

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Václava Jarošová

Tvorba biofilmu u *Streptococcus pneumoniae*
Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Denisa Petráčková, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.5.2015

Podpis

Touto cestou bych ráda poděkovala RNDr. Denise Petráčkové, Ph.D. za ochotu, trpělivost a cenné připomínky při psaní této bakalářské práce.

Abstrakt

Biofilm je strukturované společenství buněk adherovaných k povrchu či k sobě navzájem a obklopených extracelulární matrix. Tvorba biofilmu probíhá v několika krocích od jednotlivých buněk adherovaných k povrchu až po mikrokolonie propojené kanály. Přítomnost biofilmu na zdravotnických materiálech a obtíže při léčení bakteriálních infekcí spojených s výskytem biofilmu jsou stále aktuálním problémem, kvůli zvýšené rezistenci těchto bakterií k antimikrobiálním látkám. V centru našeho zájmu je bakterie tvořící biofilm *Streptococcus pneumoniae*. Jedná se o podmíněně patogenní bakterii, která kolonizuje horní cesty dýchací a způsobuje řadu nemocí. Biofilmy tvořené bakterií *S. pneumoniae* vykazují zvýšenou rezistenci k antibiotikům, a proto jsou v posledních letech studovány alternativní antimikrobiální látky. Ke studiu biofilmu jsou používány kultivační systémy otevřené i uzavřené. K otevřeným patří „flow cell“ a biofilmové reaktory, mezi uzavřené řadíme „Calgary biofilm device“ a Christensenovu metodu v mikrotitračních destičkách.

Klíčová slova: biofilm, tvorba biofilmu, quorum sensing, průkaz biofilmu, rezistence bakterií v biofilmu, *Streptococcus pneumoniae*

Abstract

Biofilm is a structured community of cells adhered to the surface or to each other and surrounded by extracellular matrix. Biofilm is formed in several steps starting from single cells adhered to the surface up to microcolonies linked by channels. Because of a higher resistance to antibiotics the current hot topics in the biofilm research are formation of biofilms on medical materials and treatment of bacterial infections associated with biofilms. This work is focused on a biofilm forming bacteria *Streptococcus pneumoniae*. It is a potentially pathogenic bacterium which colonizes the upper respiratory tract and causes a number of diseases. Biofilms formed by *S. pneumoniae* exhibit increased resistance to antibiotics, therefore, alternative antimicrobial agents have been recently studied. For biofilm formation studies both open and closed systems are used. The flow cell and biofilm reactors represent commonly used open systems. Closed cultivation systems are for example a Calgary biofilm device and a micro titer plate-system developed by Christensen et al.

Keywords: biofilm, biofilm formation, quorum sensing, biofilm detection, bacteria resistance in biofilms, *Streptococcus pneumoniae*

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Biofilm u bakterií.....	2
2.1. Bakterie <i>Streptococcus pneumoniae</i>	3
2.2. Struktura biofilmu.....	4
2.3. Tvorba biofilmu.....	5
2.3.1. Tvorba biofilmu u patogenních organismů.....	7
2.3.2. Vliv růstu <i>S. pneumoniae</i> v biofilmu na patogenitu.....	7
2.4. Mechanizmy uplatňující se při vývoji biofilmu.....	8
2.4.1. Quorum sensing.....	8
2.4.1.1. Quorum sensing u gramnegativních bakterií.....	8
2.4.1.2. Quorum sensing u grampozitivních bakterií.....	9
2.4.1.3. Quorum sensing založený na AI-2.....	10
2.4.2. Regulace tvorby biofilmu u bakterie <i>S. pneumoniae</i>	10
3. Biofilm a antimikrobiální látky.....	11
3.1. Příčiny vyšší rezistence bakterií v biofilmu k antibiotikům.....	12
3.2. Rezistence k antimikrobiálním látkám bakterie <i>S. pneumoniae</i> rostoucí v biofilmu.....	14
4. Metody používané pro studium biofilmu.....	16
4.1. Obecné kultivační systémy.....	16
4.2. Diagnostické metody.....	18
4.3. Kultivační systémy pro studium biofilmu u bakterie <i>S. pneumoniae</i>	19
5. Závěr.....	20
6. Seznam literatury.....	22

1. Úvod

Bakterie se v přírodě vyskytují jako buňky planktonní nebo ve vícebuněčných formách jako jsou například kolonie a biofilmy. Biofilmy jsou strukturovaná společenství bakterií přisedlých k povrchu, rozhraní, či k sobě navzájem, a obklopených extracelulární polymerickou matrix. Život bakterií v biofilmu jim přináší řadu výhod, mezi nejvýznamnější patří zvýšená rezistence k antibiotikům a imunitnímu systému hostitele. V dnešní době si biofilmy zasluhují naši pozornost zejména kvůli obtížím při léčení infekcí, problémům v potravinářství a jejich přítomnosti na různých materiálech používaných ve zdravotnictví, například na implantátech, hadičkách nebo zubních náhradách. Současný výzkum bakteriálních biofilmů se převážně zabývá prevencí jejich tvorby, případně rozrušením a odstraněním již existujících biofilmů. Dále jsou zkoumány mechanismy řídící a ovlivňující tvorbu biofilmu.

Streptococcus pneumoniae je jedna z mnoha bakterií, u kterých byla pozorována tvorba biofilmu. Tato bakterie je významným lidským podmíněným patogenem způsobujícím například zápalu plic, záněty středního ucha a meningitidy. Světová zdravotnická organizace uvádí, že tato bakterie je příčinou až 1,6 milionu úmrtí ročně (World Health Organization 2007). Kvůli rezistenci biofilmu této bakterie k antibiotikům jsou v současné době studovány baktericidní účinky antimikrobiálních látek, jako jsou například analogy bakteriálních metabolitů, rostlinné extrakty či bakteriální a fágové hydrolázy.

Předmětem této práce je shrnout obecné poznatky o tvorbě bakteriálního biofilmu se zaměřením na bakterii *S. pneumoniae*, u které jsou představeny regulační mechanismy tvorby biofilmu, hypotézy vysvětlující zvýšenou rezistenci biofilmů k antibiotikům a účinky antimikrobiálních látek na biofilm *S. pneumoniae*. V práci je uveden i přehled metod používaných pro studium a detekci bakteriálního biofilmu.

2. Biofilm u bakterií

Biofilm představuje zcela specifické prostředí pro život buněk. V rámci tohoto společenství nalezneme buňky různého fyziologického stavu, v odlišné růstové fázi a dokonce s rozdílnými typy metabolismu od aerobních po anaerobní. Buňkám růst ve formě biofilmu přináší určité výhody oproti buňkám planktonním. Mezi hlavní výhody patří zvýšená rezistence k antibiotikům a imunitnímu systému hostitele, možnost růstu na široké škále povrchů, například na živých tkáních, zdravotnických pomůckách, v přírodních systémech, na trupech lodí i v potrubí.

K výzkumu biofilmů patrně nejvíce přispěl J.W. Costerton, který se dlouhodobě zabýval také problematikou formulování obecně přijímané definice. V článku z roku 1999 (Costerton *et al.* 1999) biofilm definoval jako „[...] strukturované společenství uzavřené v hydratované polymerické matrix, kterou tyto buňky vyprodukovaly, a přisedlé k inertnímu či abiotickému povrchu.“ Stejnou definici nalezneme i v řadě současných prací například (Gilbert *et al.* 2015). Sám Costerton původní definici dále rozpracoval. Nově biofilm vymezil jako „[...] mikrobiálně odvozenou přisedlou komunitu, charakterizovanou buňkami, které jsou nevratně přisedlé k substrátu nebo rozhraní nebo k sobě navzájem, jsou uloženy v extracelulární polymerické substanci, kterou tyto buňky samy vytvořily, a vykazují změněný fenotyp s ohledem na růstovou rychlost a genovou transkripci“ (Donlan and Costerton 2002). Tato definice však pravděpodobně nebere v úvahu disperzní stádium biofilmu, kdy dochází k uvolňování jednotlivých okrajových buněk či jejich shluků a jejich následnému šíření (Allison *et al.* 1990).

Jako první pozoroval biofilm Antonie van Leuwenhoek již v 17. století, když mikroskopoval stěr ze svých zubů. Novodobější vědecká pozorování tohoto jevu se však objevila až ve 30. letech 20. století, kdy byl pozorován vznik mikrokolonií na mikroskopických sklíčkách ponořených v mořské vodě (Zobell and Anderson 1936). V sedmdesátých letech bylo při zkoumání vodních ekosystémů zjištěno, že bakteriální populace rostoucí ve vodě ve formě biofilmu mají početní převahu nad populacemi bakterií, které zde žijí planktonně (Costerton *et al.* 1978). V pozdějších letech pak byly biofilmy studovány zejména kvůli jevům, které nebylo možné vysvětlit existencí planktonních buněk. Mezi tyto jevy patří například koroze kovů způsobená bakteriemi žijícími ve formě biofilmu (Bryant *et al.* 1991). Hlavním důvodem pro studium biofilmů v posledních desetiletích je jejich zvýšená odolnost vůči antibiotikům (García-Castillo *et al.* 2007). V současné době si

biofilmy stále zasluhují pozornost zejména kvůli jejich zvýšené odolnosti k antimikrobiálním látkám. Jak poukazují Demuyser a kolektiv (2014), v budoucnosti by se další výzkum biofilmů měl orientovat zejména na přesné pochopení mechanismů adheze a dalších interakcí, které jsou příčinou onemocnění a na studium terapeutických opatření bránících rozvoji polymikrobiálních biofilmů.

2.1. Bakterie *Streptococcus pneumoniae*

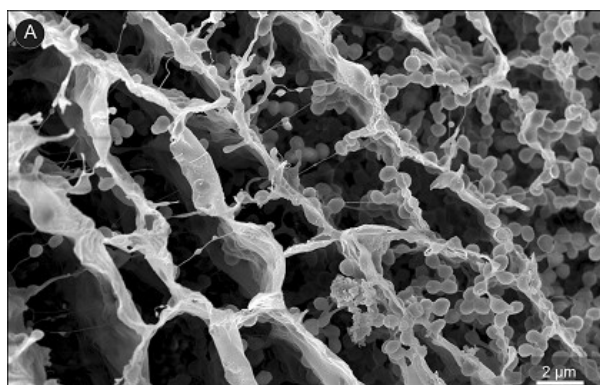
S. pneumoniae je nesporulující bakterie řadící se do rodu *Streptococcus*, který náleží do kmene Firmicutes. Dále lze tuto bakterii podle vztahu ke kyslíku zařadit mezi aerotolerantní anaeroby. Jedná se o grampozitivní bakterii, hlavní složkou její buněčné stěny tedy je peptidoglykan, teichoové kyseliny a lipoteichoové kyseliny. K těmto kyselinám je připojován cholin ve formě fosforylcholinu, který nekovalentně váže cholin vazebný protein. Tento protein je u *S. pneumoniae* jedním z faktorů virulence (Rosenow *et al.* 1997). V přírodě můžeme najít *S. pneumoniae* v opouzdřené i neopouzdřené formě. Doposud bylo popsáno více než 90 pneumokokových sérotypů, přičemž každý produkuje jiné polysacharidové pouzdro. Mezi poslední objevené sérotypy patří 20A, 20 B (Calix *et al.* 2012) a 6E (Ko *et al.* 2013)

S. pneumoniae je významný lidský podmíněný patogen kolonizující horní cesty dýchací. Existuje několik faktorů virulence pozorovaných u *S. pneumoniae*. Jedním z nich je pouzdro bránící aktivaci buněčného komplementu a fagocytóze bakterií (Hyams *et al.* 2010), dále hyaluronát lyáza rozkládající kyselinu hyaluronovou, která je součástí pojivové tkáně, což umožňuje rozšíření bakterie do okolních tkání (Berry *et al.* 1994). Důležitým faktorem virulence je toxin pneumolysin tvořící póry v membráně a způsobující buněčnou lyzi (Alouf and Geoffroy 1991 cit. dle Rubins *et al.* 1994). Neuraminidázy NanA a NanB jsou enzymy štěpící koncové sialové kyseliny z glykolypidů a glykoproteinů (Krivan *et al.* 1988). Dále se mezi faktory virulence řadí autolysin, který rozrušuje komponenty buněčné stěny, čímž způsobuje smrt buněk (Mosser and Tomasz 1970) a cholin vazebný protein, jehož funkcí je zprostředkování adheze bakterií ke tkáni během kolonizace (Rosenow *et al.* 1997). Posledním faktorem virulence bakterie *S. pneumoniae* je povrchový protein A bránící vazbě komplementu na její povrch (Ren *et al.* 2012).

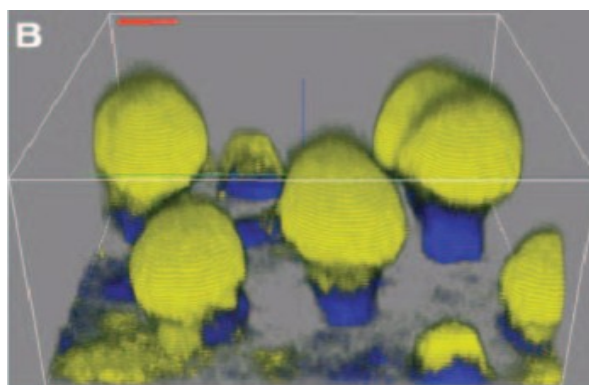
2.2. Struktura biofilmu

Biofilm má velice heterogenní strukturu, tvoří je bakteriální mikrokolonie, které jsou obklopené extracelulární polymerickou matrix (extracellular polymeric matrix – ECM) a propojené vodními kanály sloužícími k distribuci živin a kyslíku (Sandt *et al.* 2007b). Pozorováním biofilmů pomocí různých mikroskopických metod bylo zjištěno, že biofilmy obsahují pouze 16-32 % buněk, zatímco zbytek tvoří ECM (Lee *et al.* 2005).

Mikrokolonie jsou základní strukturální jednotkou biofilmu. Jedná se o jednodruhové či vícedruhové bakteriální shluky obklopené ECM, jejichž tvar a struktura jsou určeny podmínkami prostředí (Wolfaardt *et al.* 1994). Byly popsány dvě nejčastěji se vyskytující struktury biofilmu, a to „honey-like“ struktury (Obr. 1) a „mushroom-sharped“ struktury (Obr. 2). „Mushroom-sharped“ struktura je odvozena od tvaru houby skládající se z třeně a klobouku. Pomyslná třeň je tvořena nepohyblivými subpopulacemi buněk, klobouk představují pohyblivé subpopulace, které se na vrchol dostaly pohybem po nepohyblivých buňkách. Tato struktura byla pozorována u *Pseudomonas aeruginosa* (Klausen *et al.* 2003), *Candida albicans* (Douglas 2003) a *Caulobacter crescentus* (Entcheva-Dimitrov and Spormann 2004). Další struktury mají tvar šestiúhelníku připomínající včelí plástve. Tyto „honey-like“ struktury tvoří *Streptococcus epidermis* (Schaudinn *et al.* 2007) a *Listeria monocytogenes* (Pilchová *et al.* 2014). Moscoso a kolektiv (2006) pozorovali, že mikrokolonie bakterie *S. pneumoniae* vytvářejí v prostoru „honey-like“ struktury. Tyto struktury pravděpodobně zvyšují mechanickou stabilitu biofilmu (Schaudinn *et al.* 2007).



Obr. 1: „Honey-like“ struktura. Fotografie mikrokolonií bakterie *S. epidermis*, zobrazeno pomocí rastrovací elektronové mikroskopie. Vpravo dole je uvedeno měřítko. Převzato z Schaudinn *et al.* (2007).



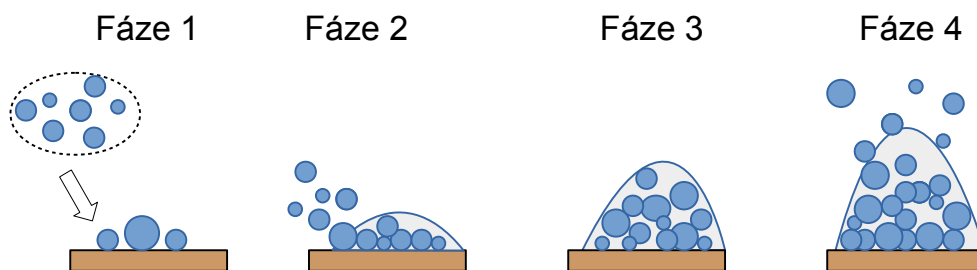
Obr. 2: „Mushroom-sharped“ struktura. Fotografie mikrokolonií bakterie *P. aeruginosa*, zobrazeno pomocí konfokální rastrovací elektronové mikroskopie. Červená čára představuje 20 μm. Převzato z Klausen *et al.* (2003)

ECM je hmota produkovaná buňkami biofilmu, které obklopuje a vyplňuje mezibuněčné prostory. Tato hmota definuje životní podmínky buněk biofilmu, a to svojí pórovitostí, obsahem vody, hydrofobicitou, sorpčními vlastnostmi a mechanickou stabilitou. Dále zajišťuje strukturální integritu, soudržnost a udržuje buňky v těsné blízkosti, čímž umožňuje intenzivní mezibuněčnou komunikaci a horizontální přenos genů. ECM se skládá z vody a biopolymerů zvaných extracelulární polymerická substance. Mezi tyto polymery patří polysacharidy, proteiny, nukleové kyseliny a lipidy (Platt 1985 cit. dle Westall *et al.* 2000).

Polysacharidy v ECM mají často jako substituenty acetylové skupiny, které zvyšují přilnavost, soudržnost a mechanickou stabilitu biofilmu (Tielen *et al.* 2005). Dále v ECM nalezneme proteiny. Ty se zde vyskytují jako enzymy štěpící složky ECM, což je důležité ze dvou důvodů. Za prvé tyto naštěpené složky mohou být použity jako zdroj uhlíku pro buňky biofilmu (Zhang and Bishop 2003) a za druhé tak dochází k uvolňování živých buněk z biofilmu, což umožňuje jejich šíření, které může vést k založení nového biofilmu na jiném místě (Ma *et al.* 2009). Stavební proteiny jsou důležité při tvorbě a stabilizaci ECM, dále umožňují vazby mezi povrchem buněk a extracelulární matrixovou substancí (Lynch *et al.* 2007). Extracelulární DNA také hraje roli při tvorbě biofilmu (Whitchurch *et al.* 2002) a při udržování jeho stability. Bylo zjištěno, že po odstranění extracelulární DNA vzrůstá citlivost k antibiotikům a dochází k rozrušování struktury biofilmu (Kaplan *et al.* 2012). Další složkou ECM jsou lipidy, které se zde nacházejí ve formě fosfolipidů, glykolipidů a lipopolysacharidů. Jejich hlavní funkcí je zvyšování hydrofobicity a přilnavosti buněk (Conrad *et al.* 2003).

2.3. Tvorba biofilmu

Tvorba biofilmu je dynamický proces, jehož počáteční fáze jsou iniciovány podmínkami prostředí, mezi které patří pH, koncentrace živin, koncentrace kyslíku a teplota. Tvorbu biofilmu můžeme rozdělit do několika fází (Obr. 3). První fází je počáteční adheze buněk k povrchu. Následuje fáze spojování buněk v jednovrstevný biofilm a fáze migrace a formování vícevrstevných mikrokolonií. Předposlední fází je stádium produkce ECM následované zráním biofilmu a utvářením trojrozměrné struktury (Lemon *et al.* 2008).



Obr. 3: Schéma tvorby bakteriálního biofilmu. Buňky ohraničené tečkovanou čarou představují buňky planktonní. Fáze 1 znázorňuje přilnutí k povrchu, fáze 2 tvorbu jedovrstevného biofilmu, fáze 3 existenci mikrokolonií a fáze 4 zralý biofilm a disperzi buněk. Zdroj: vlastní zpracování.

Prvotní adheze buněk k povrchu je vratná. Za podmínek indukujících tvorbu biofilmu u nepohyblivých buněk vzrůstá exprese adhezínů, které umožní vzájemnou vazbu těchto buněk či jejich vazbu k povrchu. U buněk pohyblivých dochází ke ztrátě pohyblivosti a počáteční produkci ECM, která drží tyto buňky pohromadě (Lemon *et al.* 2008). V další fázi se buňky dělí, komunikují chemickými signály a produkují větší množství ECM, která dodává biofilmu stabilitu. Jak bylo pozorováno například u biofilmu *P. aeruginosa*, během pozdních fází vývoje jsou uvolňovány buňky z okrajových částí biofilmu. (Sauer *et al.* 2002). Buňky uvolněné z biofilmu se mohou šířit se do okolí a zahájit tvorbu biofilmu na jiném místě.

Allegrucci a kolektiv (2006) pozorovali tvorbu biofilmu bakterie *S. pneumoniae* pomocí otevřeného systému „flow cell“. První den po inokulaci se na skleněném povrchu objevili adherovaní diplokoci a řetízky buněk. Během druhého dne docházelo k tvorbě buněčných shluků vysokých a širokých 20 μm , které se dále zvětšovaly v průběhu třetího dne. Výstupy z konfokální laserové skenovací elektronové mikroskopie dokládají, že šestý a devátý den vývoje biofilm obsahoval mikrokolonie (80 μm široké a 100 μm vysoké) propojené vodními kanály.

Yadav a kolektiv (2012a) pozorovali tvorbu biofilmu *S. pneumoniae* v mikrotitrační destičce. K tvorbě biofilmu došlo již 6 hodin po zaočkování, s maximálním růstem po 12-18 hodinách inkubace. Po této růstové fázi rychlost tvorby biofilmu poklesla. Buňky, které adherovaly k destičce, vytvořily biofilm o tloušťce 20-30 μm s výraznou trojrozměrnou prostorovou strukturou. V některých oblastech mikrokolonie měly nepravidelný a nesouvislý povrch, který obsahoval otvory různých velikostí představující kanály mezi mikrokoloniami.

2.3.1. Tvorba biofilmu u patogenních organismů

Na tvorbu biofilmu u patogenních organismů může být nahlíženo jako na strategii zajišťující jejich přežití. Bakterie žijící ve formě biofilmu vykazují sníženou citlivost k antibiotikům, jak bylo pozorováno již v roce 1985 (Nickel *et al.* 1985). Bakterie rostoucí v biofilmu způsobují více než 60 % lidských bakteriálních infekcí (Moscoso *et al.* 2006). Růst ve formě biofilmu byl pozorován například u bakterií způsobujících zánět středního ucha, oční infekce, zubní kaz, cystickou fibrózu a zánět močových cest (Sawhney and Berry 2009). Bakterie rostoucí v biofilmu jsou příčinou chronické fáze infekce, zatímco buňky z biofilmu uvolněné mohou způsobit akutní fázi infekce (Ohgaki 1994). U patogenních organismů rostoucích ve formě biofilmu jsou uvažovány tři mechanismy zvyšující pravděpodobnost vzniku onemocnění. Prvním mechanismem, který by mohl způsobit onemocnění, je uvolňování buněk z biofilmu (Allison *et al.* 1990). Druhý mechanismus je založen na tom, že prostředí biofilmu je heterogenní, čímž se zvyšuje pravděpodobnost přežití patogenu (Hammer and Bassler 2003). Třetí bere v úvahu hustotu buněk v biofilmu, kterou je ovlivněna signalizace „quorum sensing“ řídící i některé virulentní mechanismy (Zhu *et al.* 2002).

2.3.2. Vliv růstu *S. pneumoniae* v biofilmu na patogenitu

Pokud na tvorbu biofilmu nahlížíme jako na proces, zajišťující organismům zvýšenou odolnost k antibiotikům a částečný únik před imunitním systémem hostitele, lze se domnívat, že kmeny, které lépe tvoří biofilm, jsou i více virulentní. Tuto hypotézu testovali Lizcano a kolektiv (2010), kteří porovnávali schopnost tvořit biofilm u klinických izolátů *S. pneumoniae* z jedinců s invazivním pneumokokovým onemocněním a ze zdravých jedinců. Podle testované hypotézy by nejlepší tvůrci biofilmu měli způsobovat invazivní onemocnění. Tato hypotéza však výsledkům experimentu neodpovídá. Bylo zjištěno, že schopnost tvořit biofilm nesouvisí se vznikem invazivního onemocnění. K podobnému překvapivému zjištění došli i Sanchez a kolektiv (2011) při porovnávání schopnosti planktonních buněk a buněk rostoucích v biofilmu *S. pneumoniae* vyvolat invazivní onemocnění u myší. Část myší v experimentu byla infikována intranazálně nebo intratracheálně planktonními buňkami, další část buňkami planktonními odvozenými z biofilmu a poslední část biofilmem. Podle jejich výsledků se planktonní buňky rychle šířily po zvířecím organismu, měly větší potenciál způsobovat onemocnění a také daleko častěji způsobovaly smrt. Zatímco nejmenší počet onemocnění a úmrtí byl pozorován u myší infikovaných biofilmem. Podle výsledků tohoto

pokusu se soudí, že ke změnám souvisejícím s růstem bakterií v biofilmu dochází zejména proto, aby se usnadnila dlouhodobá kolonizace nosohltanu, nikoliv kvůli zvýšení virulence či invazivity onemocnění.

2.4. Mechanizmy uplatňující se při vývoji biofilmu

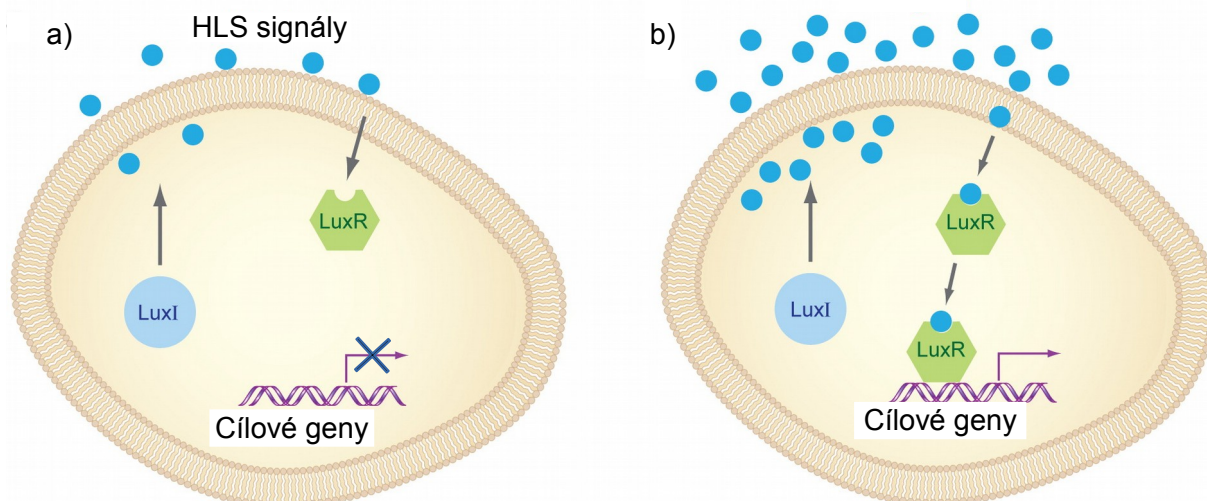
Existuje mnoho mechanismů uplatňujících se v regulaci vývoje biofilmu. Tento vývoj může být ovlivněn signálními drahami, přítomností buněčných povrchových struktur, tvorbou toxinů či zvýšenou koncentrací signálních molekul uvnitř buněk. Tvorbu biofilmu však ovlivňují i vnější podmínky prostředí, jako je teplota, přítomnost antimikrobiální látky a přítomnost metabolitů produkovaných případným hostitelem. Bakterie tvorbu biofilmu regulují na úrovni autoinduktorů, přičemž byly pozorovány 3 mechanismy QS systému (viz níže). Další signální molekulou zapojenou v regulaci tvorby biofilmu je cyklický diguanylát (c-diGMP), jehož koncentrační hladina v buňce je u bakterie *P. aeruginosa* ovlivňována *wsp* signální dráhou (Hickman *et al.* 2005). Teplotní regulace tvorby biofilmu byla pozorována u bakterie *Vibrio cholerae*, u které se při nižších teplotách zvýšila koncentrace c-diGMP a také se zvýšila tvorba biofilmu (Townsend and Yildiz 2015). Mezi další faktory ovlivňující tvorbu biofilmu můžeme zařadit přítomnost bakteriálního pouzdra (Moscato *et al.* 2006) či struktur sloužících k pohybu na povrchu bakterií (Zhou *et al.* 2014). Dále byl také zjištěno, že tvorbu biofilmu ovlivňuje i výskyt jiných druhů bakterií v prostředí (Park *et al.* 2014).

2.4.1. Quorum sensing

Quorum sensing (QS) je mechanismus mezibuněčné komunikace bakterií sloužící ke koordinaci genové exprese v závislosti na hustotě bakteriální populace. Tento systém ovlivňuje tvorbu a strukturu biofilmu (Davies *et al.* 1998), bioluminiscenci (Meighen 1991), sporulaci (Veening *et al.* 2005), produkci toxinů (Davies *et al.* 1998) a konjugaci (L. Zhang *et al.* 1993). Během tohoto procesu bakterie produkují malé difuzní molekuly, autoinduktory. Tyto molekuly se akumulují ve vnějším prostředí se zvyšující se hustotou populace buněk. Po dosažení určité koncentrace jsou bakterie schopné autoinduktory detekovat a v důsledku jejich přítomnosti dochází ke změně exprese řady genů a ke změně chování bakteriální populace. Gramnegativní bakterie používají jako autoinduktory homoserin-laktony, zatímco grampozitivní bakterie ke stejnému účelu používají peptidy. U obou skupin bakterií byl objeven další systém sloužící pro mezidruhovou komunikaci.

2.4.1.1. Quorum sensing u gramnegativních bakterií

U gramnegativních bakterií QS funguje na principu LuxI-LuxR systému (Obr. 4). Transkripcí genu *LuxI* dochází k syntéze acetylovaného homoserin-laktonu, který slouží jako autoinduktor. Existují geny homologní ke genu *LuxI*, jejichž expresí vznikají různě dlouhé či jinak substituované homoserin-laktony. Bylo zjištěno, že homoserin-laktony s kratším postranním řetězcem volně difundují membránou. Difuze homoserin-laktonů s delším postranním řetězcem je podpořena funkcí MexAB-OprM pump (Pearson *et al.* 1999). V prahové koncentraci se homoserin-laktony váží na své receptory, vzniklé expresí *LuxR* genu. Takto vzniklý komplex aktivuje transkripci řady genů včetně transkripce genu syntázy autoinduktoru (Engebrecht and Silverman 1984). Davies a kolektiv (1998) pozorovali tvorbu biofilmu u divokého kmene *P. aeruginosa* a kmene mutantního v QS genech. Zatímco divoký kmen tvořil strukturované biofilmy s mikrokoloniemi a vodními kanály, kmen mutantní tvořil tenké jednotvárné biofilmy bez trojrozměrných struktur a mikrokolonií. Dále bylo zjištěno, že tento systém má vliv na tvorbu biofilmu u *Yersinia pestis*, kdy byla pozorována snížená tvorba biofilmu u QS mutant (Bobrov *et al.* 2007). LuxI-LuxR systém je považován za obecný model QS u gramnegativních bakterií, protože byly pozorovány další homologní systémy například u *Agrobacterium tumefaciens* (Piper *et al.* 1993) a *Erwinia carotovora* (Pirhonen *et al.* 1993). Bakterie mohou využívat i více systémů homologních k LuxI-LuxR. Například u bakterie *P. aeruginosa* byly objeveny dva homologní systémy RhII-RhIR (Ochsner and Reiser 1995) a LasI-LasR (Pearson *et al.* 1994).



Obr. 4: Schématické znázornění QS systému u gramnegativních bakterií. U obrázku a) nedochází k aktivaci exprese cílových genů, zatímco u obrázku b) je již tato exprese aktivována v důsledku zvýšené koncentrace autoinduktorů vně buňky. Autoinduktory jsou znázorněny modře. Převzato a upraveno podle Jayaraman a Wood (2008).

2.4.1.2. Quorum sensing u grampozitivních bakterií

Jako autoinduktor u grampozitivních bakterií slouží peptidy neschopné spontánně difundovat buněčnou membránou. Vně buněk jsou tyto peptidy transportovány pomocí ABC přenašečů. K detekci autoinduktorů zde slouží dvoukomponentový systém sestávající ze sensorové proteinkinázy a regulačního proteinu. Interakce autoinduktoru s proteinkinázou aktivuje kaskádu fosforylačních procesů v poslední fázi zakončených fosforylací regulačního proteinu, který aktivuje transkripci QS regulovaných genů (Pestova *et al.* 1996). Tento systém (Obr. 5) byl popsán u *S. pneumoniae* (Alloing *et al.* 1998) a *Bacillus subtilis* (Magnuson *et al.* 1994).

2.4.1.3. Quorum sensing založený na AI-2

Dále existuje QS systém používaný gramnegativními i grampozitivními bakteriemi. Jedná se tedy o způsob komunikace, který může sloužit jak k vnitrodruhové, tak mezidruhové komunikaci. Gen *LuxS* je zodpovědný za syntézu autoinduktoru AI-2 (Surette *et al.* 1999), detekovaného pomocí periplazmatického AI-2 vazebného proteinu LuxP (Bassler *et al.* 1994), který po vazbě AI-2 spouští kaskádu fosforylačních reakcí vedoucích k aktivaci transkripce *LuxS* genu. Tento signální mechanismus byl mimo jiné pozorován u *Salmonella typhimurium* (Taga *et al.* 2001), *Helicobacter pylori* (Joyce *et al.* 2000) a *Bacillus anthracis* (Jones and Blaser 2003). Bylo zjištěno, že tento systém ovlivňuje tvorbu a zrání biofilmu u bakterie *Eikenella corrodens* a také životaschopnost bakterií v něm rostoucích (Karim *et al.* 2013).

2.4.2. Regulace tvorby biofilmu u bakterie *S. pneumoniae*

Tvorba biofilmu u *S. pneumoniae* je ovlivněna dvěma systémy QS. Prvním systémem je QS založený na AI-2. Studie (Vidal *et al.* 2011) porovnává časnou fázi tvorby biofilmu u kmene D39 a u kmene mutantního v genu *LuxS*. Zatímco u divokého kmene byly buněčné shluky pozorovány již po dvou hodinách experimentu a v průběhu experimentu se stále zvětšovaly, u kmene mutantního biomasa biofilmu vytvořeného po osmi hodinách odpovídala biomase biofilmu vytvořené divokým kmenem za méně než 4 hodiny. Struktura biofilmů tvořených divokým kmenem byla vysoce organizovaná, bakterie vytvářely kompaktní vrstvy a agregáty. U kmene mutantního byly pozorovány malé shluky buněk neschopné se vyvinout ve zralý biofilm. V pozdější studii bylo prokázáno, že tento systém ovlivňuje tvorbu biofilmu jak na abiotických površích, tak i na lidských buňkách (Vidal *et al.* 2013).

Druhý QS systém ovlivňující tvorbu biofilmu u bakterie *S. pneumoniae* se nazývá ComABCDE dráha (Vidal *et al.* 2013). Tato dráha je regulována peptidem stimulujícím kompetenci, který vzniká jako produkt genu *comC*. Vně buněk je přenášen ComAB

transportérem závislým na ATP (Hui and Morrison 1991). Následně dochází k jeho akumulaci ve vnějším prostředí a detekci pomocí membránově vázané receptorové histidinové kinázy comD (Håvarstein *et al.* 1996 cit. dle Håvarstein *et al.* 1997). Vidal a kolektiv (2013) pro svůj experiment vyvinuli bioreaktor s živými kulturami lidských plicních buněk. Ve svém experimentu porovnávali tvorbu biofilmu na abiotickém povrchu a tkáňových kulturách u divokého kmene a kmene s deletovaným genem *comC*. Bylo zjištěno, že se ComABCDE dráha podílí na řízení časné tvorby biofilmu *S. pneumoniae* na lidských buňkách, zatímco na neživých površích tato regulace pozorována nebyla. Rozdíl mezi divokým kmenem a mutantem s deletovaným genem *comC* však nebyl pozorován během počáteční adheze *S. pneumoniae* k buňkám, ale projevil se až při snížení přírůstku biomasy biofilmu v následujících hodinách.

Kromě QS systémů ovlivňují tvorbu biofilmu i další faktory. Jedním z těchto faktorů je toxin bakterie *S. pneumoniae*, pneumolysin, který podle nedávné studie (Shak *et al.* 2013) hraje roli během počáteční tvorby biofilmu. Bylo pozorováno, že mutanty s deletovaným genem pro pneumolysin tvoří méně biomasy biofilmu než divoké kmeny. Pneumolysin byl lokalizován na povrchu buněk a v ECM, což naznačuje jeho roli během fáze agregace buněk.

Dále bylo zjištěno, že na tvorbu biofilmu má vliv i přítomnost polysacharidů pouzdra či pouzdro samotné. *S. pneumoniae* se řadí mezi druhy bakterií s velkým počtem různých typů pouzder. Většina testovaných pouzder inhibovala tvorbu biofilmu až o 60 %, výjimkou bylo pouzdro sérotypu 6B, které tvorbu biofilmu inhibovalo jen o 30 % (Moscoso *et al.* 2006).

Dále byl také zkoumán vliv prostředí *in vivo* na tvorbu biofilmu *S. pneumoniae*. Sandrini a kolektiv (2014) pozorovali vliv lidského stresového hormonu, noradrenalinu, na tvorbu biofilmu. Bylo zaznamenáno, že biofilmy rostoucí v médiu s noradrenalinem a biofilmy kontrolní mají odlišnou morfologii. U buněk rostoucích v médiu s noradrenalinem bylo pozorováno zvýšené shlukování bakterií, které představuje důležitou fázi tvorby biofilmu. Po třech dnech po inokulaci bakterií do média bylo měřeno množství adherentních buněk, které bylo v porovnání s kontrolními vzorky vyšší u bakterií vystavených noradrenalinu. K odlišným závěrům však došli Marks a kolektiv (2013), když pozorovali, že pod vlivem noradrenalinu dochází k uvolňování buněk biofilmu do supernatantu. Sandrini a kolektiv (2014) se snaží tyto rozpory ve výsledcích vysvětlit využíváním rozdílných metodologických postupů. Také nevylučují možnost, že funkce noradrenalinu se v průběhu vývoje biofilmu mění. V počátečních fázích vývoje může noradrenalin tvorbu biofilmu podporovat, zatímco v pozdějších fázích vývoje může napomáhat buněčné disperzi.

3. Biofilm a antimikrobiální látky

Jak bylo uvedeno výše, mezi hlavní výhody růstu buněk v biofilmu patří jejich zvýšená odolnost k antimikrobiálním látkám. V některých případech byla dokonce pozorována až tisíckrát vyšší odolnost k antibiotikům u buněk biofilmu oproti buňkám planktonním (Ceri *et al.* 1999). Antibiotika potlačují infekci tím, že zabíjí planktonní bakterie, ale nedokáží vymýtit buňky rostoucí ve formě biofilmu. Po vymýcení planktonních buněk dochází k jejich dalšímu uvolňování z okrajových částí biofilmu a návratu akutní infekce (Costerton *et al.* 1999).

3.1. Příčiny vyšší rezistence bakterií v biofilmu k antibiotikům

Existuje několik různých hypotéz vysvětlujících příčiny vyšší odolnosti biofilmu k antibiotikům. V následujícím textu budou představeny hypotézy vysvětlující rezistenci biofilmů pomocí existence ECM, heterogenity biofilmů, tvorby perzistentů, změny fenotypu jako reakce na stres a mechanismu zvaného „eflux“ (Obr. 5).

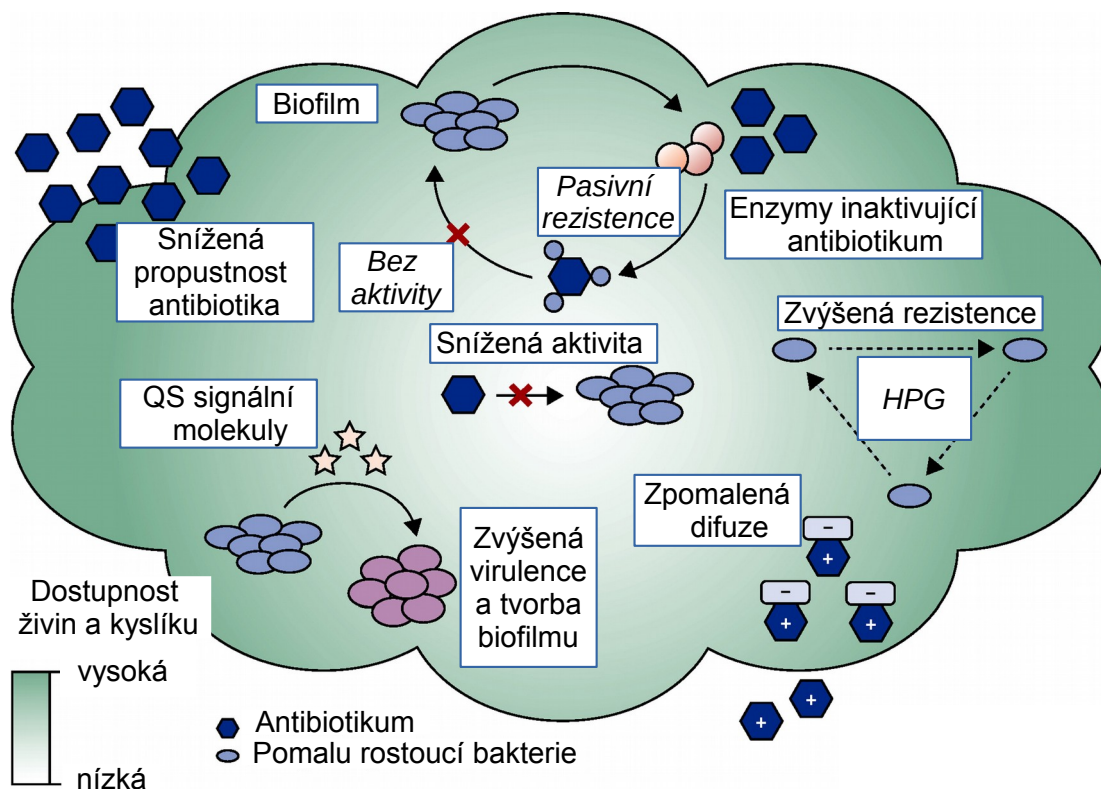
První z hypotéz se snaží zvýšenou rezistenci k antibiotikům vysvětlit tím, že ECM zpomaluje, nebo inhibuje vstup antibiotika do biofilmu. Existuje několik faktorů omezujících průchod antimikrobiální látky biofilmem, například velikost antibiotika (Thurnheer *et al.* 2003), hydrofobní (Sandt *et al.* 2007a) a elektrostatické (Ganeshnarayan *et al.* 2009) interakce mezi antibiotikem a složkami ECM a neutralizace antimikrobiální látky ve vnějších vrstvách ECM (Stewart *et al.* 2000). Úspěšnost inhibice záleží na druhu bakteriálního kmene a typu antibiotika. Například ampicilin, patřící mezi beta-laktamová antibiotika, může pronikat do biofilmu tvořeného bakteriemi β -laktamázy-negativního kmene *Klebsiella pneumoniae*, není však schopný proniknout do biofilmu tvořeného bakteriemi β -laktamázy-pozitivního kmene. Dále bylo zjištěno, že se liší schopnost jednotlivých druhů antibiotik penetrovat do biofilmu. Odlišnosti ve schopnosti penetrace biofilmu byly pozorovány u ampicilinu a ciprofloxacinu (Anderl *et al.* 2000).

Druhá hypotéza vysvětlující rezistenci k antibiotikům vychází z poznatků o různorodosti biofilmu. K buňkám uvnitř biofilmu se dostává méně živin než k buňkám na jeho povrchu, a proto buňky uvnitř biofilmu rostou pomaleji nebo téměř vůbec. Tyto pomalu rostoucí či nerostoucí buňky se následně stávají rezistentní vůči antibiotikům, která působí pouze na rostoucí buňky, například antibiotika beta-laktamová (Tuomanen *et al.* 1986).

Dále může být vyšší rezistence k antibiotikům vysvětlena pomocí fenoménu perzistence, kdy malá část mikroorganismů v biofilmu tvoří unikátní a vysoce odolná fenotypová stadia. Tyto odolné buňky jsou nazývány perzistenty a při působení antibiotik jako jediné přežívají, zatímco zbytek bakteriální populace je usmrcen (Brooun *et al.* 2000). Tento jev nelze vysvětlit jako geneticky podmíněný, protože perzistenti jsou geneticky shodní s buňkami, které byly zabity antibiotikem (Keren *et al.* 2004). Nabízí se tedy několik jiných vysvětlení odolnosti perzistentů. Jedním z nich je výše popsaná hypotéza, podle které se jedná o buňky se zpomaleným či téměř zastaveným růstem, takže na ně některá antibiotika nepůsobí. Odlišný názor vychází z poznatků, že antibiotika sice působí na různé buněčné cíle, ale buňky jsou v konečné fázi zabíjeny hlavně proto, že vlivem antibiotik dochází ke stimulaci nadměrné tvorby reaktivních kyslíkových radikálů spouštějících apoptotickou dráhu (Kohanski *et al.* 2007). U perzistentů tedy nedochází ke zvýšené tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů, které by mohly aktivovat apoptotickou dráhu, a proto tyto buňky přežívají (Kim *et al.* 2011).

Další vysvětlení bere v úvahu to, že pokud se bakterie nachází v prostředí nevhodném pro jejich růst, dochází k aktivaci stresových genů a změně fenotypu buněk na více rezistentní. Tento jev je pozorován jak u buněk planktonních, tak u buněk biofilmu. Mezi stimulatory aktivace stresových genů patří nedostatek živin, teplota, pH a v neposlední řadě také hustota buněčné populace. Právě poslední faktor bývá u biofilmů značně zvýšený a může alespoň částečně vysvětlit vyšší odolnost biofilmů k vnějším stresorům a antibiotikům (Brown and Gauthier 1993).

Posledním způsobem, jak se bakterie snaží bránit negativním účinkům antibiotik, je jejich aktivní odčerpávání z buněk pomocí „efluxních“ pump. Jak bylo prokázáno u bakterie *P. aeruginosa*, některé z těchto pump jsou více exprimovány u buněk biofilmu než u buněk planktonních, což může být příčinou jejich zvýšené rezistence k antibiotikům (Zhang and Mah 2008).



Obr. 5: Schématický obrázek znázorňující mechanismy zapojené v rezistenci k antibiotikům. Pod obrázkem je legenda, vysvětlující symboly použité v obrázku. Zkratka HPG označuje horizontální přenos genů. Převzato a upraveno podle Sherrard *et al.* (2014).

3.2. Rezistence k antimikrobiálním látkám bakterie *S. pneumoniae* rostoucí v biofilmu

Na konci minulého století byla hodnocena účinnost β -laktamových antibiotik u kmene *S. pneumoniae* citlivého k penicilinu. V citlivosti buněk planktonních a buněk biofilmu však po působení benzylpenicilinu, ampicilinu, co-amoxiclavu a cefuroximu nebyl pozorován žádný rozdíl (Budhani and Struthers 1997).

Del Prado a kolektiv (2010) pozorovali účinnost antibiotik (amoxicilin, erythromycin a levofloxacin) na buňky rostoucí v biofilmu a na buňky planktonní. U všech těchto antibiotik byla pozorována vyšší citlivost buněk planktonních. Zvýšená rezistence k antibiotikům byla také zjištěna u pacientů s cystickou fibrózou, kdy bakterie *S. pneumoniae*, izolované z bronchiálních sekretů pacientů a tvořící biofilmy, vykazovaly sníženou citlivost k penicilinu, tetracyklinu a rifampicinu (García-Castillo *et al.* 2007).

Vandeveldel a kolektiv (2014) zkoumali vliv antibiotik (amoxicilin, clarithromycin, solithromycin, levofloxacin a moxifloxacin) na biofilmy *S. pneumoniae* v různém stádiu zralosti. Pozorovali účinky antibiotik na biofilmy po 2 a 11 dnech vývoje. Pro studium tohoto

vlivu byly použity dva modely – biofilmy primární a indukované. Jako primární jsou označeny takové biofilmy, které vznikly z čerstvě vypěstovaných buněk. Indukované biofilmy jsou takové, pro jejichž vznik byly použity bakterie sebrané ze supernatantu biofilmů primárních. Všechna antibiotik byla nejúčinnější při působení na dvoudenní primární biofilmy, kdy nejvyšší ztrátu životaschopnosti způsobil moxifloxacin. Dále byl vliv těchto antibiotik zkoumán u biofilmu *S. pneumoniae* v závislosti na přítomnosti pouzdra. Účinnost antibiotik se mezi kmeny s pouzdrém a bez pouzdra příliš nelišila, s výjimkou solithromycinu a clarithomycinu, které byly účinnější proti dvoudennímu primárnímu biofilmu produkovanému opouzdrěným kmenem.

Dále byl sledován vliv bakteriálních a fágových hydroláz na již vytvořený biofilm *S. pneumoniae*. Z testovaných hydroláz měl největší účinek na odstranění biofilmu autolysin LytA, který způsobil rozpad 80 % biofilmu. Vysokou účinnost v rozrušování biofilmu prokázaly také bakteriofágové lysozymy Cpl-7, které způsobil rozpad 70 % biofilmu a Cpl-1 způsobující rozklad 50 % biofilmu (Domenech *et al.* 2011).

Další studie se zabývala vlivem extraktu z ostružiníku středomořského, nazvaného 220D-F2, na biofilm *S. pneumoniae*. Bylo zjištěno, že pokud se zaočkují planktonní bakterie zároveň s touto látkou, dojde k inhibici tvorby biofilmu v závislosti na množství přidaného 220D-F2. Dále bylo pozorováno, že tento extrakt snižuje populace buněk již vytvořeného biofilmu (Talekar *et al.* 2014). Již dříve byl vyloučen toxický efekt této látky na savčí buňky (Quave *et al.* 2012). Další látkou, která velmi účinně ničí biofilmy bakterie *S. pneumoniae*, je caragenin CSA-13. Jedná se o malou, kladně nabitou synteticky produkovanou molekulu, jejíž kostru tvoří kyselina cholová (Moscoso *et al.* 2014).

Yadav a kolektiv (2012b) zkoumali účinky 5-azacytidinu na tvorbu biofilmu bakterie *S. pneumoniae*. V nízkých koncentracích u planktonních buněk nepozorovali žádný účinek na buněčný růst a ve vyšších koncentracích byl buněčný růst částečně inhibován. Následně byl pozorován pokles tvorby biofilmu při koncentraci 5-azacytidinu, která nebyla inhibující pro růst buněk planktonních. Po přidání 5-azacytidinu k již vytvořeným biofilmům nebyl zřetelný žádný efekt této látky. Předpokládá se tedy, že látka 5-azacytidin inhibuje pouze rostoucí biofilmy.

Dále byl studován vliv látky sinefungin na růst a architekturu biofilmu *S. pneumoniae*. Yadav a kolektiv (2014) zjistili, že biofilmy pěstované v přítomnosti sinefunginu tvoří méně biomasy. Inhibice tvorby biofilmu byla zaznamenána v takových koncentracích, které neovlivňovaly růst buněk planktonních. Dále pozorovali, že se po přidání sinefunginu

k již utvořeným biofilmům snižuje životaschopnost buněk a opět se snižuje množství jejich biomasy. Biofilmy pěstované v přítomnosti sinefunginu měly také odlišnou architekturu od biofilmů kontrolních.

Jak je z textu patrné, existuje mnoho faktorů ovlivňujících citlivost biofilmů k antibiotikům. Účinnost antibiotik a antimikrobiálních látek závisí na druhu testované látky a její koncentraci, dále na konkrétním kmenu bakterie, na zralosti biofilmu a na tom, zda máme k dispozici opouzdřenou či neopouzdřenou formu. Dále si lze také všimnout snížené účinnosti antibiotik při inhibici tvorby biofilmu i rozrušování biofilmů již vytvořených. Jako mnohem účinnější v destrukci biofilmů se projevíly antimikrobiální látky odvozené od bakteriálních metabolitů, rostlinné extrakty či bakteriální a fágové hydrolázy, které nejen bránily tvorbě biofilmu, ale dokonce i rozrušovaly biofilmy již vytvořené.

4. Metody používané pro studium biofilmu

4.1. Obecné kultivační systémy

In vitro systémy pro studium biofilmů dělíme na otevřené a uzavřené. V otevřených systémech jsou živiny neustále doplňovány a populační růst se nezastavuje. Mezi otevřené systémy řadíme „flow cell“ a biofilmové reaktory, jako je reaktor vyvinutý v „Centers for Disease Control and Prevention“ (CDC) či rotační válcový reaktor. Tyto systémy dovolují lepší kontrolu rychlosti růstu a jiných proměnných. V systémech uzavřených jsou živiny a ostatní faktory omezeny, dochází k jejich postupnému vyčerpání a zastavení populačního růstu. K uzavřeným systémům patří systém nazvaný „Calgary biofilm device“ (CBD).

„Flow cell“ systém je složen z průtokové komůrky, nádoby s kultivačním médiem a peristaltické pumpy, která do komůrky přivádí čerstvé médium. Buňky se postupně přichytávají k povrchu a začínají tvořit biofilm. Jako plochy pro růst biofilmu lze použít krycí sklíčka. Nárůsty biofilmu mohou být následně zkoumány pomocí laserové konfokální mikroskopie či mikroskopie elektronové (Wolfaardt *et al.* 1994). Trojrozměrné konfokální obrazy umožňují sledovat působení antibiotika na biofilm. Mrtvé buňky či oblasti biofilmu mohou být identifikovány fluorescenčním barvením pomocí propidium jodidu (Swope and Flickinger 1996).

Mezi biofilmové reaktory patří například rotační válcový reaktor a CDC. Rotační válcový reaktor se skládá ze dvou válců, vnitřního pohyblivého válce a nepohyblivého vnějšího válce a částí přivádějících a odvádějících médium. Pohyb vnitřního válce způsobuje pohyb média v systému. Do vnitřní stěny vnějšího válce jsou vložena sklíčka pro odběr

vzorků biofilmu. Tento systém se používá zejména ke studiu různorodosti biofilmu (Gjaltema *et al.* 1994). CDC (Obr. 6) se skládá ze skleněné reakční nádoby a víka, na kterém je připevněno 8 tyčí. Na každé tyči jsou 3 místa, do kterých se vkládají plošky pro růst biofilmu. Celkem lze tedy získat 24 vzorků biofilmu. Nádoba je umístěna na míchadlo, které zajišťuje míchání kultivačního média. Nové médium je do nádoby přiváděno pomocí peristaltické pumpy. Tento systém lze využít pro detekci tvorby biofilmu, popisu jeho struktury a stanovení citlivosti k antibiotikům (Donlan *et al.* 2002).



Obr.6: Fotografie CDC biofilmového reaktoru. Převzato a upraveno podle Donlan *et al.* (2004).

CBD metoda využívá 96 jamkovou destičku s víčkem, na které je připevněno 96 odnímatelných polystyrenových kolíků. Během inkubace dochází k adhezi některých buněk tvořících biofilm na povrchu kolíku. Tato metoda se používá k rychlému a snadno reprodukovatelnému stanovení citlivosti biofilmu k antibiotikům. Po vyjmutí a opláchnutí jsou bakterie inkubovány na kolících v mikrotitračních destičkách s roztoky antimikrobiálních látek. Následně jsou kolíky přemístěny a inkubovány v destičkách bez antibiotika. Po 24 hodinách inkubace je biofilm přenesen do jamek a pomocí měření zákalu stanovuje citlivost biofilmu k antibiotikům. Mezi výhody tohoto systému patří to, že na každém kolíku vznikají rovnocenné nánosy biofilmu, což umožňuje testování různých látek a koncentrací během jednoho experimentu (Ceri *et al.* 1999).

4.2. Diagnostické metody

Jak již bylo řečeno, růst bakterií ve formě biofilmu je spojen s mnoha zdravotními problémy. Identifikace biofilmu u přetrvávajících infekcí může pomoci při rozhodování o vhodné léčbě. Existenci biofilmu lze prokázat pomocí různých mikroskopických metod. Dále pomocí kultivačních metod, mezi které patří Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách, zkumavková metoda a kultivace na agaru s kongo červení. Detekce přítomnosti biofilmu pomocí molekulárních metod jsou založeny na rozdílné expresi genů buněk žijících v biofilmu a buněk planktonních.

Při použití Christensenovy metody v mikrotitrační destičce jsou mikroorganismy zaočkovány do jamek s médiem. Pokud dochází k tvorbě biofilmu, tvoří se na dně a stěnách jamek. Po inkubaci se mističky promyjí puřem, čímž se odstraní buňky planktonní a přisedlé buňky se zafixují. Následuje barvení biofilmu genciánovou violetí a stanovení tvorby biofilmu měřením absorbance. Tato metoda je jednoduchá, levná a používá se ke zkoumání bakteriální adherence. Výsledky pak rozdělují organismy do třech kategorií podle naměřené optické denzity, a to organismy neadherentní, nízce adherentní a vysoce adherentní (Christensen *et al.* 1985). Tento postup lze také použít ke stanovení citlivosti biofilmu k antibiotikům. V jednoduchém testu se do jamek s bakteriemi v živném médiu přidá i koncentrační řada sledovaného antibiotika. Kvantifikace nárůstu se provádí po odstranění média z jamek, jejich promytí puřem a barvením genciánovou violetí (Takahashi *et al.* 2007). Tuto detekční metodu lze provádět i ve zkumavkách (Christensen *et al.* 1982).

Základem kultivace bakterií na agaru s kongo červení je pevné médium, které se skládá z média Brain Heart Infusion, doplněného sacharózou a kongo červení. Po zaočkování bakterií je tvorba biofilmu pozorována jako černé kolonie se suchou krystalickou konzistencí, zatímco negativní výsledky jsou pozorovány jako růžové kolonie (Freeman *et al.* 1989). Výhodou tohoto postupu je jeho jednoduchost a cenová dostupnost. Nevýhodou je subjektivita hodnocení výsledků (Růžička *et al.* 2004).

Molekulární metody (hlavně PCR techniky) používané k detekci biofilmu využívají jejich odlišnou expresi genů oproti buňkám planktonním. Například biofilm bakterie *S. epidermis* v ECM obsahuje protein adhezín (polysaccharide intercellular adhesin - **PIA**), který slouží jako ochrana před imunitním systémem hostitele (Vuong *et al.* 2004). Syntéza PIA se děje transkripcí chromozomálních *ica* genů (Heilmann *et al.* 1996 cit. dle Ziebuhr

et al. 1997). Během experimentu lze DNA extrahovat přímo z klinických izolátů bakterií. Dále se provede PCR a vizualizace amplifikovaných produktů včetně testovaných *ica* genů pomocí gelové elektroforézy (Arciola *et al.* 2001).

4.3. Kultivační systémy pro studium biofilmu u bakterie *S. pneumoniae*

Na studiu biofilmů bakterie *S. pneumoniae* se začalo pracovat v druhé polovině devadesátých let minulého století. Hlavní snahou bylo vytvořit jednoduchý model, který by co nejdříveji simuloval prostředí růstu biofilmu *in vivo*. Výsledky jednotlivých laboratoří zabývajících se biofilmy *S. pneumoniae* nelze snadno porovnávat, protože používají různé přístupy k jejich pěstování *in vitro*.

Budhani a Struthers (1997) použili ke stanovení citlivosti biofilmu bakterie *S. pneumoniae* k antibiotikům metodu „Sorbarod biofilm system“, již dříve používanou ke studiu biofilmů bakterií *Staphylococcus aureus* a *P. aeruginosa* (Hodgson *et al.* 1995). Tento systém se skládá z peristaltické pumpy, celulózových filtrů, které jsou místem růstu biofilmu, silikonových hadiček, do kterých jsou tyto filtry umístěny a hadiček přivádějících a odvádějících médium. Stejný systém byl později použit ke studiu vlivu pouzder *S. pneumoniae* na tvorbu biofilmu (Waite *et al.* 2001).

Donlan a kolektiv (2004) poukázali na nedostatek informací o ECM a kinetice tvorby biofilmu u bakterie *S. pneumoniae*, proto pro studium těchto biofilmů použili CDC. Výhodou této metody je možnost měřit v průběhu tvorby biofilmu zároveň počet buněk a přírůstek ECM. V tomto systému jsou proteiny a polysacharidy kvantifikovány pomocí spektrofotometrických metod, zatímco struktura biofilmu je studována za využití fluorescenčních sond.

Allegrucci a kolektiv (2006) použili pro studium biofilmu *S. pneumoniae* kontinuální metodu kultivace „flow cell“, která byla již dříve použita pro pozorování růstu a vývoje biofilmu bakterie *P. aeruginosa* (Sauer *et al.* 2002). Moscoso a kolektiv (2006) ve stejném roce použili k pozorování tvorby biofilmu bakterie *S. pneumoniae* Christensenovu metodu v mikrotitrační destičce. Tento postup byl také použit pro stanovení citlivosti biofilmu k antibiotikům (del Prado *et al.* 2010), dále při studiu vlivu molekul QS na tvorbu biofilmu (Oggioni *et al.* 2006), pro porovnání schopnosti tvořit biofilm různými klinickými izoláty *S. pneumoniae* (García-Castillo *et al.* 2007) a ke studiu metabolických změn, které nastanou při růstu *S. pneumoniae* v biofilmu (Allan *et al.* 2014).

5. Závěr

Předkládaná práce shrnuje poznatky o tvorbě biofilmu, regulačních procesech, příčinách vyšší rezistence k antibiotikům a metodách studia biofilmu obecně, se zaměřením na podmíněně patogenní bakterii *S. pneumoniae*.

Nejrozšířenější, dodnes používanou, definici bakteriálního biofilmu formuloval Costerton (1999). Ačkoliv se pokoušel definici dále rozvíjet, v pozdějších pracích jako definiční kritérium stanovil také to, že buňky biofilmu mají být nevratně přisedlé. Tento předpoklad však pomíjí skutečnost, že během vývoje biofilmu dochází k disperzi buněk ať už jednotlivých nebo ve shlucích (Sauer *et al.* 2002).

Regulace tvorby biofilmu *S. pneumoniae* je ovlivněna autoinduktory (systémem QS), přítomností pneumolysinu či bakteriálního pouzdra. Dále existují také vnější faktory, které mají na tvorbu biofilmu *S. pneumoniae* vliv. K těmto vlivům patří například výskyt stresových hormonů hostitele či přítomnost antibiokrobiální látky v prostředí.

Citlivost biofilmu k antimikrobiálním látkám ovlivňuje druh testované látky a její koncentrace, kmen bakterie, zralost biofilmu a to, zda se jedná o opouzdrěnou či neopouzdrěnou formu. Biofilm bakterie *S. pneumoniae* vykazuje zvýšenou rezistenci k antibiotikům, například k amoxicilinu, erythromycinu a levofloxacinu (del Prado *et al.* 2010), proto jsou v posledních letech testovány jiné alternativní antimikrobiální látky. Příznivé výsledky přineslo například testování bakteriálních hydroláz (Domenech *et al.* 2011), rostlinného extraktu 220D-F2 (Talekar *et al.* 2014) a synefunginu (Yadav *et al.* 2014), které nejen že inhibují tvorbu biofilmu, ale jsou dokonce i schopné rozrušit biofilmy již vytvořené.

Schaudinn a kolektiv (2007) vidí zvýšenou virulenci bakterií žijících v biofilmu v existenci mikrokolonií v podobě „honey-like“ struktury, díky níž biofilmy snáze odolávají tlaku okolní tekutiny a mechanickým deformacím. Naproti tomu Sanchez a kolektiv (2011) tvrdí, že schopnost bakterie *S. pneumoniae* tvořit biofilm není spojena se zvýšením virulence. Podle jejich experimentů mají planktonní buňky mnohem větší potenciál šířit se v těle hostitele a způsobovat onemocnění než buňky biofilmu.

Pro studium biofilmu existuje několik různých metod, z nichž nejpoužívanější je Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách, která umožňuje kvantifikaci nárůstu biofilmu v malém objemu kultury. Metody „flow cell“ a CDC lze použít pro následné morfologické studium vzorků biofilmu pomocí fluorescenční mikroskopie. Metoda „flow

cell“ je kromě studia strukturních parametrů, jako je tloušťka biofilmu a hustota buněk, také vhodná k vizualizaci tvorby biofilmu v průběhu času. Metoda CDC umožňuje současnou analýzu planktonních buněk a buněk tvořících biofilm. Při použití metody CBD lze studovat 96 vzorků biofilmu během jedné kultivace, takto vzniklé biofilmy je možné pozorovat pomocí různých druhů mikroskopii a 3D vizualizačních metod.

Studium biofilmů u bakterií je stále aktuálním tématem, které má potenciál přinášet další poznatky. Z medicinského hlediska by bylo přínosem detailnější prozkoumání prvotní regulace adheze buněk k abiotickým a biotickým povrchům a řízení disperze buněk biofilmu do prostředí. Během dalšího výzkumu biofilmu u bakterie *S. pneumoniae* by se mohl sledovat vzájemný vztah systémů regulujících tvorbu biofilmu, dráhy comABCDE a systému založeného na AI-2. Jako potenciálně přínosné téma pro další výzkum se také jeví studium vlivu dalších antimikrobiálních látek na biofilm *S. pneumoniae*.

6. Seznam literatury

- Allan, R. N., P. Skipp, J. Jefferies, S. C. Clarke, S. N. Faust, L. Hall-Stoodley and J. Webb (2014): Pronounced Metabolic Changes in Adaptation to Biofilm Growth by *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS ONE* 9 (9): 1–13.
- Allegrucci, M., F. Hu, K. Shen, J. D. Hayes, G. D. Ehrlich, J. Ch. Post and K. Sauer (2006): Phenotypic Characterization of *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Development. *Journal of Bacteriology* 188 (7): 2325–35.
- Allison, D. G., D. J. Evans, M. R. W. Brown and P. Duncan Gilbert (1990): Possible Involvement of the Division Cycle in Dispersal of *Escherichia coli* from Biofilms. *Journal of Bacteriology* 172 (3): 1667–69.
- Alloing, G., B. Martin, Ch. Granadel and J. Claverys (1998): Development of Competence in *Streptococcus pneumoniae*: Pheromone Autoinduction and Control of Quorum Sensing by the Oligopeptide Permease. *Molecular Microbiology* 29 (1): 75–83.
- Alouf, J. E. and C. Geoffroy (1991): The Family of the Anti-Genically-Related, Cholesterol-Binding ('sulphydryl-Activated') Cytolytic Toxins. In *Source Book of Bacterial Toxins*, edited by J. E. Alouf and J. H. Freer, 147–86. San Diego: Academic Press. Citováno podle Rubins *et al.* (1994).
- Anderl, J. N., M. J. Franklin and P. S. Stewart (2000): Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (7): 1818–24.
- Arciola, C. R., L. Baldassarri and L. Montanaro (2001): Presence of *icaA* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collection of Staphylococcal Strains from Catheter-Associated Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (6): 2151–56.
- Bassler, B. L., M. Wright and M. R. Silverman (1994): Multiple Signalling Systems Controlling Expression of Luminescence in *Vibrio harveyi*: Sequence and Function of Genes Encoding a Second Sensory Pathway. *Molecular Microbiology* 13 (2): 273–86.
- Berry, A. M., R. A. Lock, S. M. Thomas, D. P. Rajan, D. Hansman and J. C. Paton (1994): Cloning and Nucleotide Sequence of the *Streptococcus pneumoniae* Hyaluronidase Gene and Purification of the Enzyme from Recombinant *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 62 (3): 1101–8.
- Bobrov, A. G., A. A. Khweek, R. D. Perry, K. D. Parrish, J. D. Fetherston and S. W. Bearden (2007): Functional Quorum Sensing Systems Affect Biofilm Formation and Protein Expression in *Yersinia pestis*. In *The Genus Yersinia*, edited by R. D. Perry and J. D. Fetherston, 178–91. New York: Springer.
- Brooun, A., S. Liu and K. Lewis (2000): A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (3): 640–46.
- Brown, M. L. and J. J. Gauthier (1993): Cell Density and Growth Phase as Factors in the Resistance of a Biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) to Iodine. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (7): 2320–22.
- Bryant, R. D., W. Jansen, J. Boivin, E. J. Laishley and J. W. Costerton (1991): Effect of Hydrogenase and Mixed Sulfate-Reducing Bacterial Populations on the Corrosion of Steel. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (10): 2804–9.

- Budhani, R. K. and J. K. Struthers (1997): The Use of Sorbarod Biofilms to Study the Antimicrobial Susceptibility of a Strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40 (4): 601–2.
- Calix, J. J., R. J. Porambo, A. M. Brady, T. R. Larson, J. Yother, Ch. Abeygunwardana and M. H. Nahm (2012): Biochemical, Genetic, and Serological Characterization of Two Capsule Subtypes among *Streptococcus pneumoniae* Serotype 20 Strains DISCOVERY OF A NEW PNEUMOCOCCAL SEROTYPE. *Journal of Biological Chemistry* 287 (33): 27885–94.
- Ceri, H., M. E. Olson, C. A. Stremick, R. R. Read, D. W. Morck and A. G. Buret (1999): The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (6): 1771–76.
- Christensen, G. D., W. A. Simpson, A. L. Bisno and E. H. Beachey (1982): Adherence of Slime-Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces. *Infection and Immunity* 37 (1): 318–26.
- Christensen, G. D., W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barrett, D. M. Melton and E. H. Beachey (1985): Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: A Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *Journal of Clinical Microbiology* 22 (6): 996–1006.
- Conrad, A., M. Kontro, M. M. Keinänen, A. Cadoret, P. Faure, L. Mansuy-Huault and J.-C. Block (2003): Fatty Acids of Lipid Fractions in Extracellular Polymeric Substances of Activated Sludge Flocs. *Lipids* 38 (10): 1093–1105.
- Costerton, J. W., G. G. Geesey and K. Cheng (1978): How Bacteria Stick. *Scientific American* 238 (1): 86–95.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart and E. P. Greenberg (1999): Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284 (5418): 1318–22.
- Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton and E. P. Greenberg (1998): The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* 280 (5361): 295–98.
- Del Prado, G., V. Ruiz, P. Naves, V. Rodríguez-Cerrato, F. Soriano and M. del Carmen Ponte (2010): Biofilm Formation by *Streptococcus pneumoniae* Strains and Effects of Human Serum Albumin, Ibuprofen, N-Acetyl-L-Cysteine, Amoxicillin, Erythromycin, and Levofloxacin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 67 (4): 311–18.
- Demuyser, L., M. A. Jabra-Rizk, and P. Van Dijck (2014): Microbial Cell Surface Proteins and Secreted Metabolites Involved in Multispecies Biofilms. *Pathogens and Disease* 70 (3): 219–30.
- Domenech, M., E. García and M. Moscoso (2011): *In Vitro* Destruction of *Streptococcus pneumoniae* Biofilms with Bacterial and Phage Peptidoglycan Hydrolases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (9): 4144–48.
- Donlan, R. M., and J. W. Costerton (2002): Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2): 167–93.

- Donlan, R. M., R. Murga, J. Carpenter, E. Brown, R. Besser and B. Fields (2002): Monochloramine Disinfection of Biofilm-Associated *Legionella pneumophila* in a Potable Water Model System. In *Legionella*, edited by R. Marre, Y. A. Kwaik, C. Bartlett, N. P. Cianciotto, B. S. Fields, M. Frosch, J. Hacker and P. C. Lück, 406–10. Washington, DC: ASM Press.
- Donlan, R. M., J. A. Piede, C. D. Heyes, L. S. Sanii, R. Murga, P. A. Edmonds, I. H. El-Sayed and M. A. El-Sayed (2004): Model System for Growing and Quantifying *Streptococcus pneumoniae* Biofilms In Situ and in Real Time. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (8): 4980–88.
- Douglas, L. J. (2003): Candida Biofilms and Their Role in Infection. *Trends in Microbiology* 11 (1): 30–36.
- Engbrecht, J. and M. Silverman (1984): Identification of Genes and Gene Products Necessary for Bacterial Bioluminescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81 (13): 4154–58.
- Entcheva-Dimitrov, P. and Alfred M. Spormann (2004): Dynamics and Control of Biofilms of the Oligotrophic Bacterium *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology* 186 (24): 8254–66.
- Freeman, D. J., F. R. Falkner and C. T. Keane (1989): New Method for Detecting Slime Production by Coagulase Negative Staphylococci. *Journal of Clinical Pathology* 42 (8): 872–74.
- Ganeshnarayan, K., S. M. Shah, M. R. Libera, A. Santostefano and J. B. Kaplan (2009): Poly-N-Acetylglucosamine Matrix Polysaccharide Impedes Fluid Convection and Transport of the Cationic Surfactant Cetylpyridinium Chloride through Bacterial Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (5): 1308–14.
- García-Castillo, M., M. I. Morosini, A. Valverde, F. Almaraz, F. Baquero, R. Cantón and R. del Campo (2007): Differences in Biofilm Development and Antibiotic Susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Cystic Fibrosis Samples and Blood Cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59 (2): 301–4.
- Gilabert, M., K. Marcinkevicius, S. Andujar, M. Schiavone, M. E. Arena and A. Bardón (2015): Sesqui- and Triterpenoids from the Liverwort *Lepidozia chordulifera* Inhibitors of Bacterial Biofilm and Elastase Activity of Human Pathogenic Bacteria. *Phytomedicine* 22 (1): 77–85.
- Gjaltema, A., P. A. M. Arts, M. C. M. Van Loosdrecht, J. G. Kuenen and J. J. Heijnen (1994): Heterogeneity of Biofilms in Rotating Annular Reactors: Occurrence, Structure, and Consequences. *Biotechnology and Bioengineering* 44 (2): 194–204.
- Hammer, B. K. and B. L. Bassler (2003): Quorum Sensing Controls Biofilm Formation in *Vibrio Cholerae*. *Molecular Microbiology* 50 (1): 101–4.
- Håvarstein, L. S., P. Gaustad, I. F. Nes and D. A. Morrison (1996): Identification of the Streptococcal Competence-Pheromone Receptor. *Molecular Microbiology* 21 (4): 863–69. Citováno dle Håvarstein *et al.* (1997).
- Håvarstein, L.S., R. Hakenbeck and P. Gaustad (1997): Natural Competence in the Genus *Streptococcus*: Evidence That Streptococci Can Change Pherotype by Interspecies Recombinational Exchanges. *Journal of Bacteriology* 179 (21): 6589–94.

- Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack and F. Götz: (1996): Molecular Basis of Intercellular Adhesion in the Biofilm-Forming *Staphylococcus epidermidis*. *Molecular Microbiology* 20 (5): 1083–91. Citováno dle Ziebuhr *et al.* (1997).
- Hickman, J. W., D. F. Tifrea and C. S. Harwood (2005): A Chemosensory System That Regulates Biofilm Formation through Modulation of Cyclic Diguanylate Levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (40): 14422–27.
- Hodgson, A. E., S. M. Nelson, M. R. W. Brown and P. Gilbert (1995): A Simple *in Vitro* Model for Growth Control of Bacterial Biofilms. *Journal of Applied Bacteriology* 79 (1): 87–93.
- Hui, F. M. and D. A. Morrison (1991): Genetic Transformation in *Streptococcus pneumoniae*: Nucleotide Sequence Analysis Shows *comA*, a Gene Required for Competence Induction, to Be a Member of the Bacterial ATP-Dependent Transport Protein Family. *Journal of Bacteriology* 173 (1): 372–81.
- Hyams, C., E. Camberlein, J. M. Cohen, K. Bax, and J. S. Brown (2010): The *Streptococcus pneumoniae* Capsule Inhibits Complement Activity and Neutrophil Phagocytosis by Multiple Mechanisms. *Infection and Immunity* 78 (2): 704–15.
- Jayaraman, A. and T. K. Wood (2008): Bacterial Quorum Sensing: Signals, Circuits, and Implications for Biofilms and Disease. *Annual Review of Biomedical Engineering* 10 (1): 145–67.
- Jones, M. B. and M. J. Blaser (2003): Detection of a *luxS*-Signaling Molecule in *Bacillus anthracis*. *Infection and Immunity* 71 (7): 3914–19.
- Joyce, E. A., B. L. Bassler and A. Wright (2000): Evidence for a Signaling System in *Helicobacter pylori*: Detection of a *luxS*-Encoded Autoinducer. *Journal of Bacteriology* 182 (13): 3638–43.
- Kaplan, J. B., K. LoVetri, S. T. Cardona, S. Madhyastha, I. Sadovskaya, S. Jabbouri and E. A. Izano (2012): Recombinant Human DNase I Decreases Biofilm and Increases Antimicrobial Susceptibility in Staphylococci. *The Journal of Antibiotics* 65 (2): 73–77.
- Karim, M. M., T. Hisamoto, T. Matsunaga, Y. Asahi, Y. Noiri, S. Ebisu, A. Kato and H. Azakami (2013): *luxS* Affects Biofilm Maturation and Detachment of the Periodontopathogenic Bacterium *Eikenella Corrodens*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 116 (3): 313–18.
- Keren, I., N. Kaldalu, A. Spoering, Y. Wang and K. Lewis (2004): Persister Cells and Tolerance to Antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters* 230 (1): 13–18.
- Kim, J.-S., P. Heo, T.-J. Yang, K. Lee, Y. Jin, S. Kim, D. Shin and D. Kweon (2011): Bacterial Persisters Tolerate Antibiotics by Not Producing Hydroxyl Radicals. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 413 (1): 105–10.
- Klausen, M., A. Aaes-Jørgensen, S. Molin and T. Tolker-Nielsen (2003): Involvement of Bacterial Migration in the Development of Complex Multicellular Structures in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Molecular Microbiology* 50 (1): 61–68.

- Kohanski, M. A., D. J. Dwyer, B. Hayete, C. A. Lawrence, and J. J. Collins (2007): A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell* 130 (5): 797–810.
- Ko, K.S., J. Y. Baek and J.-H. Song (2013): Capsular Gene Sequences and Genotypes of ‘Serotype 6E’ *Streptococcus pneumoniae* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 51 (10): 3395–99.
- Krivan, H. C., D. D. Roberts and V. Ginsburg (1988): Many Pulmonary Pathogenic Bacteria Bind Specifically to the Carbohydrate Sequence GalNAc Beta 1-4Gal Found in Some Glycolipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (16): 6157–61.
- Lee, Y.-O., P. Jin-Hwa and J.-K. Park (2005): Microbial Characterization of Excessive Growing Biofilm in Sewer Lines Using Molecular Technique. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15 (5): 938–45.
- Lemon, K. P., A. M. Earl, H. C. Vlamakis, C. Aguilar and R. Kolter (2008): Biofilm Development with an Emphasis on *Bacillus subtilis*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 322: 1–16.
- Lizcano, A., T. Chin, K. Sauer, E. I. Tuomanen and C. J. Orihuela (2010): Early Biofilm Formation on Microtiter Plates Is Not Correlated with the Invasive Disease Potential of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis* 48 (3–4): 124–30.
- Lynch, D. J., T. L. Fountain, J. E. Mazurkiewicz and J. A. Banas (2007): Glucan-Binding Proteins Are Essential for Shaping *Streptococcus mutans* Biofilm Architecture. *FEMS Microbiology Letters* 268 (2): 158–65.
- Magnuson, R., J. Solomon and A. D. Grossman (1994): Biochemical and Genetic Characterization of a Competence Pheromone from *B. Subtilis*. *Cell* 77 (2): 207–16.
- Ma, L., M. Conover, H. Lu, M. R. Parsek, K. Bayles, and D. J. Wozniak (2009): Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *PLoS Pathog* 5 (3): e1000354.
- Marks, L. R., B. A. Davidson, P. R. Knight and A. P. Hakansson (2013): Interkingdom Signaling Induces *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Dispersion and Transition from Asymptomatic Colonization to Disease. *mBio* 4 (4): e00438–13.
- Meighen, E. A. (1991): Molecular Biology of Bacterial Bioluminescence. *Microbiological Reviews* 55 (1): 123–42.
- Moscoso, M., M. Esteban-Torres, M. Menéndez and E. García (2014): *In Vitro* Bactericidal and Bacteriolytic Activity of Ceragenin CSA-13 against Planktonic Cultures and Biofilms of *Streptococcus pneumoniae* and Other Pathogenic Streptococci. *PLoS ONE* 9 (7): e101037.
- Moscoso, M., E. García and R. López (2006): Biofilm Formation by *Streptococcus pneumoniae*: Role of Choline, Extracellular DNA, and Capsular Polysaccharide in Microbial Accretion. *Journal of Bacteriology* 188 (22): 7785–95.
- Mosser, J. L. and A. Tomasz (1970): Choline-Containing Teichoic Acid as a Structural Component of Pneumococcal Cell Wall and Its Role in Sensitivity to Lysis by an Autolytic Enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 245 (2): 287–98.
- Nickel, J. C., I. Ruseska, J. B. Wright and J. W. Costerton (1985): Tobramycin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Cells Growing as a Biofilm on Urinary Catheter Material. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 27 (4): 619–24.

- Ochsner, U. A. and J. Reiser (1995): Autoinducer-Mediated Regulation of Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (14): 6424–28.
- Oggioni, M. R., C. Trappetti, A. Kadioglu, M. Cassone, F. Iannelli, S. Ricci, P.W. Andrew and G. Pozzi (2006): Switch from Planktonic to Sessile Life: A Major Event in Pneumococcal Pathogenesis. *Molecular Microbiology* 61 (5): 1196–1210.
- Ohgaki, N. (1994): Bacterial Biofilm in Chronic Airway Infection. *Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases* 68 (1): 138–51.
- Park, S. J., K.-H. Han, J. Y. Park, S. J. Choi and K.-H. Lee (2014): Influence of Bacterial Presence on Biofilm Formation of *Candida albicans*. *Yonsei Medical Journal* 55 (2): 449–58.
- Pearson, J. P., Ch. Van Delden and B. H. Iglewski (1999): Active Efflux and Diffusion Are Involved in Transport of *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signals. *Journal of Bacteriology* 181 (4): 1203–10.
- Pearson, J. P., K. M. Gray, L. Passador, K. D. Tucker, A. Eberhard, B. H. Iglewski and E. P. Greenberg (1994): Structure of the Autoinducer Required for Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (1): 197–201.
- Pestova E. V., L. S. Håvarstein and D. A. Morrison (1996): Regulation of Competence for Genetic Transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an Auto-Induced Peptide Pheromone and a Two-Component Regulatory System. *Molecular Microbiology* 21 (4): 853–62.
- Pilchová, T., M. Hernould, H. Prévost, K. Demnerová, J. Pazlarová and O. Tresse (2014): Influence of Food Processing Environments on Structure Initiation of Static Biofilm of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 35 (1): 366–72.
- Piper, K. R., S. B. von Bodman and S. K. Farrand (1993): Conjugation Factor of *Agrobacterium tumefaciens* Regulates Ti Plasmid Transfer by Autoinduction. *Nature* 362 (6419): 448–50.
- Pirhonen, M., D. Flego, R. Heikinheimo and E. T. Palva (1993): A Small Diffusible Signal Molecule Is Responsible for the Global Control of Virulence and Exoenzyme Production in the Plant Pathogen *Erwinia carotovora*. *The EMBO Journal* 12 (6): 2467–76.
- Platt, R. M., G. G. Geesey, J. D. Davis and D. C. White (1985): Isolation and Partial Chemical Analysis of Firmly Bound Exopolysaccharide from Adherent Cells of a Freshwater Sediment Bacterium. *Canadian Journal of Microbiology* 31 (8): 675–80. Citováno dle Westall *et al.* (2000).
- Quave, C. L., M. Estévez-Carmona, C. M. Compadre, G. Hobby, H. Hendrickson, K. E. Beenken and M. S. Smeltzer (2012): Ellagic Acid Derivatives from *Rubus ulmifolius* Inhibit *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Improve Response to Antibiotics. *PLoS ONE* 7 (1): e28737.
- Ren, B., J. Li, K. Genschmer, S. K. Hollingshead and D. E. Briles (2012): The Absence of PspA or Presence of Antibody to PspA Facilitates the Complement-Dependent Phagocytosis of Pneumococci *In Vitro*. *Clinical and Vaccine Immunology* 19 (10): 1574–82.

- Rosenow, C., P. Ryan, J. N. Weiser, S. Johnson, P. Fontan, A. Ortvist and H. R. Masure (1997): Contribution of Novel Choline-Binding Proteins to Adherence, Colonization and Immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* 25 (5): 819–29.
- Rubins, J. B., T. J. Mitchell, P. W. Andrew and D. E. Niewoehner (1994): Pneumolysin Activates Phospholipase A in Pulmonary Artery Endothelial Cells. *Infection and Immunity* 62 (9): 3829–36.
- Růžička, F., V. Holá, M. Votava, R. Tejkalová, R. Horvát, M. Heroldová and V. Woznicová (2004): Biofilm Detection and the Clinical Significance of *Staphylococcus epidermidis* Isolates. *Folia Microbiologica* 49 (5): 596–600.
- Sanchez, C. J., N. Kumar, A. Lizcano, P. Shivshankar, J. C. D. Hotopp, J. H. Jorgensen, H. Tettelin and C. J. Orihuela (2011): *Streptococcus pneumoniae* in Biofilms Are Unable to Cause Invasive Disease Due to Altered Virulence Determinant Production. *PLoS ONE* 6 (12): e28738.
- Sandrini, S., F. Alghofaili, P. Freestone and H. Yesilkaya (2014): Host Stress Hormone Norepinephrine Stimulates Pneumococcal Growth, Biofilm Formation and Virulence Gene Expression. *BMC Microbiology* 14 (1): 1–12.
- Sandt, C., J. Barbeau, M. Gagnon and M. Lafleur (2007a): Role of the Ammonium Group in the Diffusion of Quaternary Ammonium Compounds in *Streptococcus mutans* Biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60 (6): 1281–87.
- Sandt, T. S.-P., J. Pink, L. Brennan and D. Pink (2007b): Confocal Raman Microspectroscopy as a Tool for Studying the Chemical Heterogeneities of Biofilms in Situ. *Journal of Applied Microbiology* 103 (5): 1808–20.
- Sauer, K., A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton and D. G. Davies (2002): *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology* 184 (4): 1140–54.
- Sawhney, R. and Vandana Berry (2009): Bacterial Biofilm Formation, Pathogenicity, Diagnostics and Control: An Overview. *Indian Journal of Medical Sciences* 63 (7): 313–21.
- Schaudinn, C., P. Stoodley, A. Kainovic, T. O. Keeffe, B. Costerton, D. Robinson, M. Baum, G. Ehrlich and P. Webster (2007): Bacterial Biofilms, Other Structures Seen as Mainstream Concepts.” *Microbe-American Society for Microbiology* 2 (5): 231–37.
- Shak, J.R., H.P. Ludewick, K.E. Howery, F. Sakai, H. Yi, R.M. Harvey, J.C. Paton, K. P. Klugman and J.E. Vidal (2013): Novel Role for the *Streptococcus pneumoniae* Toxin Pneumolysin in the Assembly of Biofilms. *mBio* 4 (5): e00655–13.
- Sherrard, L. J., M. M. Tunney and J. S. Elborn (2014): Antimicrobial Resistance in the Respiratory Microbiota of People with Cystic Fibrosis. *The Lancet* 384 (9944): 703–13.
- Stewart, P. S., F. Roe, J. Rayner, J. G. Elkins, Z. Lewandowski, U. A. Ochsner and D. J. Hassett (2000): Effect of Catalase on Hydrogen Peroxide Penetration into *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2): 836–38.

- Surette, M. G., M. B. Miller and B. L. Bassler (1999): Quorum Sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio harveyi*: A New Family of Genes Responsible for Autoinducer Production. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (4): 1639–44.
- Swope, K. L. and M. C. Flickinger (1996): The Use of Confocal Scanning Laser Microscopy and Other Tools to Characterize *Escherichia coli* in a High-Cell-Density Synthetic Biofilm. *Biotechnology and Bioengineering* 52 (2): 340–56.
- Taga, M. E., J. L. Semmelhack and B. L. Bassler (2001): The LuxS-Dependent Autoinducer AI-2 Controls the Expression of an ABC Transporter That Functions in AI-2 Uptake in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* 42 (3): 777–93.
- Takahashi, N., K. Ishihara, T. Kato and K. Okuda (2007): Susceptibility of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* to Six Antibiotics Decreases as Biofilm Matures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59 (1): 59–65.
- Talekar, S. J., S. Chochua, K. Nelson, K. P. Klugman, C. L. Quave and J. E. Vidal (2014): 220D-F2 from *Rubus ulmifolius* Kills *Streptococcus pneumoniae* Planktonic Cells and Pneumococcal Biofilms. *PLoS ONE* 9 (5): e97314.
- Thurnheer, T., R. Gmür, S. Shapiro and B. Guggenheim (2003): Mass Transport of Macromolecules within an *In Vitro* Model of Supragingival Plaque. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (3): 1702–9.
- Tielen, P., M. Strathmann, K. Jaeger, H.-C. Flemming and J. Wingender (2005): Alginate Acetylation Influences Initial Surface Colonization by Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research* 160 (2): 165–76.
- Townsley, L. and F. H. Yildiz (2015): Temperature Affects c-Di-GMP Signalling and Biofilm Formation in *Vibrio Cholerae*. *Environmental Microbiology*, doi:10.1111/1462-2920.12799.
- Tuomanen, E., R. Cozens, W. Tosch, O. Zak and A. Tomasz (1986): The Rate of Killing of *Escherichia coli* By β -Lactam Antibiotics Is Strictly Proportional to the Rate of Bacterial Growth. *Journal of General Microbiology* 132 (5): 1297–1304.
- Vandevelde, N. M., P. M. Tulkens and F. Van Bambeke (2014): Antibiotic Activity against Naive and Induced *Streptococcus pneumoniae* Biofilms in an In Vitro Pharmacodynamic Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (3): 1348–58.
- Veening, J.-W., L. W. Hamoen and O. P. Kuipers (2005): Phosphatases Modulate the Bistable Sporulation Gene Expression Pattern in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 56 (6): 1481–94.
- Vidal, J. E., K. E. Howery, H. P. Ludewick, P. Nava and K. P. Klugman (2013): Quorum-Sensing Systems LuxS/Autoinducer 2 and Com Regulate *Streptococcus pneumoniae* Biofilms in a Bioreactor with Living Cultures of Human Respiratory Cells. *Infection and Immunity* 81 (4): 1341–53.
- Vidal, J. E., H. P. Ludewick, R. M. Kunkel, D. Zähler and K. P. Klugman (2011): The LuxS-Dependent Quorum-Sensing System Regulates Early Biofilm Formation by *Streptococcus pneumoniae* Strain D39. *Infection and Immunity* 79 (10): 4050–60.
- Vuong, C., J. M. Voyich, E. R. Fischer, K. R. Braughton, A. R. Whitney, F. R. DeLeo and M. Otto (2004): Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) Protects *Staphylococcus epidermidis* against Major Components of the Human Innate Immune System. *Cellular Microbiology* 6 (3): 269–75.

- Waite, R. D., J. K. Struthers and Ch. G. Dowson (2001): Spontaneous Sequence Duplication within an Open Reading Frame of the Pneumococcal Type 3 Capsule Locus Causes High-Frequency Phase Variation. *Molecular Microbiology* 42 (5): 1223–32.
- Westall, F., A. Steele, J. Toporski, M. Walsh, C. Allen, S. Guidry, D. McKay, E. Gibson and H. Chafetz (2000): Polymeric Substances and Biofilms as Biomarkers in Terrestrial Materials: Implications for Extraterrestrial Samples. *Journal of Geophysical Research: Planets* 105 (E10): 24511–27.
- Whitchurch, C. B., T. Tolker-Nielsen, P. C. Ragas and J. S. Mattick (2002): Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science* 295 (5559): 1487–1487.
- Wolfaardt, G. M., J. R. Lawrence, R. D. Robarts, S. J. Caldwell, and D. E. Caldwell (1994): Multicellular Organization in a Degradative Biofilm Community. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (2): 434–46.
- World Health Organization (2007): Pneumococcal Conjugate Vaccine for Childhood Immunization – WHO Position Paper. *Weekly Epidemiological Record* 82 (12): 93–104.
- Yadav, M. K., S.-W. Chae and J.-J. Song (2012a): “*In Vitro Streptococcus pneumoniae* Biofilm Formation and *In Vivo* Middle Ear Mucosal Biofilm in a Rat Model of Acute Otitis Induced by *S. Pneumoniae*. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology* 5 (3): 139–44.
- Yadav, M. K., S.-W. Chae and J.-J. Song (2012b): Effect of 5-Azacytidine on *In Vitro* Biofilm Formation of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis* 53 (5–6): 219–26.
- Yadav, M. K., S.-W. Park, S.-W. Chae and J.-J. Song (2014): Sinefungin, a Natural Nucleoside Analogue of S-Adenosylmethionine, Inhibits *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Growth. *BioMed Research International* 2014 (June): e156987.
- Zhang, L., P. J. Murphy, A. Kerr and M. E. Tate (1993): Agrobacterium Conjugation and Gene Regulation by N-Acyl-L-Homoserine Lactones. *Nature* 362 (6419): 446–48.
- Zhang, L. and T.-H. Mah (2008): Involvement of a Novel Efflux System in Biofilm-Specific Resistance to Antibiotics. *Journal of Bacteriology* 190 (13): 4447–52.
- Zhang, X. and P. L. Bishop (2003): Biodegradability of Biofilm Extracellular Polymeric Substances. *Chemosphere* 50 (1): 63–69.
- Zhou, M., Z. Guo, Y. Yang, Q. Duan, Q. Zhang, F. Yao, J. Zhu, X. Zhang, P.R. Hardwidge and G. Zhu (2014): Flagellin and F4 Fimbriae Have Opposite Effects on Biofilm Formation and Quorum Sensing in F4ac⁺ Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* 168 (1): 148–53.
- Zhu, J., M. B. Miller, R. E. Vance, M. Dziejman, B. L. Bassler and J. J. Mekalanos (2002): Quorum-Sensing Regulators Control Virulence Gene Expression in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (5): 3129–34.
- Ziebuhr, W., C. Heilmann, F. Götz, P. Meyer, K. Wilms, E. Straube and J. Hacker (1997): Detection of the Intercellular Adhesion Gene Cluster (*ica*) and Phase Variation in *Staphylococcus epidermidis* Blood Culture Strains and Mucosal Isolates. *Infection and Immunity* 65 (3): 890–96.
- Zobell, C. E. and D. Quentin Anderson (1936): Observations on the Multiplication of Bacteria in Different Volumes of Stored Sea Water and the Influence of Oxygen Tension and Solid Surfaces. *The Biological Bulletin* 71 (2): 324–42.