toho, že mnoho genů buněk biofilmu a jejich produktů bylo již charakterizováno. Jednou z velkých výhod biofilmu je mnohobuněčnost a ochrana díky EPS. V případě jejího rozrušení by buňky biofilmu byly více přístupné antibiotikům nebo hostitelským obranným mechanismům. Možnosti prevence infekcí na implantátech byly komentovány výše. Způsobem, jak se zbavit perzistentních buněk, by mohlo být například opětovné vystavení biofilmu antibiotiku po velmi krátké době. Během této doby by přeživší buňky začaly růst a ztratily by tak svůj perzistentní fenotyp. Další dávka antibiotika by je tak zlikvidovala [29]. Jiným možným a účinným způsobem by mohl být vývoj specifických látek, které by přímo interagovaly se složkami sebedestrukční dráhy biofilmu [29]. Obecně vzato, k odstranění biofilmů by tak mohlo vést použití kombinace různých léčebných postupů.

4. Biofilmy a bakteriální povrchové proteiny

4.1. Bap

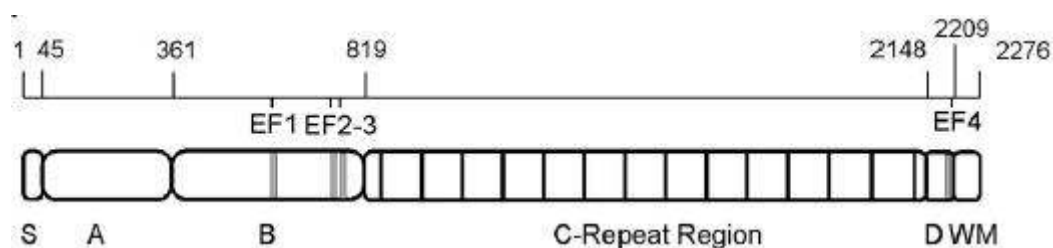
Hlavní roli ve vývoji bakteriálního společenství biofilmu hraje skupina povrchových proteinů. První člen této skupiny byl popsán u *Staphylococcus aureus* v izolátu z hovězí mastitidy a byl nazván jako Bap (biofilm-associated protein) [41]. Tento protein se účastní primární a intercelulární adheze. Později byly u řady Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií popsány povrchové proteiny k němu homologní. Analýza primární sekvence Bap ukázala strukturální podobnost k proteinům ukotveným k buněčné stěně u Gram-pozitivních bakterií. N-koncová signální sekvence pro extracelulární sekreci (prvních 44 aminokyselin) je následována dvěma krátkými repeticemi o 32 aminokyselinách, které jsou odděleny 26 AK. Tato repetitivní oblast se označuje jako oblast A (AK 45-360). Zbývající část N-koncové domény (AK 361-818) je označována jako oblast B [41]. Centrální oblast proteinu Bap je vymezena aminokyselinami 819-2147, začíná oblastí označovanou jako „spacer“ (AK 819-947) a je následována 13 repeticemi o 86 aminokyselinách (C-repetice). Tato středová oblast tvoří 52% Bap [41]. Přestože funkce této oblasti ještě nebyla objasněna, je usuzováno, že může hrát strukturální roli a udržovat správnou konformaci proteinu na povrchu buňky. Zdá se, že snížený počet repetic neovlivní funkčnost proteinu, ani schopnost tvorby

biofilmu [42]. C-koncová oblast proteinu zahrnuje oblast D a LPXTG motiv [41]. Oblast D (AK 2148-2208) se skládá ze tří repetice o 18 AK a je zakončena neúplnou repeticí (pouze 7 AK). LPXTG kotví protein v buněčné stěně. Na úplném konci je série několika pozitivně nabitých zbytků [43].



Obr. 6 – Strukturní analýza Bap u *Staphylococcus aureus* a jeho homologů [43].

Při analýze primární sekvence proteinu se ukázalo, že obsahuje místa s vysokou podobností k EF motivům, která vážou ionty Ca^{2+} [44]. Na obr. 7 ze studie Arrizubiety et al. [44] jsou znázorněné pozice možných míst vazajících Ca^{2+} pojmenovaných jako EF1-EF4. Tři z nich jsou umístěna na N-konci v oblasti C, čtvrté na C-konci blízko LPXTG motivu.



Obr. 7 – EF domény na proteinu Bap [44].

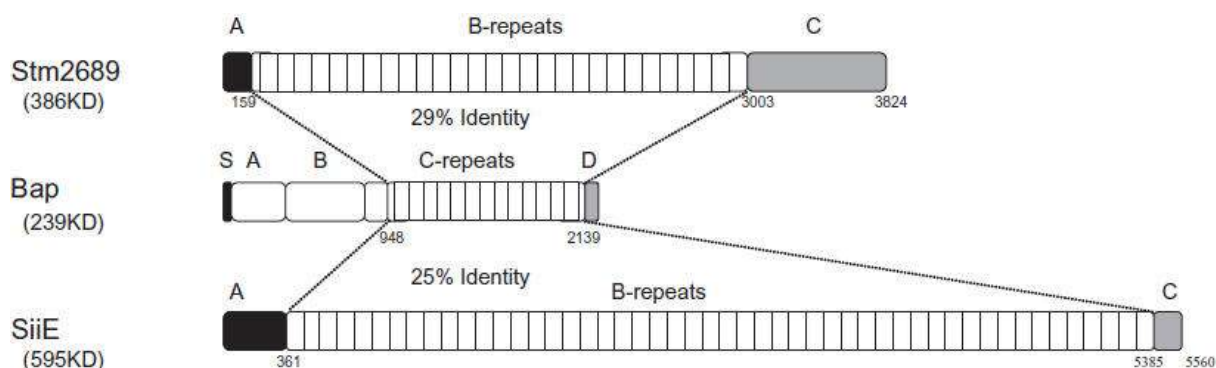
Ionty vápníku fungují jako regulátory aktivity Bap. Bylo zjištěno [44], že přidání milimolárního množství Ca^{2+} do média blokuje intercelulární adhezi a vytváření biofilmu.

Navázání vápníku způsobí konformační změnu, která ovlivní schopnost tvorby biofilmu. Regulátorem genové exprese proteinu Bap je aktivátor SarA [45]. Mutace v genu *sarA* naruší Bap-závislý vývoj biofilmu a dochází k poklesu množství proteinu na povrchu buněk. SarA interaguje buď přímo s promotorem genu, nebo se váže na *agr* promotor a stimuluje transkripci. V případě proteinu Bap se SarA váže do promotorové oblasti, takže nepřítomnost *agr* nijak expresi Bap neovlivní. Sekvenční analýza ukázala značnou podobnost *bap* genů různých druhů *Staphylococcus*, z čehož se dá předpokládat horizontální genový přenos mezi nimi [46]. *Bap* gen je nesen na částici podobné transpozonu, vložené do místa označovaného jako „pathogenicity island“ SaPIbov2, který je přenosný bez přítomnosti pomocného fága [43]. Patogenní ostrovy jsou obecně oblasti, které kódují virulentní faktory na prokaryotickém genomu. Pohyblivost SaPIbov2 závisí na aktivitě proteinu Sip, což je funkční rekombináza z rodiny integráz [47].

4.2. Homology Bap

4.2.1. BapA

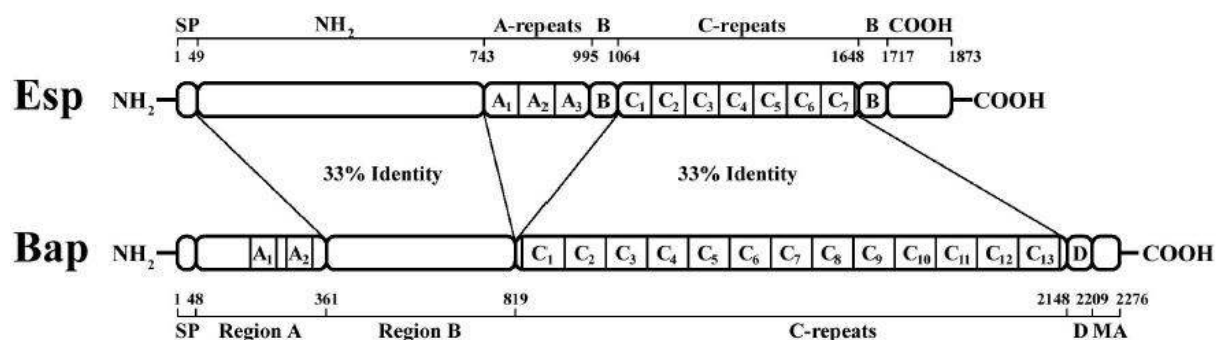
Při hledání proteinů majících vliv na vytváření biofilmu byly objeveny také homology proteinu Bap u jiných druhů bakterií. Jedním z nich je protein BapA, který byl nalezen u bakterie *Salmonella enterica* serovar Enteritidis [48], patogenní bakterie způsobující gastroenteritidu. BapA je velký povrchový protein potřebný k vytvoření biofilmu této bakterie. Latasa et al. [48] využili k hledání homologu Bap programu TBLASTN. Tato analýza odhalila dva čtecí rámce kódující proteiny s výraznou podobností s Bap (viz obr. 8). První z nich je *stm2689*, 11474 bp dlouhý gen, který kóduje 386 kDa velký protein. Porovnáním byla zjištěna homologie C oblasti Bap a oblasti B u *Stm2689*. Každá repetice C oblasti Bap genu ukazuje 29% shodu s repeticí v této oblasti. Druhý čtecí rámec, *stm4261*, je 16680 bp dlouhý a kóduje největší protein genomu *S. typhimurium* (595 kDa). Později byl protein určený jako kolonizační faktor a přejmenován na SiiE [49]. Repetice ukazují 25% shodu. Další složkou, která je nezbytná pro vývoj biofilmu u *Salmonella*, je celulóza [50], jejíž produkce je podporována regulátorem CsgD přes transkripci *adrA* [48]. Transkripce genu *bapA* je regulovaná buď přímo CsgD, anebo může CsgD stimulovat přepis *bapA* nepřímo přes aktivaci regulačního genu. Protein BapA je tedy nezbytný pro vývoj biofilmu, ale ne dostačující.



Obr. 8 – Strukturní analýza *Stm2689* a *SiiE* a shodnost s *Bap S. aureus* [48].

4.2.2. Esp

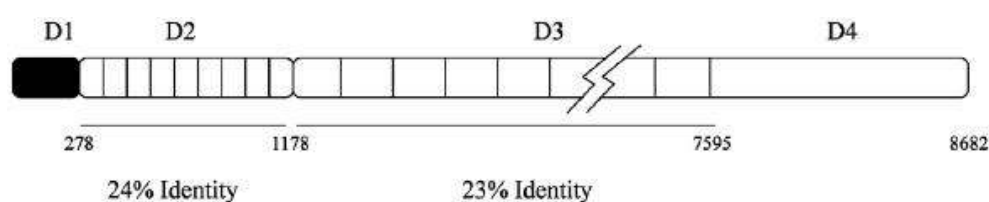
Protein Esp (enterococcal surface protein) je povrchový protein bakterie *Enterococcus faecalis* [51]. Až 93,5% Esp-pozitivních izolátů *E. faecalis* bylo schopno tvořit biofilm, zatímco kmeny deficientní v tomto genu nebyly producenty biofilmu [51]. Inserční mutace v *esp* neprokázala podstatný efekt na vývoj biofilmu u kmene, který tvoří biofilm nejvíce. Může to být způsobeno povrchovými adhesinami, které mohou zprostředkovat prvotní vazbu na povrch, když je *esp* nefunkční. Na druhé straně žádný z *esp*-deficientních kmenů nebyl schopný biofilm vytvářet, z čehož lze usoudit, že přítomnost adhesinů a *esp* je geneticky spojená [51]. Esp je protein obsahující 1873 aminokyselin a má 202 kDa. Byla nalezena 33% sekvenční shoda a 50% podobnost proteinu Esp a *Bap S. aureus*. N-koncová doména proteinu *Bap* (oblast B, AK 361-819) vykazuje 33% shodu s 694 aminokyselinami N-koncové domény Esp [51]. Oblast C repetice *Bap* vykazuje 33% shodu s oblastí C repetice proteinu Esp (viz obr. 9). N-koncová doména Esp se pravděpodobně účastní interakce s tkání hostitele a centrální repetitivní oblast slouží ke stažení proteinu z povrchu a jeho ukrytí před imunitním systémem hostitele [51].



Obr. 9 – Strukturní podobnost mezi *Esp* a *Bap* [51].

4.2.3. LapA

LapA (large associated protein) je protein vyskytující se u nepatogenních bakterií jako je *Pseudomonas putida* KT2440, *Ps. fluorescens* PfO1 nebo *Ps. fluorescens* WCS365 a u kmenů tvořících biofilm je zodpovědný za jeho vznik [52]. Bakterie s mutacemi v tomto proteinu nejsou schopny prvotních kroků vývoje biofilmu, adheze a vytvoření plně vyvinutého biofilmu. LapA je jeden z největších bakteriálních proteinů a má molekulovou hmotnost 888 kDa [52]. Gen *lapA* je 26 kb dlouhý a kóduje 8682 aminokyselin. V genu lze rozeznat čtyři domény, z nichž dvě jsou tvořeny dlouhými repeticemi [52]. Doména 1 tvoří prvních 277 AK a obsahuje N-koncovou signální sekvenci. Oblast vykazuje 29% podobnost s RTX toxinem rybího patogenu *Aeromonas salmonicida* [52]. Doména 2 (AK 278-1178) obsahuje devět repetic o 100 aminokyselinách a byla nalezena 24% podobnost s C-repeticemi Bap *Staph. aureus* [52, 9]. Doména 3, která následuje po 18 AK od domény 2, je také repetitivní oblastí. Obsahuje 29 neúplných repetic o 218-225 aminokyselinách. U této domény byla nalezena sekvenční podobnost s adhesinem CshA Gram-pozitivní bakterie *Streptococcus gordonii*, která má 13 repetic o 100 AK [52, 53], a 23% podobnost s C-repeticemi Bap [9]. Doména 4 (1087 AK) obsahuje několik motivů vázajících Ca^{2+} [52].

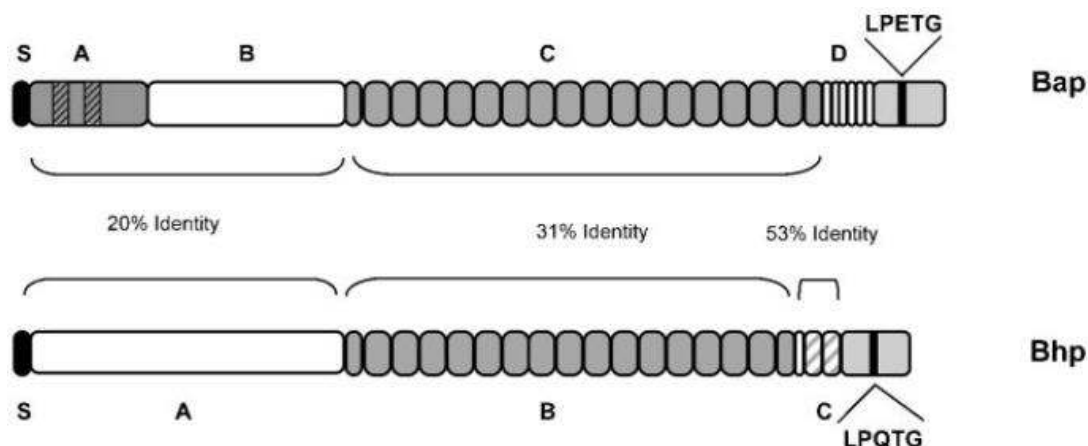


Obr. 10 – Struktura LapA a podobnost s Bap [9].

4.2.4. Bhp

Bhp (Bap homologue protein) je protein podobný Bap, který byl nalezen v genomu izolátu nejsilnějšího producenta biofilmu u lidí *Staphylococcus epidermidis* RP62A [46]. Analýza primární aminokyselinové sekvence odhalila přítomnost typické N-koncové signální sekvence pro extracelulární sekreci (43AK) u Gram-pozitivních bakterií a C-koncový úsek obsahující LPXTG motiv, hydrofobní membránovou doménu a řadu pozitivně nabitých zbytků typických pro proteiny ukotvené v membráně G-pozitivních bakterií. N-konec Bhp (AK 46-760) vykazuje 20% shodu a 35% podobnost s Bap *S. epidermidis*. Centrální část (AK 761-2056) obsahuje repetice o 89 aminokyselinách (B-repetice). Tato oblast tvoří 54% proteinu. B-repetice jsou z 31% shodné a z 44% podobné C-oblasti Bap proteinu. C-koncová oblast se skládá z C-oblasti a LPXTG motivu. C-oblast (AK 2077-2221) obsahuje

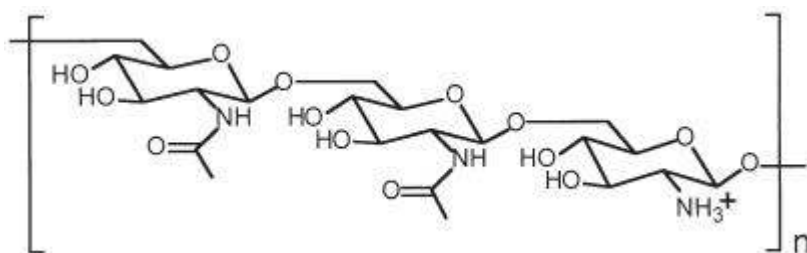
2 repetice po 59 aminokyselinách oddělené 27 AK. Tyto repetice jsou z 53% identické a z 65% podobné C-oblasti proteinu Bap [46]. Podle této značné podobnosti lze usoudit, že se Bhp pravděpodobně podílí na tvorbě biofilmu u *S. epidermidis*.



Obr. 11 – Strukturální podobnost Bhp a Bap [46].

4.3. *Ica* lokus a adhesin PIA/PNAG

Jednou z fází vývoje biofilmu je intercelulární adheze. Ta je zajištěna syntézou adhesinu PIA/PNAG, polymerem složeného z β -1,6-glukosaminoglykanů, který je zodpovědný za tvorbu biofilmu u *S. aureus* [54]. Tento exopolysacharid je syntetizován produktem *icaADBC* operonu [54]. *Ica* lokus byl identifikován i u *S. epidermidis*, kde jeho produkt zprostředkuje mezibuněčnou adhezi [55]. Delece *ica* lokusu u *S. aureus* způsobí neschopnost tvorby biofilmu a produkci PIA [54]. Vývoj biofilmu u této bakterie nicméně není závislý pouze na tomto polysacharidu, ale jak již bylo výše řečeno, prvotní vazbu a mezibuněčnou adhezi zprostředkuje také protein Bap. Inaktivace *ica* operonu u Bap-pozitivních kmenů nemá žádný vliv na vývoj biofilmu in vitro [42]. Z toho lze usoudit, že Bap může nahradit nedostatek PIA/PNAG. Bap je tedy schopný zprostředkovat tvorbu biofilmu cestou alternativní k mechanismu závislém na PIA/PNAG.



Obr. 12 – Struktura adhesinu PIA [16]. PIA je lineární homoglykan složený z β -1,6-N-acetylglukosaminových zbytků, přibližně 20% zbytků je deacetylovaných, tudíž pozitivně nabitých.

4.4. Proteiny vázající glukany

Glukan se zdá být hlavním faktorem, který přispívá ke schopnosti *Streptococcus mutans* přilnout k povrchu a agregovat se za účelem vytvoření biofilmu [56]. *Streptococcus mutans* je patogenní bakterie, která žije v dutině ústní člověka. Má schopnost adherovat na povrch zubu a podporuje tvorbu zubního kazu. *Streptococcus mutans* syntetizuje několik proteinů schopných vázat glukany [57]. Tyto proteiny lze rozdělit na glukosyltransferázy, enzymy katalyzující syntézu glukanu, a neglukosyltransferázové proteiny, které glukan pouze vážou (Gbps; glucan binding proteins). Lynch et al. [57] vytvořili soubor mutantů v různých glukan-vázajících proteinech (GbpA, GbpC a GbpD) a analyzovali vliv delece jednotlivých proteinů na vývoj biofilmu a jeho konečnou strukturu. Všechny biofilmy produkované mutanty se ztenčily, ale záleželo na tom, který Gbp byl deletován [57]. Ztráta GbpC, který je vázán k buněčné stěně bakterie, se ukázala být dominantní, došlo k výrazné redukci tloušťky biofilmu, protože ubylo biomasy. To lze přisoudit tomu, že GbpC funguje jako receptor pro glukan na buněčném povrchu a bakterie se tak bez něj hůře shlukují. U mutantů s deletovaným GbpA došlo ke zploštění biofilmu. Ztráta GbpD vedla k výrazné ztrátě biomasy [57]. Získané poznatky lze tedy shrnout tak, že každý glukan-vázající protein, ať už extracelulární GbpA či GbpD nebo na buněčnou stěnu uchycený GbpC, přispívá svým dílem na vývoj biofilmu a ovlivňuje výslednou strukturu.

5. Biofilmy u Mykobakterií

5.1. Mykobakterie

Rod *Mycobacterium* (mykobakterie) patří do kmene Actinobacteria a řadí se mezi aerobní a nesporulující bakterie. Mykobakterie jsou pleomorfní, vytvářejí větvené nebo filamentózní struktury, které jsou segmentované do tyčinek či koků. Právě mycelium netvoří. Tyto bakterie jsou silně acidorezistentní, tedy obtížně barvitelné organickými barvivy a odolné k odbarvení kyselinami. Díky tomu je nelze barvit podle Grama. Výhodou, kterou jim tato vlastnost přináší, je zvýšená rezistence k antibiotikům či odolnost proti vyschnutí. Acidorezistence je způsobena mykolovými kyselinami, které jsou součástí buněčné stěny mykobakterií. Mykolové kyseliny mykobakterií jsou α -větvené β -3-hydroxy mastné kyseliny [58] s dlouhým uhlíkatým řetězcem (60-90 uhlíků). Kovalentně se vážou přes arabinogalaktan k peptidoglykanové vrstvě [58] a povrch bakterie dělají hydrofobním a voskovým. Mykobakterie všeobecně, oproti jiným bakteriím, rostou velmi pomalu, přesto je

lze podle rychlosti růstu rozdělit na pomalu rostoucí (např. *M. tuberculosis*, *M. avium*) a rychle rostoucí (např. *M. smegmatis*). Řada z nich vytváří žluté karotenoidní pigmenty a podle této schopnosti je lze rozdělit na nepigmentované (pigmenty netvoří), fotochromogenní (pigmenty tvoří pouze na světle) a skotochromogenní (pigmenty tvoří i ve tmě). Řada zástupců tohoto rodu bakterií patří mezi významné patogeny [58].

5.2. Faktory mající vliv na utváření biofilmu

5.2.1. Glykopeptidolipidy

Ve vnější vrstvě buněčné stěny některých mykobakterií jsou přítomny glykopeptidolipidy (GPLs), které ovlivňují různé aspekty jejich života, ať už je to klouzavý pohyb, utváření biofilmu nebo morfologii kolonie [59]. Členové komplexu *M. avium* (MAC), který zahrnuje *M. avium* a *M. intracellulare*, jsou pomalu rostoucí bakterie, produkující vysoce antigenní serovar-specifické GPLs (ssGPLs) [59]. Oproti tomu *M. smegmatis* obsahuje pouze serovar-nespecifické GPLs (nsGPLs). ssGPLs i nsGPLs mají stejnou strukturu lipopeptidu, který obsahuje N-acetylovaný tripeptid-amino-alkohol (D-Phe-D-allo-Thr-D-Ala-L-alaninol), rozdíly tvoří modifikace (glykosylace, methylace, acetylace). *Mps* u *M. smegmatis* je gen, kódující enzym potřebný pro biosyntézu GPLs, konkrétně peptid syntetázu zodpovědnou za biosyntézu lipopeptidového jádra. Sonden et al. [60] uvádějí, že aktivita peptid syntetázy je kódovaná dvěma geny *mps1* a *mps2*. Dále popsali, že polyketid syntáza, důležitá pro tvorbu lipopeptidového jádra, je kódovaná genem *pks* a že gen *gap* je důležitý pro transport GPLs na povrch *M. smegmatis*. V případě ssGPLs *M. avium* byly identifikovány geny *pstA* a *pstB*, podobné *mps* *M. smegmatis* [61]. Bylo zjištěno [62], že glykopeptidolipidy *M. smegmatis* jsou důležité pro prvotní vazbu bakterie k povrchu při tvorbě biofilmu a pro její klouzavý pohyb. Recht et al. [62] navrhli model pro roli GPLs jak při klouzavém pohybu, tak při utváření biofilmu. V tomto modelu byly GPLs s dlouhými lipidovými ocásky vystaveny na povrchu, což ho dělalo hydrofobním a docházelo tak ke snížení tření mezi bakterií a hydrofilním povrchem. Mutanty defektní v GPLs měly povrch více hydrofilní, takže díky většímu tření byla snižena jejich pohyblivost. Recht et al. také popsali novou *atf1* mutantu, jejíž GPLs nebyly acetylovány a její povrch byl tak více hydrofilní. To mělo za následek horší schopnost klouzavého pohybu na hydrofilním povrchu a vazby k povrchu hydrofobnímu. Některé názory na vztah tvorby biofilmu a klouzavého pohybu se ale liší. Martín-de-Hijas et al. [68] odhalili produkci biofilmu u nepohyblivých

bakterií a kmeny, které využívaly klouzavého pohybu, ale nebyly schopné utvářet biofilm. I když mezi bakteriemi využívajícími klouzavý pohyb a bakteriemi tvořícími biofilm tedy není významný vztah, je možné, že je spojuje jiný společný faktor (pravděpodobně spojený s metabolismem lipidů nebo lipidovým složením buněčné stěny) [68].

5.2.2. Mykolové kyseliny

Bakterie, které přilnou k povrchu a začnou utvářet biofilm, syntetizují extracelulární matrix obsahující sekretované polysacharidy (exopolysacharidy). Biofilm vznikající na povrchu tekutého média je nazýván pelikula. Některé bakterie jsou schopné tvořit silný biofilm, aniž by při jeho vývoji produkovaly exopolysacharidy [63]. Mezi ně patří i mykobakterie. Jak již bylo řečeno výše, mykobakterie mají v buněčné stěně mykolové kyseliny, které vytvářejí jejich hydrofobní a vysoce rezistentní povrch. Ojha et al. [64] identifikovali novou skupinu mastných kyselin, které hrají důležitou roli v utváření výsledné struktury biofilmu *M. smegmatis*. Chaperonem, který je zapojen do biosyntézy těchto mastných kyselin, je protein GroEL1 rodiny Hsp60, jenž byl u mykobakterií nalezen. Tyto mastné kyseliny jsou kratší než klasické mykolové kyseliny (C₅₆ – C₆₈) a mohly by být právě jejich prekurzorem. Mutanty s chybějícím GroEL1 nebyly schopny vytvořit maturovaný biofilm a byly defektní v produkci mykolových kyselin. Defekt byl nejvíce zjevný během utváření biofilmu, kdy docházelo k nahromadění kratších mykolových kyselin. To naznačuje, že chaperon GroEL1 hraje specifickou regulační roli v syntéze mykolových kyselin s dlouhým řetězcem. GroEL1 je tedy potřebný pro maturaci biofilmu, ne pro vazbu k povrchu [64]. Jednou z možností, jak může tato zvýšená syntéza krátkých mykolových kyselin zprostředkovat hromadění bakterií a vývoj maturovaného biofilmu je skutečnost, že mohou být uvolňovány a tvořit tak hydrofobní extracelulární matrix [63].

5.2.3. Ostatní faktory

Fenotypová analýza mutant se sníženou schopností produkovat CO₂ nasvědčuje tomu, že dostupnost CO₂ hraje roli v utváření biofilmu u *M. tuberculosis* [65]. Například mutanta postrádající gen pro 2-oxoglutarát dehydrogenázu a vyžadující exogenní CO₂ pro růst na pevném médiu je defektní v tvorbě biofilmu. Naopak změny ve složení plynného prostředí (kromě nahromadění CO₂), jako je snížení tenze kyslíku nebo nárůst koncentrace organických těkavých molekul, stimulují vývoj biofilmu [65]. Železo hraje také jednu z hlavních rolí v utváření biofilmu *M. smegmatis* [66]. Snížení jeho množství vede ke zpomalení růstu

biofilmu, zatímco na planktonní buňky to vliv nemá. Stejně tak je tomu se zinkem [65]. Železo i zinek jsou důležité kofaktory enzymů vytváření CO₂ a syntézy mykologických kyselin. Oproti tomu Carter et al. [67] dokázali, že *M. avium* tvoří více stabilní biofilmy v přítomnosti Ca²⁺, Mg²⁺ a Zn²⁺, ale ne Fe²⁺. Glukóza a pepton jako zdroje uhlíku v médiu byly spojené se zvýšenou tvorbou biofilmu, zatímco huminové kyseliny s horším utvářením biofilmu.

6. Kultivace *Mycobacterium smegmatis* ve formě biofilmu a planktonické kultury

Obr. A: Pozorování planktonicky rostoucích bakterií *M. smegmatis*. Preparát jsem připravila z tekuté kultury *M. smegmatis*, která byla kultivována za třepání 24 hod. při 37 °C, 20 ml média 7H9 (Becton, Francie) s 0,05% tweenem a 2% glycerolem. Obarveno methylenovou modří, pozorováno v mikroskopu (Motic, Čína) ve fázovém kontrastu, zvětšení 1000x.

Obr. B: Stacionární kultura. Do malé Petriho misky jsem připravila 2 ml sterilních mikrokuliček o průměru 250-350 μm a převrstvila jsem je 13,5 ml média 7H9. Do média jsem opatrně po stěně zaočkovala 1 ml tekuté kultury *M. smegmatis* (OD=1,7), tak aby se příliš nepromíchala s kuličkami. Doba kultivace 3 dny v 37 °C. Mykobakterie vytvořily na povrchu média vrstvu biofilmu.

Obr. C: Kultivace *M. smegmatis* na skleněných mikrokuličkách. Do malé Petriho misky jsem připravila 10 ml sterilních skleněných mikrokuliček o průměru 250-350 μm. Převrstvila jsem je 3,5 ml tekuté kultury (OD=0,17) a kultivovala jsem je 6 dní ve vlhké komůrce při 37 °C. Mykobakterie vytvořily na povrchu kuliček viditelný biofilm. Obarveno methylenovou modří, pozorováno pod lupou, objektiv 3x.

Obr. D: Kultivace *M. smegmatis* na zirkoniových kuličkách. Do malé Petriho misky jsem připravila 10 ml sterilních zirkoniových mikrokuliček o průměru 500 μm. Převrstvila jsem je 3,5 ml tekuté kultury (OD=0,17) a kultivovala jsem je 6 dní ve vlhké komůrce při 37°C. Mykobakterie vytvořily na povrchu kuliček viditelný biofilm. Obarveno methylenovou modří, pozorováno pod lupou, objektiv 3x.



7. Závěr

Jak z mé práce vyplývá, mikrobiální biofilmy jsou v přírodě velmi rozšířené a dotýkají se nás všech a to hlavně prostřednictvím infekcí, které způsobují. Tato tematika je aktuální a v laboratořích jsou biofilmy zkoumané, ať už z hlediska jejich struktury, signalizace, genové výbavy, fenotypových projevů nebo v neposlední řadě rezistence k antibiotikům. Právě ta hraje klíčovou roli v jejich přežívání a odolnosti k léčbě.

Ve své práci jsem shrnula dnešní poznatky týkající se bakteriálních biofilmů, jejich vývoje, komunikace s prostředím, zmínila jsem se o způsobu, jakým se brání působení antibiotik, popsala jsem proteinovou výbavu bakterií v biofilmu. Závěrem jsem poukázala na biofilmy u mykobakterií, mikroorganismů s atypickou buněčnou stěnou a vlastnostmi výhodnými pro jejich odolnost. Mykobakterie způsobují široké spektrum lidských infekcí. Esteban et al. [69] uvedli, že dvě třetiny všech infekcí spojených s biofilmy způsobují nepigmentované rychle rostoucí mykobakterie (NPRGM; nonpigmented rapidly growing mycobacteria) tvořící biofilm.

Jednoduché kultivační pokusy, které jsem provedla, ukázaly schopnost bakterií *M. smegmatis* vytvářet biofilmy jak na hladině kultivačního média při stacionární kultivaci, tak i na povrchu mikrokuliček. Srovnání skleněných mikrokuliček s kuličkami ze zirkon oxidu ukázalo, že nárůst biofilmu na skleněných kuličkách, které mají hydrofilnější povrch než zirkoniové kuličky, je viditelně masivnější.

8. Seznam použité literatury

- [1] Aparna M., Sharma Pt.B.D., Yadav S. (2008) Biofilms: Microbes and disease. *Braz J Infect Dis* 12:526-530
- [2] Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2:95-108
- [3] Mah T-F. C., O'Toole G. A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9:34-39
- [4] Donlan R. M. (2002) Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8:881-889
- [5] Nadell C. D., Xavier J. B., Foster K. R. (2009) The sociobiology of biofilms. *Fems Microbiol Rev* 33:206-224
- [6] Nadell C. D., Xavier J. B., Levin S. A., Foster K. R. (2008) The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *Plos Biol* 6:171-179
- [7] Prigent-Combaret C., Vidal O., Dorel C., Lejeune P. (1999) Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:5993-6002
- [8] Lemon K. P., Earl A. M., Vlamakis H. C., Aguilar C., Kolter R. (2008) Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr Top Microbiol Immunol* 322:1-16
- [9] Lasa I., Penadés J. R. (2006) Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* 157:99-107
- [10] Harrison J. J., Turner R. J., Marques L. L. R., Ceri H. (2005) Biofilms. *Am Scientist* 93:508-515
- [11] Miller M. B., Bassler B. L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55:165-199

- [12] Engebrecht J., Silverman M. (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:4154-4158
- [13] Flemming H-C., Neu T. R., Wozniak D. J. (2007) The EPS matrix: „House of biofilm cells“. *J Bacteriol* 189:7945-7947
- [14] Pal A., Paul A. K. (2008) Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian J Microbiol* 48:49-64
- [15] Branda S. S., Vik A., Friedman L., Kolter R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13:20-26
- [16] Götz F. (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 43:1367-1378
- [17] Allesen-Holm M., Barken K. B., Yang L., Klausen M., Webb J. S., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T. (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 59:1114-1128
- [18] Yang L., Barken K. B., Skindersoe M. E., Christensen A. B., Givskov M., Tolker-Nielsen T. (2007) Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol* 153:1318-1328
- [19] Hall-Stoodley L., Stoodley P. (2009) Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 1-10
- [20] Vuong C., Voyich J. M., Fischer E. R., Braughton K. R., Whitney A. R., DeLeo F. R., Otto M. (2004) Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol* 6:269-275
- [21] Leid J. G., Willson C. J., Shirtliff M. E., Hassett D. J., Parsek M. R., Jeffers A. K. (2005) The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- γ -mediated macrophage killing. *J Immunol* 175:7512-7518

- [22] Jensen P. Ø., Bjarnsholt T., Phipps R., Rasmussen T. B., Calum H., Christoffersen L., Moser C., Williams P., Pressler T., Givskov M., Høiby M. (2007) Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol* 153:1329-1338
- [23] Campoccia D., Montanaro L., Areola C. R. (2006) The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* 27:2331-2339
- [24] Stewart P. S., Costerton J. W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358:135-138
- [25] Haras L. G., Richards R. G. (2006) Staphylococci and implant surfaces: a review. *Injury Int J Care Injured* 37:S3-S14
- [26] Lange R., Lüthen F., Beck U., Rychly J., Baumann A., Nebe B. (2002) Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. *Biomol Eng* 19:255-261
- [27] Koerner R. J., Butterworth L. A., Mayer I. V., Dasbach R., Busscher H. J. (2002) Bacterial adhesion to titanium-oxy-nitride (TiNOX) coatings with different resistivities: a novel approach for the development of biomaterials. *Biomaterials* 23:2835-2840
- [28] Levin B. R., Rozen D. E. (2006) Non-inherited antibiotic resistance. *Nature* 4:556-562
- [29] Lewis K. (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45:999-1007
- [30] Anderl J. N., Franklin M. J., Stewart P. S. (2000) Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1818-1824
- [31] Stewart P. S., Roe F., Rayner J., Elkins J. G., Lewandowski Z., Ochsner U. A., Hassett D. J. (2000) Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 66:836-838

- [32] Fux C. A., Costerton J. W., Stewart P. S., Stoodley P. (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 13:34-40
- [33] Boaretti M., del Mar Lleò M., Bonato B., Signoretto C., Canepari P. (2003) Involvement of *rpoS* in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state. *Environ Microbiol* 5:986-996
- [34] Rashid M. H., Rumbaugh K., Passador L., Davies D. G., Hamood A. M., Iglewski B. H., Kornberg A. (2000) Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9636-9641
- [35] Testerman T. L., Vazquez-Torres A., Xu Y., Jones-Carson J., Libby S. J., Fang F. C. (2002) The alternative sigma factor σ^E controls antioxidant defences required for *Salmonella* virulence and stationary-phase survival. *Mol Microbiol* 43:771-782
- [36] Balaban N. Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S. (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305:1622-1625
- [37] Lewis K. (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 5:48-56
- [38] Keren I., Shah D., Spoering A., Kaldalu N., Lewis K. (2004) Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186:8172-8180
- [39] Hayes F. (2003) Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 301:1496-1499
- [40] Spoering A. L., Vulić M., Lewis K. (2006) GlpD and PlsB participate in persister cell formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188:5136-5144
- [41] Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa Í., Penadés J. R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 183:2888-2896

- [42] Cucarella C., Tormo M. Á., Úbeda C., Trotonda M. P., Monzón M., Peris C., Amorena B., Lasa Í., Penadés J. R. (2004) Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 72:2177-2185
- [43] Latasa C., Solano C., Penadés J. R., Lasa I. (2006) Biofilm-associated proteins. *C. R. Biologies* 329:849-857
- [44] Arrizubieta M. J., Toledo-Arana A., Amorena B., Penadés J. R., Lasa I. (2004) Calcium inhibits bap-dependent multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 186:7490-7498
- [45] Trotonda M. P., Manna A. C., Cheung A. L., Lasa I., Penadés J. R. (2005) SarA positively controls bap-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 187:5790-5798
- [46] Tormo M. Á., Knecht E., Götz F., Lasa I., Penadés J. R. (2005) Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiol* 151:2465-2475
- [47] Úbeda C., Tormo M. Á., Cucarella C., Trotonda P., Foster T. J., Lasa Í., Penadés J. R. (2003) Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol* 49:193-210
- [48] Latasa C., Roux A., Toledo-Arana A., Ghigo J-M., Gamazo C., Penadés J. R., Lasa I. (2005) BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol* 58:1322-1339
- [49] Morgan E., Campbell J. D., Rowe S. C., Bispham J., Stevens M. P., Bowen A. J., Barrow P. A., Maskell D. J., Wallis T. S. (2004) Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 54:994-1010

- [50] Solano C., García B., Valle J., Berasain C., Ghigo J-M., Gamazo C., Lasa I. (2002) Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol* 43:793-808
- [51] Toledo-Arana A., Valle J., Solano C., Arrizubieta M. J., Cucarella C., Lamata M., Amorena B., Leiva J., Penadés J. R., Lasa I. (2001) The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 67:4538-4545
- [52] Hinsa S. M., Espinosa-Urgel M., Ramos J. L., O'Toole G. A. (2003) Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol* 49:905-918
- [53] McNab R., Jenkinson H. F., Loach D. M., Tannock G. W. (1994) Cell-surface-associated polypeptides CshA and CshB of high molecular mass are colonization determinants in the oral bacterium *Streptococcus gordonii*. *Mol Microbiol* 14:743-754
- [54] Cramton S. E., Gerke C., Schnell N. F., Nichols W. W., Götz F. (1999) The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 67:5427-5433
- [55] Heilmann C., Schweitzer O., Gerke C., Vannittanakom N., Mack D., Götz F. (1996) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* 20:1083-1091
- [56] Munro C. L., Michalek S. M., Macrina F. L. (1995) Sucrose-derived exopolymers have site-dependent roles in *Streptococcus mutans*-promoted dental decay. *Fems Microbiol Lett* 128:327-332
- [57] Lynch D. J., Fountain T. L., Mazurkiewicz J. E., Banas J. A. (2007) Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *Fems Microbiol Lett* 268:158-165
- [58] Martínek A., Torello S., Kolter R. (1999) Sliding motility in Mycobacteria. *J Bacteriol* 181:7331-7338

- [59] Schorey J. S., Sweet L. (2008) The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiol* 18:832-841
- [60] Sondén B., Kocíncová D., Deshayes C., Euphrasie D., Rhayat L., Laval F., Frehel C., Daffé M., Etienne G., Reyrat J.-M. (2005) Gap, a mycobacterial specific integral membrane protein, is required for glycolipid transport to the cell surface. *Mol Microbiol* 58:426-440
- [61] Freeman R., Geier H., Weigel K. M., Do J., Ford T. E., Cangelosi G. A. (2006) Roles for cell wall glycopeptidolipid in surface adherence and planktonic dispersal of *Mycobacterium avium*. *Appl Environ Microbiol* 72:7554-7558
- [62] Recht J., Kolter R. (2001) Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 183:5718-5724
- [63] Zambrano M. M., Kolter R. (2005) Mycobacterial biofilms: a greasy way to hold it together. *Cell* 123:762-764
- [64] Ojha A. K., Anand M., Bhatt A., Kremer L., Jacobs W. R., Hatfull G. F. (2005) GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell* 123:861-873
- [65] Ojha A. K., Baughn A. D., Sambandan D., Hsu T., Trivelli X., Guerardel Y., Alahari A., Kremer L., Jacobs W. R. Jr, Hatfull G. F. (2008) Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol* 69:164-174
- [66] Ojha A., Hatfull G. F. (2007) The role of iron in *Mycobacterium smegmatis* biofilm formation: the exochelin siderophore is essential in limiting iron conditions for biofilm formation but not for planktonic growth. *Mol Microbiol* 66:468-483
- [67] Carter G., Wu M., Drummond D. C., Bermudy L. E. (2003) Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *J Med Microbiol* 52:747-752

[68] Martín-de-Hijas N. Z., García-Almeida D., Ayala G., Fernández-Roblas R., Gadea I., Celdrán A., Gómez-Barrena E., Esteban J. (2009) Biofilm development by clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Infect* 15:931-936

[69] Esteban J., Martín-de-Hijas N. Z., Fernández A. I., Fernández-Roblas R., Gadea I., Madrid-Study-Group-of-Mycobacteria (2008) Epidemiology of infections due to non-pigmented rapidly growing mycobacteria diagnosed in an urban area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:951-957

