

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jakub Budil

Adheze bakterií k povrchům

Bacterial adhesion to surfaces

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jana Beranová, Ph.D.

Praha, 2016

Poděkování

Chtěl bych poděkovat své školitelce RNDr. Janě Beranové, Ph.D. za trpělivost, ochotu a vytrvalost, se kterou mi pomáhala a dávala cenné rady.

Prohlášení:

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

V Praze, 12. 05. 2016

Podpis:

Jakub Budil

Abstrakt

Bakteriální adheze je děj, při kterém planktonní buňka přisedá k substrátu, a je nezbytným krokem předcházejícím tvorbě bakteriálního biofilmu. Většina bakteriálních druhů je schopna tvořit biofilmy. Bakterie v biofilmu mimo jiné získávají vyšší odolnost vůči antibakteriálním látkám a dalším vnějším vlivům, což značně ztěžuje jejich odstranění. Bakteriální adheze je velmi komplexní proces, který je ovlivněn řadou fyzikálně-chemických faktorů i přítomností adhezivních struktur na povrchu bakterie a substrátu. Správný popis těchto faktorů umožňuje navržení vhodných úprav substrátu a prostředí při přípravě antiadhezivních a antibakteriálních povrchů či zefektivnění biotechnologických procesů využívajících mikroorganismy. Snížení bakteriální adheze je žádoucí hlavně v medicíně, posílení adheze zase umožňuje zvýšení efektivity procesů využívajících bakterie, například při zpracování odpadních vod.

Tato práce shrnuje teorie využívané k předpovědím bakteriální adheze, popisuje modelový průběh adheze a ovlivnění procesu adheze fyzikálními, chemickými a biologickými faktory. Součástí práce je také přehled antiadhezivních a antibakteriálních povrchů.

Klíčová slova: Bakterie, adheze, pili, bičík, antiadhezivní a antibakteriální povrchy.

Abstract

Bacterial adhesion is a process of attachment of a planktonic cell to the surface and the necessary step for further biofilm formation. Most bacterial species are capable of biofilm formation. Bacteria within biofilm exhibit increased resistance to antibiotics and other external factors, which makes the eradication of adhered bacteria rather difficult. Bacterial adhesion is very complex process affected by many physical and chemical factors as well as by the adhesive molecules present on the substrate and cell surface. Accurate description of these factors enables to design appropriate modifications of both the substrate and the environment with the aim to fabricate the antiadhesive and antibacterial surfaces or to increase the efficiency in bacteria-based biotechnological processes. Whereas in medical applications the main goal is to decrease bacterial adhesion, the increased adhesion is desirable in certain processes employing bacteria, as is for example the wastewater treatment.

This thesis reviews main theories used for prediction of bacterial adhesion, describes the process of adhesion and physical, chemical and biological factors that influence it. It also contains an overview of antiadhesive and antibacterial surfaces.

Key words: Bacteria, adhesion, pili, flagellum, antiadhesive and antibacterial surfaces.

Obsah

Abstrakt.....	v
Abstract.....	v
Obsah	vii
1. Úvod.....	1
2. Bakteriální adheze.....	2
3. Fyzikálně-chemické teorie popisující počáteční fázi bakteriální adheze.....	5
3.1. Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekova (DLVO) teorie	5
3.2. Termodynamický přístup.....	6
3.3. Rozšířená DLVO teorie (EDLVO).....	6
3.4. Shrnutí a aplikace teorií.....	7
4. Faktory prostředí ovlivňující bakteriální adhezi	9
4.1. Vliv povrchového náboje bakterií na jejich adhezi k povrchům.....	9
4.2. Vliv iontové síly na bakteriální adhezi	10
4.3. Vliv pH na bakteriální adhezi.....	11
4.4. Vliv hydrofobicity povrchu na bakteriální adhezi.....	12
4.5. Vliv teploty prostředí na bakteriální adhezi	12
4.6. Vliv hrubosti a topografie povrchu substrátu na bakteriální adhezi.....	13
4.7. Vliv povrchové energie na bakteriální adhezi.....	14
4.8. Vliv kondičujících vrstvy na bakteriální adhezi.....	16
5. Bakteriální povrchové útvary sloužící k adhezi.....	18
5.1. Bakteriální bičík	18
5.2. Lipopolysacharidy	20
5.3. Pili gramnegativních bakterií.....	21
5.4. Pili grampozitivních bakterií	23
6. Povrchy regulující bakteriální adhezi	25
6.1 Antiadhezivní povrchy.....	25
6.2 Antibakteriální povrchy	27
7. Závěr	29
8. Přehled použité literatury	30

1. Úvod

Bakterie jsou jednobuněčné organismy patřící do skupiny prokaryot. První pozorování bakterií provedl Leeuwenhoek roku 1676 (Porter, 1976). Velikost běžné bakteriální buňky je 0,5-2 μm . Díky této velikosti je možné popisovat počáteční fázi adheze bakterií na povrchy pomocí teorií popisujících interakce koloidních částic (Marshall *et al.*, 1971).

Bakterie mohou žít jako jednotlivé planktonní buňky, nebo mohou přisedat k povrchu a tvořit biofilmy. Ty mohou být tvořeny jedním i více druhy bakterií. Biofilmy jsou trojrozměrná společenství bakterií obklopených extracelulárními polymery rostoucí na pevném povrchu (Walker a Marsh, 2004). Biofilm může vznikat i na rozhraní dvou kapalin (voda a olej) či na rozhraní kapaliny a plynu (Zhang a Christopher, 2016).

Bakterie žijící v biofilmu získají vyšší odolnost vůči odmyváání, antibiotikům, dezinfekčním prostředkům, kyslíkovým radikálům, změnám pH a nedostatku živin v porovnání s planktonními buňkami (Anderl *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2002). Mezi bakteriemi tvořícími biofilm může také docházet k vzájemné metabolické spolupráci a výměně genetické informace. Bakterie v biofilmu mají ve srovnání s bakteriemi planktonními odlišnou expresi řady genů kódujících proteiny účastníci se globální regulace, odpovědi na stres, transportu živin, energetického metabolismu a detoxifikace (Giaouris *et al.*, 2013).

Kvůli výrazně zvýšené celkové odolnosti bakterií v biofilmu je důležité dokázat zabránit vzniku biofilmu. Nezbytným předpokladem pro kolonizaci substrátu a vznik biofilmu je adheze bakterií na povrch. Bakteriální adheze je děj, při kterém dochází k přisedání buňky na substrát; vzájemné přichycení dvou buněk se nazývá koheze (Garrett *et al.*, 2008). Adheze umožňuje buňkám udržet se i v prostředích, ze kterých je planktonní buňka odplavena. Umožňuje například udržení bakterií na epitelu sliznice, zachycení v prostředí s dostatkem živin, jako je lidské střevo, zabránění odplavení v tekoucích vodách či nasedání bakterií na organické nečistoty v čističkách odpadní vody. Avšak bakteriální adheze je velmi komplexní děj a je ovlivněna řadou fyzikálních, chemických a biologických faktorů.

Tato práce má za cíl shrnout hlavní fyzikálně-chemické a biologické faktory ovlivňující bakteriální adhezi k substrátům. Také zahrnuje stručný úvod do možných způsobů regulace bakteriální adheze prostřednictvím antiadhezivních a antibakteriálních úprav povrchů.

2. Bakteriální adheze

Adhezi planktonní buňky na povrch lze rozdělit na dvě základní fáze: začíná okamžitou reverzibilní fází a po několika hodinách může přejít do ireverzibilní fáze adheze (Marshall *et al.*, 1971). Teorie dvoukrokové adheze vychází z předpokladu, že adherující planktonní buňka disponuje pouze zanedbatelným množstvím preformovaných adhezivních struktur.

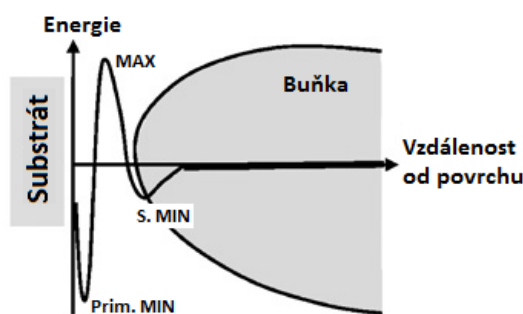
Počáteční reverzibilní fáze adheze je řízena nespecifickými interakcemi jako jsou van der Waalsovy přitažlivé síly, elektrostatické síly a hydrofobní interakce (Garrido *et al.*, 2014). Velikost a účinek těchto interakcí je dán fyzikálně-chemickými vlastnostmi buňky, substrátu a okolního roztoku jako jsou hydrofobicita a povrchový náboj (Liu a Zhao, 2005). Každý systém směřuje k energetickému minimu a proto i bakterie jsou přitahovány do oblastí energetického minima a odpuzovány z oblastí energetické bariéry (Perni *et al.*, 2014).

V závislosti na působících silách mohou nastat při kontaktu buňky se substrátem tři situace (Perni *et al.*, 2014):

(A) Buňka neadheruje, protože převažují odpudivé elektrostatické síly. Vzniká energetická bariéra, kterou buňka nedokáže překonat.

(B) Buňka okamžitě adheruje, protože je přitahována do těsného kontaktu s povrchem převažujícími van der Waalsovými silami. Tato situace nastává, když jsou elektrostatické síly zanedbatelné.

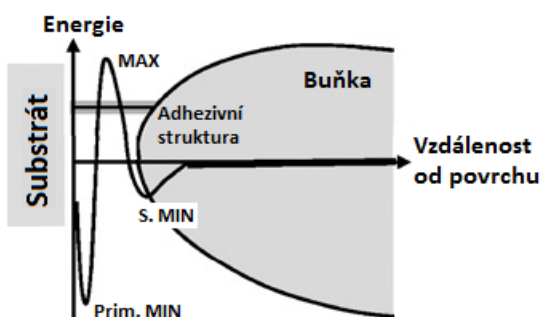
(C) Buňka je reverzibilně vázána v blízkosti substrátu v oblasti sekundárního energetického minima (viz Obr. 1). Elektrostatické síly jsou odpudivé, ale van der Waalsovy síly nad nimi převažují na krátkou a dlouhou vzdálenost, čímž vznikají dvě energetická minima oddělená odpudivou energetickou bariérou. Primární energetické minimum vzniká u povrchu, sekundární energetické minimum se nachází před energetickou bariérou, několik nanometrů od povrchu. Reverzibilní adheze je vysvětlována jako rovnováha mezi odpudivými a přitažlivými silami a buňka se při ní chová jako inertní částice (Marshall *et al.*, 1971).



Obr. 1: Reverzibilní adheze bakterie na substrát.

(Prim. MIN – primární energetické minimum, MAX – energetické maximum, S. MIN – sekundární energetické minimum).
Převzato a upraveno z Hori a Matsumoto (2010).

Průběh reverzibilní fáze adheze je předpovídán třemi modely: DLVO teorií, termodynamickým přístupem či rozšířenou DLVO teorií (viz kapitola 3). Ireverzibilní adheze nastává, pokud buňka dokáže překonat energetickou bariéru oddělující primární a sekundární energetické minimum (Perni *et al.*, 2014) a spadne do hlubokého energetického minima na povrchu substrátu (viz Obr. 2), kde pomocí aktivně produkovaných povrchových struktur ireverzibilně adheruje (Bayoudh *et al.*, 2009). Překonání energetické bariéry může nastat vlivem Brownova pohybu, aktivního pohybu či přemostěním energetické bariéry prostřednictvím povrchových struktur buňky (viz kapitola 5); (Perni *et al.*, 2014).



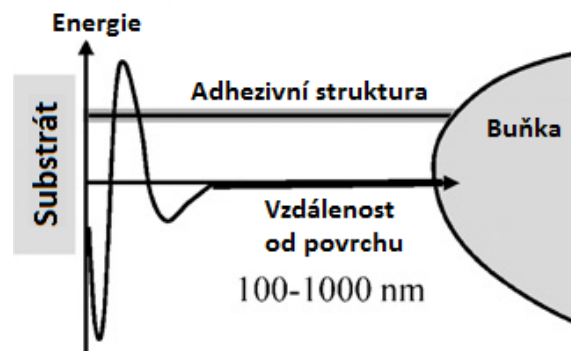
Obr. 2: Ireverzibilní adheze bakterie na substrát.

(Prim. MIN – primární energetické minimum, MAX – energetické maximum, S. MIN – sekundární energetické minimum). Převzato a upraveno z Hori a Matsumoto (2010).

Přechod od reverzibilní adheze k adhezi ireverzibilní trvá několik hodin a probíhá rychleji u mladých bakterií. Ireverzibilně adherované bakterie nevykazují Brownův pohyb a nelze je z povrchu opláchnout (Marshall *et al.*, 1971).

Pokud buňka nedokáže překonat příliš vysokou energetickou bariéru, tak zůstává reverzibilně uchycena v sekundárním energetickém minimu, které může vlivem působení proudu kapaliny a Brownovým či vlastním pohybem opustit (Bayoudh *et al.*, 2009; Perni *et al.*, 2014).

Alternativou ke dvoukrokové adhezi je okamžitá ireverzibilní adheze, ke které dochází v případě, že buňka již disponuje velkým množstvím specifických adhezních molekul či struktur, jako jsou například pili. Při této jednokrokové adhezi není buňka ovlivněna energetickou bariérou, protože adheruje na velkou vzdálenost několika set nanometrů (viz Obr. 3). Jednokroková adheze může probíhat například u buňky opouštějící biofilm s cílem založení nové kolonie či u adherované buňky, která byla od povrchu odtržena tekoucí kapalinou (patogenní bakterie v plicích, viz kapitola 5.3 a 5.4); (Hermansson, 1999; Hori a Matsumoto, 2010).



Obr. 3: Jednokroková adheze bakterie na substrát.

Převzato a upraveno z Hori a Matsumoto (2010).

Efektivita bakteriální adheze za určitých podmínek či k určitému povrchu bývá vyjadřována dvěma způsoby. První možností je poměrné vyjádření míry adheze pomocí určení množství buněk přisedlých na jednotku plochy. Při této metodě jsou buňky pozorovány a zdokumentovány pod mikroskopem a následně jsou kvantifikovány (Bayoudh *et al.*, 2009; Garrido *et al.*, 2014). Druhou možností je určení adhezních sil prostřednictvím metody zvané „microjet impingement technique“, která určí sílu adheze i její reverzibilitu pomocí proudu kapaliny strhávajícím buňky od povrchu (Bayoudh *et al.*, 2009).

3. Fyzikálně-chemické teorie popisující počáteční fázi bakteriální adheze

Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekova teorie (DLVO), termodynamický přístup a rozšířená DLVO teorie (EDLVO) jsou fyzikálně-chemické teorie popisující energetickou výhodnost reverzibilní adheze planktonní bakteriální buňky.

Tyto předpovědi adheze vycházejí ze snahy všech systémů o dosažení energetického minima (Perni *et al.*, 2014). Výsledkem jsou energetické křivky znázorňující závislost interakční energie na vzdálenosti od povrchu. Tyto přístupy vycházejí z teorií popisujících interakce koloidních částic, jejichž velikost je o jeden až dva řády menší, než je velikost bakteriální buňky. Fyzikálně chemické teorie ale předpokládají dokonale hladký povrch bakterie a zanedbatelný vliv povrchových molekul usnadňujících adhezi (viz kapitola 5), což může vést k nepřesnostem v predikcích adheze (Hori a Matsumoto, 2010).

3.1. Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekova (DLVO) teorie

Princip DLVO teorie vychází z několika prací zabývajících se stabilitou koloidních částic (Derjaguin a Landau, 1941; Verwey, 1947; Verwey a Overbeek, 1948). Celková adhezí energie (ΔG^{adh}) je sumou London-van der Waalsových přitažlivých sil (ΔG^{vdW}) a sil elektrické dvojvrstvy (ΔG^{dv}), které jsou většinou odpudivé, ve vztahu vyjádřeném následující rovnicí: $\Delta G^{\text{adh}} = \Delta G^{\text{vdW}} + \Delta G^{\text{dv}}$ (Verwey, 1947). Adheze nastane, pokud je celková energie (ΔG^{adh}) záporná (van Oss, 1989).

Velikost ΔG^{dw} je dána velikostí buňky, vzdáleností od substrátu a Hamakerovou konstantou, která shrnuje vlastnosti substrátu a bakterie vycházející z jejich povrchové energie a dielektrických vlastností média, substrátu a buňky (Hermansson, 1999). Van der Waalsovy síly vznikají v důsledku interakcí dipólů atomů a molekul.

ΔG^{dv} vychází z Coulombových interakcí mezi nabitými molekulami. Ve vodném prostředí vzniká kolem nabitého povrchu hromaděním iontů opačného náboje tzv. elektrická dvojvrstva (viz Obr. 4) a její vznik je doprovázen poklesem volné energie (Verwey, 1947). Většinou má odpudivý efekt, jelikož substrát i buňka mívají záporný náboj (Hunter a Liss, 1982; Dickson a Koohmaraie, 1989). Odpudivá síla vzniká vlivem odpudivého osmotického tlaku mezi stejně nabitými ionty dvou překrývajících se dvojvrstev. Velikost elektrické dvojvrstvy je přímo úměrná povrchovému náboji. ΔG^{dv} roste s rostoucím povrchovým potenciálem, teplotou a

dielektrickou konstantou roztoku. ΔG^{dv} klesá s rostoucí vzdáleností od povrchu, iontovou silou a elektrickým nábojem (Hermansson, 1999).

DLVO teorie umožňuje předpověď bakteriální adheze s ohledem na náboj povrchu a bakterie. Vliv náboje na adhezi je ovlivněn pH a iontovou silou.

3.2. Termodynamický přístup

Termodynamický přístup umožňuje předpověď adheze na základě bilance volné energie fázového rozhraní, přičemž předpokládá zanedbatelný účinek elektrického náboje a specifických biochemických vazeb (Busscher *et al.*, 1984).

Změna volné energie na jednotku povrchu (ΔG^{adh}) je vyjádřena jako rovnováha povrchových napětí rozhraní bakterie-substrát (γ_{BS}), bakterie-kapalina (γ_{BK}) a substrát-kapalina (γ_{SK}) dle následující rovnice: $\Delta G^{adh} = \gamma_{BS} - \gamma_{BK} - \gamma_{SK}$. Adheze nastává, pokud přilnutí způsobí záporné hodnoty volné energie (Absolom *et al.*, 1983).

Termodynamický přístup nelze aplikovat v případě, že buňka adheruje z oblasti sekundárního energetického minima, kdy nevzniká nové rozhraní buňka-substrát (van Loosdrecht *et al.*, 1987), protože termodynamický přístup počítá s energií vzniku nového rozhraní buňka-substrát na úkor rozhraní substrát-médium a buňka-médium.

Termodynamický přístup vysvětluje zvýšenou adhezi hydrofobních bakterií na hydrofobní povrchy a hydrofilních bakterií na hydrofilní povrchy (Satou *et al.*, 1988) a je nejjednodušší metodou pro zjištění, zda bakterie může adherovat k určitému substrátu (Perni *et al.*, 2014).

3.3. Rozšířená DLVO teorie (EDLVO)

Van Oss rozšířil DLVO teorii tím, že do ní zahrnul interakce Lewisových kyselin a bází (Van Oss *et al.*, 1986; van Oss, 1989; van Oss, 1995). Celková adhezní energie (ΔG^{adh}) je sumou Lifshitz-van der Waalovy přitažlivé síly (ΔG^{vdW}), odpuzující elektrostatické dvojvrstvy (ΔG^{dv}) a interakcí Lewisových kyselin a bází (ΔG^{AB}) znázorněná následující rovnicí: $\Delta G^{adh} = \Delta G^{vdW} + \Delta G^{dv} + \Delta G^{AB}$. Adheze nastane, pokud je celková energie (ΔG^{adh}) záporná (van Oss, 1989).

ΔG^{vdW} zahrnuje tři nepolární elektrodynamické dipólové interakce s dlouhým dosahem: London (disperze), Debye (indukce) a Keesom (orientace) síly (Van Oss *et al.*, 1986; van Oss, 1989).

ΔG^{AB} je dána polárními koordinačně-kovalentními interakcemi zvanými vodíkové můstky (Van Oss *et al.*, 1986 ; Liu a Zhao, 2005). Dle Lewisovy definice je kyselina akceptorem a báze donorem volného elektronového páru, takže H^+ je kyselinou a OH^- bází. Interakce Lewisovy kyseliny a báze je definována jako sdílení elektronového páru, k čemuž u vodíkového můstku dochází. Hydrofobní/hydrofilní charakter povrchů (viz kapitola 4.7) je dán charakterem donoru elektronů (van Oss, 2008).

V závislosti na charakteru povrchu vznikají přitažlivé hydrofobní interakce nebo nastává odpudivý efekt hydratace (Bayouhd *et al.*, 2009). Vliv interakcí Lewisových kyselin a bází je 10-100x silnější (van Oss, 1989) než van der Waalsovy a elektrostatické síly, ale má krátký dosah, do 5 nm (Bos a Busscher, 1999). S rostoucí vzdáleností od povrchu se velikost ΔG^{AB} prudce snižuje (Van Oss *et al.*, 1986).

Hydrofobní interakce mezi dvěma nepolárními skupinami ve vodě jsou důsledkem energie vodíkové vazby z koheze molekul vody v okolí skupin. Efekt hydratace je dán hydrofilní vrstvou a může být způsobena například adsorpcí hydrofilních proteinů k substrátu, kde poté tlumí adhezi hydrofobních buněk k substrátu (van Oss, 1995). Avšak vliv těchto interakcí se nemusí plně projevit, jelikož se bakterie kvůli svým povrchovým útvarům nemusí dostatečně přiblížit k povrchu a celková styčná plocha je pak malá (Bos a Busscher, 1999).

3.4. Shrnutí a aplikace teorií

DLVO teorie je založena na překrývání vlivu elektrostatických a van der Waalsových sil. Předpověď adheze pomocí DLVO je často nepřesná, protože tato teorie nezapočítává vliv hydrofobních/hydrofilních ani sterických interakcí (Bayouhd *et al.*, 2009).

Termodynamický přístup zahrnuje hydrofobní/hydrofilní interakce, ale většinou je kvůli nedostatečnému popisu elektrostatických interakcí rovněž nepřesný (Sharma a Hanumantha Rao, 2003).

EDLVO teorie je kombinací termodynamického přístupu a DLVO teorie (Bayouhd *et al.*, 2009). Mnoho autorů se shoduje, že EDLVO teorie predikuje adhezi a její reverzibilitu přesněji než klasická DLVO teorie a termodynamický přístup (Sharma a Hanumantha Rao, 2003; Bayouhd *et al.*, 2009; Farahat *et al.*, 2009).

Předpověď adheze pomocí EDLVO je zatím nejpřesnější, ale i tato teorie občas v konkrétních případech nestačí k popisu skutečného stavu. Může to být z několika důvodů, mezi něž patří např. předpoklad inertního povrchu (Bayouhd *et al.*, 2009), specifické interakce mezi povrchovými polymery (Yoshihara *et al.*, 2015), heterogenita povrchu, proud kapaliny a hrubost povrchu.

Pomocí předpovědí bakteriální adheze a agregace je možné nastavit podmínky pokusu tak, aby změna jednoho parametru pozastavila či urychlila adhezi buněk (viz kapitola 4.3).

Porovnáním různých teoretických předpovědí lze určit význam jednotlivých sil ovlivňujících adhezi. V případě odchylek od předpovědí lze předpokládat, že bakterie k adhezi využívá povrchové útvary tvořené přímo za účelem adheze.

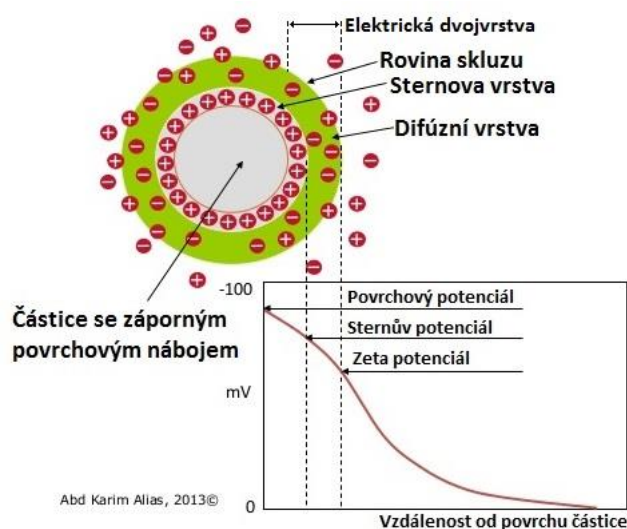
4. Faktory prostředí ovlivňující bakteriální adhezi

4.1. Vliv povrchového náboje bakterií na jejich adhezi k povrchům

Elektrostatické interakce dvou stejně nabitých povrchů způsobují vzájemné odpuzování (Sun *et al.*, 2015). Povrchový náboj bakterie je dán povrchovými útvary a polymery a je závislý na pH (viz kapitola 4.3). Náboj povrchu má většinou odpudivý efekt, protože za neutrálního pH má většina substrátů i buněk záporný náboj (Hunter a Liss, 1982; Dickson a Koohmaraie, 1989). Některé druhy bakterií, jako *Stenotrophomonas maltophilia*, mají v neutrálním pH kladný náboj buňky (Jucker *et al.*, 1996). Například grampozitivní *Bacillus subtilis* má zápornější náboj než gramnegativní bakterie, což má za následek slabší adhezi této bakterie na záporně nabitě povrchy, jako je například nerezová ocel (Harimawan *et al.*, 2011).

Efektivní velikost náboje povrchu je vyjádřena jako zeta potenciál. Zeta potenciál vychází z elektrické dvojvrstvy a je ovlivněn řadou faktorů, zejména iontovou silou a pH roztoku.

Elektrická dvojvrstva (viz Obr. 4) se tvoří ve vodním prostředí kolem každé nabitě částice, protože dochází k přitahování iontů opačného náboje směrem k částici. Na povrchu částice se vytváří stabilní uspořádaná vrstva opačně nabitých iontů, která se označuje jako Sternova vrstva. Tyto ionty neutralizují povrchový náboj částice pouze částečně, protože jsou obklopené molekulami vody, které brání kompletnímu pokrytí povrchu. Zbývající náboj přitahuje vzdálenější ionty, čímž dává vzniknout méně uspořádané difúzní vrstvě. Difúzní vrstva je ohraničena tzv. rovinou skluzu, za kterou nemá náboj částice již vliv na další ionty. Na rovině skluzu je také definován zeta potenciál jako potenciálový rozdíl mezi disperzním médiem a stacionární vrstvou kapaliny přichycené k částici.



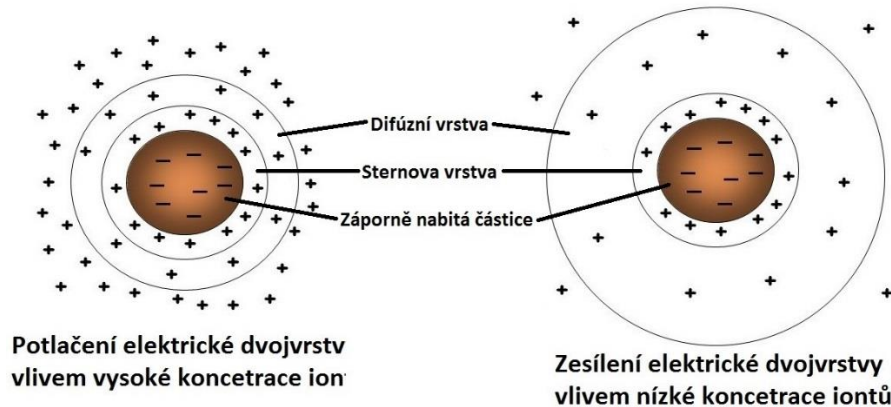
Obr. 4: Znázornění elektrické dvojvrstvy a zeta potenciálu.

Převzato a upraveno z: <http://image.slidesharecdn.com/emulsionstability-130803053556-phpapp02/95/emulsionstability-10-638.jpg>

4.2. Vliv iontové síly na bakteriální adhezi

Iontová síla je nejnázne ovlivnitelný parametr a její vliv na adhezi je potvrzen množstvím studií. Iontová síla je sumou všech iontů v roztoku a závisí na koncentraci elektrolytu i na mocenství iontů v něm obsažených a určuje velikost elektrické dvojvrstvy (viz Obr. 5).

Vysoká iontová síla způsobí hromadění náboje u povrchu, což vede k potlačení elektrické dvojvrstvy (Verwey, 1947). Při nízké iontové síle nabývá zeta potenciál vysokých hodnot; odpuzování buňky a substrátu pak vede ke snížení reverzibilní adheze (Marshall *et al.*, 1971).

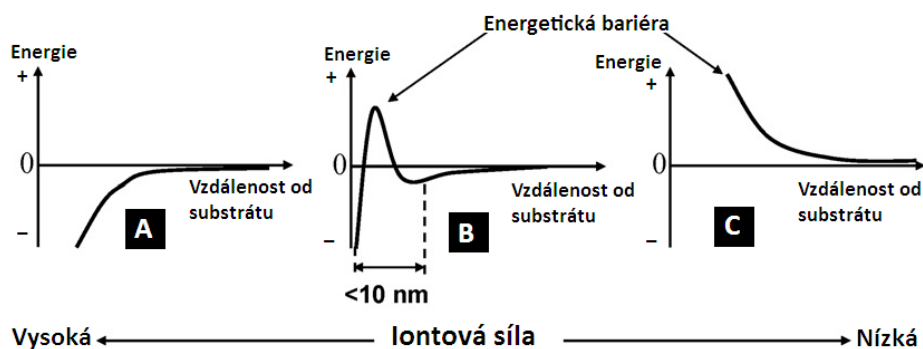


Obr. 5: Vliv iontové síly na velikost elektrické dvojvrstvy.

Převzato a upraveno z http://images.slideplayer.com/13/4142664/slides/slide_73.jpg

Dvoukroková bakteriální adheze nastává při střední iontové síle, kdy vlivem van der Waalsových sil vzniká primární a sekundární energetické minimum. Energetická minima jsou oddělena energetickou bariérou způsobenou elektrickou dvojvrstvou (Verwey, 1947).

Rostoucí iontová síla vede k nárůstu bakteriální adheze, protože vyšší iontová síla způsobuje pokles záporného náboje bakterie a substrátu (Garrido *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015). Snížením záporného náboje dojde k odstranění energetické bariéry (viz Obr. 6). Například zvýšení iontové síly z 10 mM na 160 mM NaCl vede k desetinásobnému zvýšení adheze *Escherichia coli* ke sklu (Yoshihara *et al.*, 2015).



Obr. 6: Vliv iontové síly na celkovou interakční energii.

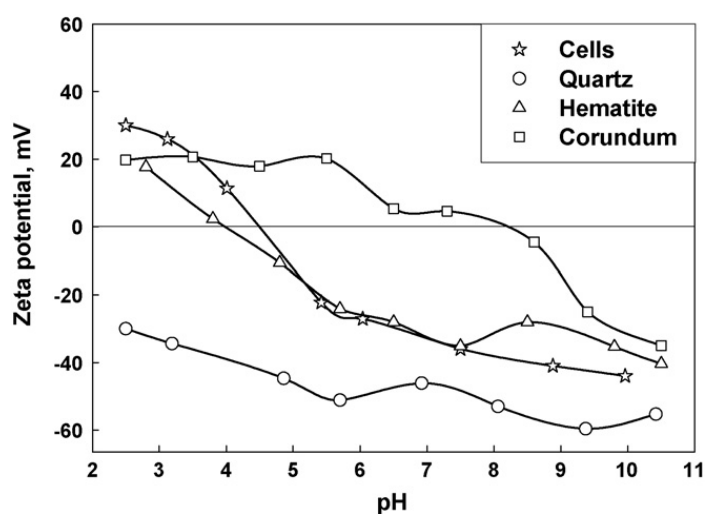
Při vysoké iontové síle je odpudivá síla elektrické dvojvrstvy zanedbatelná (A). Při běžných hodnotách iontové síly vzniká vlivem odpudivých sil elektrické dvojvrstvy energetická bariéra (B). Energetická bariéra se při nízkých iontových silách stává nepřekonatelně velkou (C). Převzato a upraveno z Hori a Matsumoto (2010).

4.3. Vliv pH na bakteriální adhezi

Hodnota pH také ovlivňuje povrchový náboj bakterie. Alkalické pH způsobuje deprotonaci záporně nabitých karboxylových a fosfátových skupin na povrchu buněčných biopolymerů, čímž narůstá záporný náboj bakterie (Garrido *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015). Rostoucí pH proto vede ke snížení bakteriální adheze (Farahat *et al.*, 2009). Naopak v kyselém prostředí dochází k protonaci karboxylových a fosfátových skupin, čímž získává buňka *E. coli* kladný povrchový náboj, který adhezi podporuje (Farahat *et al.*, 2009; Garrido *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015).

Náboj většiny substrátů a buněk je při neutrálním pH záporný (Hunter a Liss, 1982; Dickson a Koohmaraie, 1989). Izelektrický bod je pH, při kterém je povrchový náboj nulový. Izelektrický bod je pro *E. coli* při pH 4,5, pro křemen je při pH 2,0, (Farahat *et al.*, 2009) pro sklo je při pH 2,1 a pro běžné plasty je kolem pH 4 (Lameiras *et al.*, 2008). Některé bakteriální kmeny ale mají v neutrálním pH kladný náboj (Jucker *et al.*, 1996).

Praktickým využitím vlivu pH na bakteriální adhezi je bio-flotace křemene ze směsi křemen-hematit-korund (vločky o velikosti 78-105 μm) prostřednictvím *Escherichia coli* bez nutnosti přidávat další činidla. Při pH <4,3 mají buňky *E. coli*, hematit a korund kladný náboj, ale křemen má náboj záporný (viz Obr. 7). V tomto pH tedy dochází k selektivní adhezi *E. coli* ke křemenu, od ostatních minerálů je bakterie elektrostaticky odpuzována. Adheze hydrofobní *E. coli* na hydrofilní křemen způsobí, že křemen získá hydrofobní charakter, což umožní jeho izolaci u hladiny (Farahat *et al.*, 2009).



Obr. 7: Vliv pH na zeta potenciál buněk/částic.

Měřen byl zeta potenciál buněk *Escherichia coli* (Cells) a vloček (směs částic o velikosti 5 až 38 μm) křemene (Quartz), hematitu (Hematite) a korundu (Corundum). Převzato z Farahat *et al.* (2009).

4.4. Vliv hydrofobicity povrchu na bakteriální adhezi

Hydrofobicita buňky a substrátu má významný vliv na bakteriální adhezi, protože hydrofobní interakce jsou nejsilnějšími nekovalentními interakcemi. Molekuly vody nemohou tvořit vodíkové můstky s hydrofobním povrchem, takže dochází k přeuspořádání molekul vody kolem hydrofobního povrchu, což je energeticky náročné. Adheze k hydrofobnímu povrchu je naopak energeticky výhodná, neboť při ní dochází k poklesu entropie, míry neuspořádanosti systému (Yoda *et al.*, 2014).

Adheze bakterií k hydrofobním povrchům se zvyšuje s rostoucí hydrofobicitou povrchu buňky, protože hydrofobní skupiny odstraňují vodní film mezi interagujícími povrchy (Harimawan *et al.*, 2011).

Gramnegativní bakterie mají více hydrofobní povrch než bakterie grampozitivní a lépe adherují na hydrofobní povrchy, jako je nerezavějící ocel (Harimawan *et al.*, 2011) a ITO (směs oxidu cínitého a inditého), než na povrchy hydrofilní, jako je sklo (Bayoudh *et al.*, 2009).

Příkladem praktického využití principu hydrofobních interakcí je zpracování odpadní vody. K aktivovaným hydrofobním vločkám nasedají hydrofobní bakterie mnohem lépe než ty hydrofilní, což výrazně ovlivňuje efektivitu procesu (Zita a Hermansson, 1997).

4.5. Vliv teploty prostředí na bakteriální adhezi

Vliv teploty prostředí na bakteriální adhezi je druhově specifický, takže není možné jeho zobecnění.

Například *Pseudomonas fluorescens* má optimální růstovou teplotu 28°C. Avšak nejvyšší míru adheze vykazuje při teplotě 17°C, kdy je její povrch nejméně hydrofilní (Hemery *et al.*, 2006).

U *Listeria monocytogenes* byly pozorovány teplotou indukované strukturní změny povrchových biopolymerů. Nejvyšší míru adheze vykazuje tato bakterie při své optimální růstové teplotě 30°C, kdy jsou její povrchové biopolymery dlouhé a husté. Při nižší i vyšší teplotě se biopolymery zkracují a přestávají být nahloučené a buňky adherují méně (Gordesli a Abu-Lail, 2012).

4.6. Vliv hrubosti a topografie povrchu substrátu na bakteriální adhezi

Bakteriální adheze k substrátům je mimo jiné ovlivněna hrubostí a topografií jeho povrchu, přičemž z tohoto hlediska relevantní jsou nerovnosti v řádech mikrometrů a nanometrů (Hsu *et al.*, 2013).

Konkrétní velikost a tvar nerovností, které jsou schopny ovlivnit míry adheze, záleží na bakteriálním druhu a typu materiálu, takže není možné vyvodit obecný závěr (Hsu *et al.*, 2013; Yoda *et al.*, 2014). Například u oxiní, titanové slitiny a nerezové oceli, má hrubost pod 30 nm pozitivní vliv na adhezi *Staphylococcus epidermidis* (Yoda *et al.*, 2014). Jiná studie zaznamenala zvýšení adheze *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* na titanový povrch s hrubostí do 20 nm, ale její inhibici při větší hrubosti (Singh *et al.*, 2011).

Některé studie ukazují posílení bakteriální adheze k titanu a materiálu kontaktních čoček při povrchové hrubosti v řádech mikrometrů (Badihi Hauslich *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2015), jiné studie ukazují posílení bakteriální adheze k titanu při povrchové hrubosti v řádech nanometrů (Truong *et al.*, 2010). Avšak existují studie popisující naopak snížení adheze k titanu s hrubostí 35 nm (Amoroso *et al.*, 2006).

Byly pozorovány změny morfologie bakterií adherujících k povrchům s různou topografií. Bakterie adherovaná k hladkým povrchům disponuje menším množstvím povrchových biopolymerů (Hsu *et al.*, 2013) a zároveň vykazuje větší produkci extracelulárních polymerických substancí (Truong *et al.*, 2010) než bakterie adherované k povrchům s nanopóry.

Buňky mění svou orientaci vůči povrchu tak, aby maximalizovaly kontakt s povrchem, čímž nastává silnější a stabilnější adheze (Hsu *et al.*, 2013). Někteří autoři očekávají vyšší míru adheze k hrubším povrchům, protože hrubý povrch má větší plochu a prohlubně, které mohou bakterie chránit před smykovou silou (Hsu *et al.*, 2013; Yoda *et al.*, 2014).

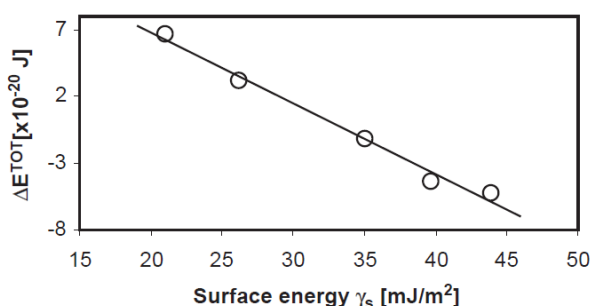
Ovšem hrubost povrchu není jediným faktorem ovlivňujícím výsledky těchto pokusů. U hydrofilní bakterie *Staphylococcus epidermidis* byla pozorována snížená míra adheze k hydrofobnímu Co-Cr-Mo (Cerca *et al.*, 2005), ačkoli měl míru hrubosti, která u jiných povrchů adhezi posílila (Yoda *et al.*, 2014).

4.7. Vliv povrchové energie na bakteriální adhezi

Povrchová energie charakterizuje fyzikálně-chemické vlastnosti povrchů, vyjadřuje míru přitahování bakterie a substrátu. Je uváděna jako volná energie na jednotku plochy ($\gamma_s = [\text{mJ/m}^2]$) a je sumou všech intermolekulárních sil působících na povrchu materiálu, jako jsou van der Waalsovy síly (γ^{vdW}) a interakce Lewisových kyselin a bází (γ^{AB}). Komponenta Lewisových kyselin a bází je složena ze dvou částí, donoru (γ^+) a akceptoru (γ^-) elektronů.

Dle van Osse (2008) může charakter donoru elektronů a hodnota γ^- sloužit jako hrubý ukazatel hydrofobicity/hydrofilicity povrchů. Silně hydrofobní (nepolární) materiály mívají menší hodnoty γ^- (pod $28,3 \text{ mJ/m}^2$), zatímco silně hydrofilní mívají vysoké hodnoty γ^- (nad $28,3 \text{ mJ/m}^2$). Hodnoty volné energie akceptoru elektronů (γ^+) jsou u většiny hydrofobních i hydrofilních materiálů nulové či velmi malé (u bakterií bývá $\gamma^+ \approx 1,3 \text{ mJ/m}^2$ (Farahat *et al.*, 2009)).

Interakční (adhezí) energie klesá s rostoucí povrchovou energií substrátu (viz Obr. 8), protože roste přitahování buňky k substrátu. Bakteriální adheze je preferována při nízkých či záporných hodnotách interakční energie, takže míra bakteriální adheze roste s rostoucí povrchovou energií substrátu (Liu a Zhao, 2005).



Obr. 8: Závislost celkové interakční energie (E^{TOT}) na povrchové energii (γ_s).

Převzato z Liu a Zhao (2005).

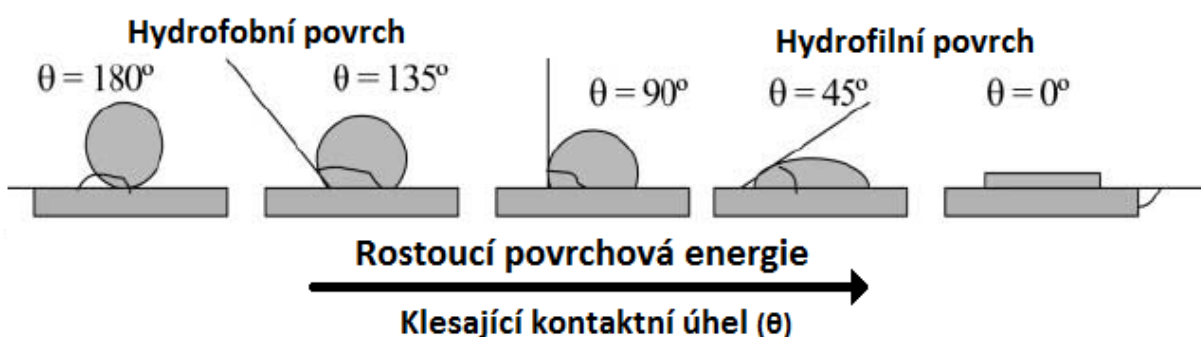
Povrchová energie bakteriální buňky je 70 mJ/m^2 (Busscher *et al.*, 1984; Sharma a Hanumantha Rao, 2002). Substrát s nižší povrchovou energií je pro bakteriální adhezi hůře dostupný (Busscher *et al.*, 1984).

Nízkoenergetické povrchy mají výborné antiadhezivní vlastnosti. Například při inkorporaci PTFE (polytetrafluorethylen) do matrix Ni-P, což je běžné protikorozní pokrytí, dojde ke snížení povrchové energie na $21\text{--}26 \text{ mJ/m}^2$. Povrch pokrytý Ni-P PTFE způsobí snížení adheze v porovnání s nerezovou ocelí o 95% (Liu a Zhao, 2005).

Povrchová energie ovlivňuje růst i u eukaryotických buněk. Hydrofilní substrát s vyšší povrchovou energií podporuje růst osteoblastů i depozici minerálů do kosti více než substrát s nízkou povrchovou energií (Lim *et al.*, 2008).

Experimentálně se hydrofobicita/hydrofilicita povrchů zjišťuje například měřením kontaktního úhlu kapaliny a substrátu (viz Obr. 9). Hydrofilní povrchy mají kontaktní úhel $\theta \leq 90^\circ$, hydrofobní povrchy mají kontaktní úhel $\theta 90-180^\circ$.

Youngova rovnice využívá změřeného kontaktního úhlu ke zjištění povrchové energie: $\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L * \cos\theta$, kde γ_S je volná povrchová energie substrátu, γ_{SL} je energie fázového rozhraní kapaliny a substrátu, γ_L je povrchové napětí kapaliny a θ je kontaktní úhel kapaliny.



Obr. 9: Vztah mezi kontaktním úhlem a povrchovou energií.

Měřen je úhel místě kontaktu kapky vody a testovaného substrátu. Kontaktní úhel klesá s rostoucí povrchovou energií. Kontaktní úhel hydrofobních povrchů je 90 až 180° , kontaktní úhel hydrofilních povrchů je 0 až 90° .

Převzato a upraveno z Garai *et al.* (2005).

4.8. Vliv kondiciující vrstvy na bakteriální adhezi

Kondiciující vrstva (z angl. conditioning film) vzniká vlivem adsorpce organických molekul rozpuštěných ve vodném prostředí na povrch substrátu. Důsledkem jejího vzniku jsou změny povrchového napětí, náboje, hrubosti a hydrofobicity substrátu, které mohou významně ovlivňovat počáteční adhezi bakterií a následný vznik biofilmu (Hwang *et al.*, 2012; Hwang *et al.*, 2013). Vliv kondiciující vrstvy závisí na iontové síle a typu molekul, které ji tvoří. Může posilovat i oslabovat počáteční adhezi buněk (Hwang *et al.*, 2012).

Vznik kondiciujících vrstev má celou řadu praktických dopadů. Například kondiciující vrstva absorbovaná z krve usnadňuje adhezi bakterií v žilní kanyle, jejíž kontaminace poté může způsobit závažné infekce v krevním řečišti (Murga *et al.*, 2001). Ve vodních systémech a potrubích zase hrají kondiciující vrstvy významnou roli při jejich zanášení, tzv. biofoulingu (Hwang *et al.*, 2012).

Ke tvorbě kondiciující vrstvy dochází také na vnitřním povrchu uretrálního katetru, užívaného při obstrukci v močovodu, což vede ke zvýšení adheze bakterií, které poté mohou způsobit infekce močových cest i poškození materiálu cévky (Tieszer *et al.*, 1998). Kondiciující vrstva je také zodpovědná za vznik zubního kazu, protože umožňuje adhezi bakterií v ústní dutině (Busscher *et al.*, 2010).

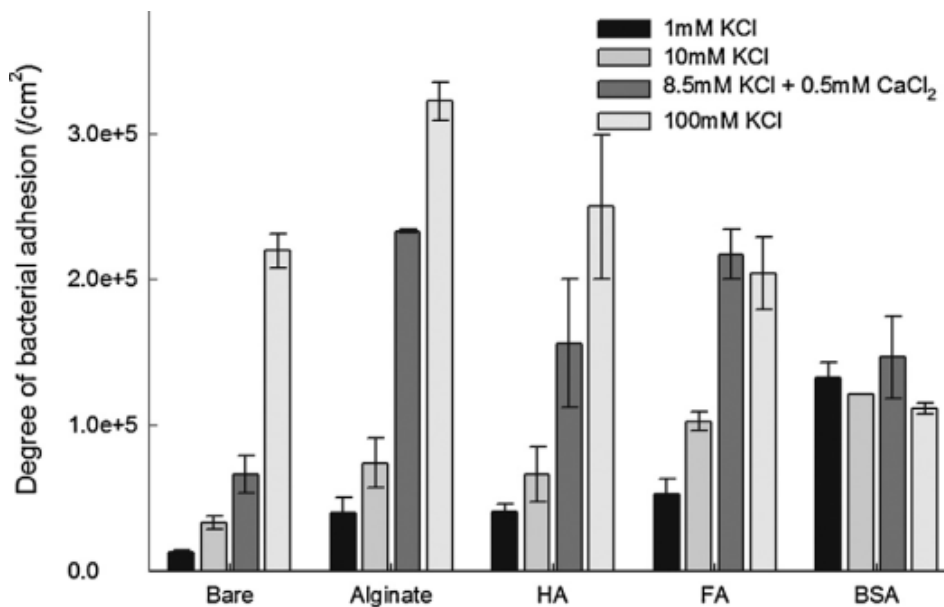
Průběh bakteriální adheze na kondiciující vrstvy není závislý na tom, zda bakterie produkuje extracelulární polymery (Hwang *et al.*, 2012; Hwang *et al.*, 2013).

Při zkoumání vlivu kondiciujících vrstev na bakteriální adhezi se používají modelové EPS (viz Obr. 10): alginát, jakožto běžná polysacharidová složka matrix biofilmu, hovězí sérový albumin (BSA), jakožto krevní protein s vysokou adsorpcí a huminové látky (huminová a fulvonová kyselina), jakožto zástupce hlavních uhlíkatých látek v půdě (Hwang *et al.*, 2013).

Alginát je lineární polysacharid (kopolymer mannuronové a guluronové kyseliny) a obsahuje hojné karboxylové skupiny (Mi a Elimelech, 2008). Vlastnosti alginátových filmů se mění v závislosti na iontové síle. Při nízké iontové síle (<30 mM) jsou fluidní a vlivem elektrostatického odpuzování zaujímají kartáčovou strukturu. S nárůstem iontové síly (cca 100 mM) se alginátová vrstva stlačuje vlivem stáčení alginátů, až vytvoří tuhou hladkou strukturu (de Kerchove a Elimelech, 2007).

Iontová síla ovlivňuje konformaci polymerů tvořících kondiciující vrstvy, čímž může měnit jejich vlastnosti (Hwang *et al.*, 2013). S rostoucí iontovou silou narůstá adheze k alginátu, mírně narůstá adheze k huminovým látkám (Hwang *et al.*, 2013; Garrido *et al.*, 2014). Alginát má nejvýraznější účinek při nižších iontových silách, při vysokých iontových

silách klesá rozdíl v množství buněk adherovaných k alginátu a sklu (Garrido *et al.*, 2014). Hovězí sérový albumin posiluje adhezi při nízkých iontových silách, ale při vyšších iontových silách adhezi snižuje sterické odpuzování mezi albuminem a bakteriemi (Hwang *et al.*, 2012; Hwang *et al.*, 2013).



Obr. 10: Míra adheze (Degree of bacterial adhesion) *Pseudomonas aeruginosa* k různým substrátům.

Sledována byla adheze ke sklu (bare) a sklu pokrytém alginátem (Alginate), huminovou (HA) a fulvonovou (FA) kyselinou a hovězím sérovým albuminem (BSA) při různých iontových silách. Převzato z Hwang *et al.* (2013).

Dalším faktorem ovlivňujícím adhezi bakterií k některým kondiciujícím vrstvám je přítomnost vápenatých iontů. Vápenaté ionty posilují adhezi k alginátu a huminovým látkám (Hwang *et al.*, 2013).

Přítomnost vápenatých iontů způsobí zdvojnásobení adhezní síly k alginátu, protože dojde ke vzniku gelové struktury. Vápenaté kationty tvoří gelovou strukturu tím, že příčně propojí karboxylové skupiny sousedních alginátových řetězců (Mi a Elimelech, 2008; Garrido *et al.*, 2014). Přítomnost vápenatých iontů nezvyšuje adhezi bakterií k BSA, protože BSA nedisponuje dostatečným množstvím karboxylových skupin. Přítomnost vápenatých iontů posiluje adhezi k huminovým kyselinám méně, než posiluje adhezi k alginátu, protože huminové kyseliny nedokáží tvořit gely (Mi a Elimelech, 2008).

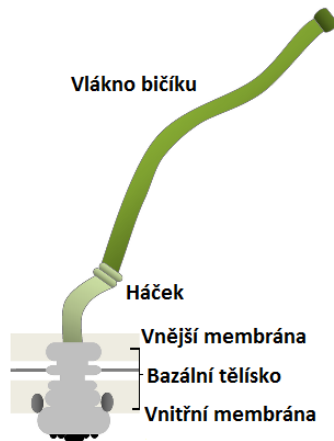
Jako kondiciující vrstva se chová i vrstva adherovaných bakterií. Substrát pokrytý bakteriemi přejímá jejich povrchové vlastnosti, například při pH < 4,3 adheruje na křemen dostatečné množství hydrofobních buněk, takže dojde ke změně hydrofilního charakteru křemenu na hydrofobní (viz kapitola 4.3); (Farahat *et al.*, 2009).

5. Bakteriální povrchové útvary sloužící k adhezi

Bakteriální adheze k povrchům není dána jen fyzikálně-chemickými vlastnostmi okolního prostředí, ale z velké míry záleží i na povrchových polymerech buňky (Jucker *et al.*, 1997). Tyto polymery zodpovídají za interakce bakterie a povrchu na větší vzdálenost (100-1000 nm), často zprostředkovávají počáteční kontakt s povrchem (Houry *et al.*, 2010) a překonání energetické bariéry (Yoshihara *et al.*, 2015). K adhezi slouží molekuly a útvary buněčného povrchu, které se obecně nazývají adheziny. Bičíky, pili, lipopolysacharidy a další útvary buněčného povrchu jsou také důvodem toho, proč se skutečná bakteriální adheze odchyluje od předpovědí formulovaných pomocí fyzikálně-chemických teorií.

5.1. Bakteriální bičík

Bičík (viz Obr. 11) se vyskytuje u řady gramnegativních a grampozitivních bakterií. U *Escherichia coli* je 10 μm dlouhý, 20 nm široký a je složen z více jak 20 strukturních. V cytoplazmatické membráně se nachází bazální tělísko, které slouží k ukotvení a rotaci bičíku. Bičík je ve většině případů roztáčen gradientem protonů. Háček spojuje bazální tělísko a vlákno bičíku. Vlákno bičíku je duté a je tvořeno z molekul flagelinu.



Obr. 11: Schématické znázornění bičíku gramnegativních bakterií.

Převzato a upraveno z Haiko a Westerlund-Wikström (2013).

Bakterie mohou mít bičík jeden, umístěný na pólu buňky, nebo více bičíků (Zgair a Chhibber, 2011). Bičík slouží bakterii k pohybu, adhezi a hraje roli i při vzniku biofilmu.

Pohyb pomocí bičíku umožňuje bakteriím dosáhnout povrchu vhodného pro adhezi (Houry *et al.*, 2010) a překonání odpuzivých sil (Friedlander *et al.*, 2013). Bičík u *Pseudomonas aeruginosa* umožňuje buňce aktivní pohyb dosahující rychlosti až 60 $\mu\text{m/s}$ (Conrad *et al.*, 2011).

Bičík je také nezbytný pro adhezi řady patogenních bakterií k epitelu hostitele (Duan *et al.*, 2012). Například bičík *Stenotrophomonas maltophilia* obsahuje adheziny, které se specificky váží na cukry mucinu, glykoproteinové složky ochranné hlenové vrstvy v dýchací soustavě. (Zgair a Chhibber, 2011)

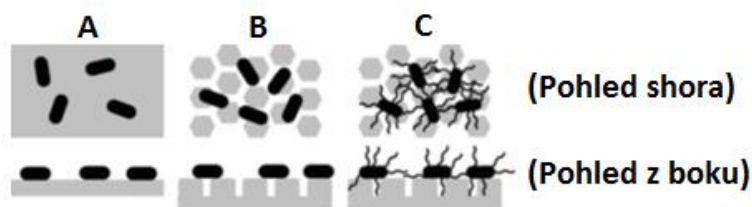
Kromě specifické adheze k epitelům prostřednictvím adhezínů slouží bičík i k nespecifické adhezi k povrchům. Bičík má ale slabou afinitu k povrchům, protože jinak by mohlo docházet k nechtěnému přichycení buněk při plavání podél povrchu (Friedlander *et al.*, 2013). Vliv bičíku na nespecifickou adhezi je tedy výrazný jen v přítomnosti energetické bariéry snižující míru adheze (Haznedaroglu *et al.*, 2010), což by mohlo být důvodem, proč někteří autoři nepozorovali vliv bičíku a motility na počáteční fáze adheze (Yoshihara *et al.*, 2015). Adheze prostřednictvím bičíku posiluje odolnost bakterie vůči odtržení od povrchu (Haznedaroglu *et al.*, 2010; Yoshihara *et al.*, 2015).

Vliv bičíku na adhezi však není vždy posilující, jeho vliv záleží na vlastnostech povrchu (Houry *et al.*, 2010) i prostředí (de Kerchove a Elimelech, 2007). Bičík může snižovat míru adheze k hydrofilním povrchům (Friedlander *et al.*, 2015). U *Bacillus cereus* způsobuje bičík snížení adheze ke sklu, protože znemožňuje vazbu pili na substrát (Houry *et al.*, 2010).

Bičík může měnit povrchové vlastnosti bakterie. Přítomnost hydrofilního bičíku snižuje hydrofobicitu bakterie a také může způsobovat sterické odpuzování od substrátu (de Kerchove a Elimelech, 2007). Při nízkých iontových silách bylo pozorováno snížení adheze *Pseudomonas aeruginosa* k alginátu, protože docházelo ke sterickému odpuzování bičíku a kartáčové struktury alginátové vrstvy (Garrido *et al.*, 2014).

Bičík slouží k adhezi u řady bakterií: *Salmonella enterica* (Haznedaroglu *et al.*, 2010), *Pseudomonas aeruginosa* (de Kerchove a Elimelech, 2007), *Stenotrophomonas maltophilia* (Zgair a Chhibber, 2011) a *Campylobacter jejuni* (Svensson *et al.*, 2014).

Bičík *Escherichia coli* umožňuje i uchycení k povrchu s nepříznivou topografickou strukturou. Při adhezi na substrát se štěrbinami menšími, než je velikost buňky, slouží bičíky k průniku do těchto štěrbin, kde vytváří hustou vláknitou síť. Tato síť z bičků a sekretovaných proteinů vytvoří kondiciující vrstvu, která umožní adhezi dalších buněk (Friedlander *et al.*, 2013), (viz Obr. 12).

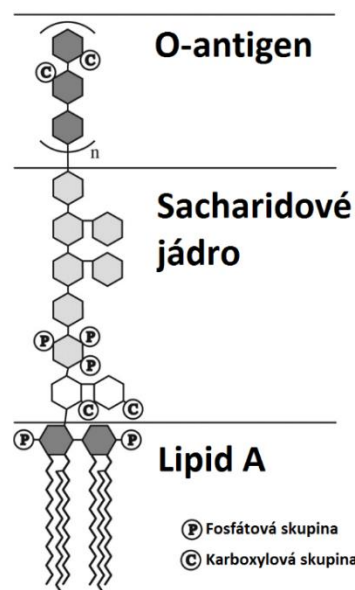


Obr. 12: Bičik zvyšující míru adheze na substrát se štěrbinami.

A) Adheze bezbičkatých bakterií k rovnému substrátu. B) Snížená adheze bezbičkatých bakterií ke strukturovanému povrchu. C) Bičiky bakterií adhezi ke strukturovanému povrchu tvoří vláknitou síť, která umožňuje adhezi dalších buněk. Převzato a upraveno z Friedlander *et al.* (2013).

5.2. Lipopolysacharidy

Lipopolysacharidy jsou hlavní složkou vnější membrány gramnegativních bakterií. Jsou složeny z lipidu A, oligosacharidového jádra a O-antigenu (viz Obr. 13). Lipid A kotví lipopolysacharid ve vnější membráně a obsahuje fosfátové skupiny, které se podílejí na záporném náboji bakterie (Strauss *et al.*, 2009). O-antigen je složen z několika desítek oligosacharidových podjednotek a jeho konkrétní struktura je velmi variabilní. Délka lipopolysacharidových molekul je 20 až 40 nm a závisí na délce O-antigenu (Strauss *et al.*, 2009). Lipopolysacharidy zodpovídají za interakce na krátkou vzdálenost od povrchu (do 40 nm).



Obr. 13: Struktura lipopolysacharidu.

Převzato a upraveno z Schneck *et al.* (2009).

Vazba lipopolysacharidu k substrátu je dána přítomností O-antigenů, které tvoří vodíkové můstky s hydroxylovými skupinami substrátu (Jucker *et al.*, 1997; Strauss *et al.*, 2009). Jednotlivé vazby jsou slabé, ale jejich účinek se sčítá v rámci celého polymeru, takže afinita O-antigenu k povrchu roste s jeho délkou (Jucker *et al.*, 1997; Abu-Lail a Camesano, 2003; Strauss *et al.*, 2009). Avšak bylo pozorováno i snížení adheze *Burkholderia cenocepacia* k epitelům v důsledku přítomnosti O-antigenu (Saldias *et al.*, 2009).

Kromě adheze k substrátům má O-antigen funkci ochrany před fagocytózou makrofágy (Saldias *et al.*, 2009).

5.3. Pili gramnegativních bakterií

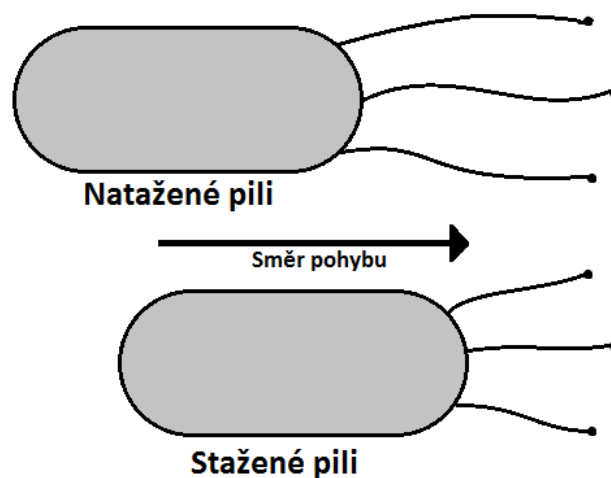
Pili jsou krátké výběžky bakteriálního povrchu. U gramnegativních bakterií jsou nejvíce prozkoumané tzv. pili IV. typu (Kang *et al.*, 2007). Jsou dlouhé 1–2 μm a široké 5–8 nm (Beaussart *et al.*, 2014). Jsou ohebné a vydrží velkou míru fyzikálního stresu (Kang *et al.*, 2007), např. pilus *Pseudomonas aeruginosa* vydrží sílu velkou až 250 pN (Beaussart *et al.*, 2014). Pili mají hydrofobní charakter (Honda *et al.*, 1984; Allison *et al.*, 2015) a silně se váží na hydrofobní substráty (Beaussart *et al.*, 2014).

Pili zodpovídají za adhezi k substrátům, agregaci buněk (Conrad *et al.*, 2011) a následnou tvorbu biofilmu (Bahar *et al.*, 2009; Beaussart *et al.*, 2014). Jsou důležitým faktorem patogenity u živočišných (Beaussart *et al.*, 2014) i rostlinných (Bahar *et al.*, 2009) patogenů, protože zprostředkovávají adhezi k buňkám hostitele.

Pilus gramnegativních bakterií je tvořen molekulami majoritního pilinu, které jsou k sobě vázány nekovalentními interakcemi. Piliny mají hydrofobní jádro, které pili dodává mechanickou odolnost (Beaussart *et al.*, 2014). Kromě majoritních pilinů se na pili nacházejí i minoritní piliny, adheziny. Adheziny zprostředkovávají vazbu na různé substráty, sousední buňky i na epitel hostitele.

Adhezin *Pseudomonas aeruginosa* specificky váže glykolipidy epiteliálních buněk (Beaussart *et al.*, 2014). Protein PilA u *Pseudomonas aeruginosa* zodpovídá za vazbu k nerezové oceli i k dalším biotickým i abiotickým povrchům (Giltner *et al.*, 2006). Adhezin FimH slouží ke specifické vazbě *Escherichia coli* na povrchové struktury obsahující D-manózu, což jí umožňuje kolonizaci sliznic tlustého střeva (Krogfelt *et al.*, 1990). Pili IV. typu (neurčený adhezin) slouží k adhezi enterotoxické *E. coli* na specifický receptor střevního epitelu (Mazariego-Espinosa *et al.*, 2010). Protein PilC umožňuje specifickou adhezi *Neisseria gonorrhoeae* a *Neisseria meningitidis* ke střevnímu epitelu. PilC vykazuje definovaný buněčný a tkáňový tropismus, protože se váže pouze na epiteliální a endoteliální buňky, ale ne na T-buňky či fibroblasty. Toto zjištění popírá předchozí domněnku, že protein CD46, sloužící k ochraně všech buněk hostitele před komplementem, slouží i jako receptor pro pili IV. typu (Merz *et al.*, 1999; Kirchner a Meyer, 2005).

U *Pseudomonas aeruginosa* umožňuje krátkodobá adheze prostřednictvím pili IV. typu přepnutí mezi planktonní a adherovanou fází životního cyklu bakterie (Conrad *et al.*, 2011). Kromě adheze souvisí pili IV. typu i s pohybem. Pili IV. typu umožňují unikátní formy pohybu: „twitching“, „crawling“ a „walking“ (Conrad *et al.*, 2011). Z hlediska tvorby biofilmu je významný „crawling“ (viz Obr. 14), který se vyskytuje u *Pseudomonas aeruginosa*. Hladovějící buňka se posouvá k okraji biofilmu pomocí střídavého přitahování prostřednictvím jednotlivých pili. Během tohoto pohybu sekretuje složky polysacharidové matrix biofilmu, které za sebou zanechává obdobně, jako když pavouk tvoří pavučinu (Wang *et al.*, 2013).



Obr. 14: Pohyb bakterie prostřednictvím pili IV. typu, tzv. crawling

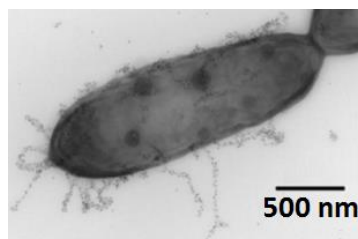
Převzato a upraveno z <https://encrypted-tbn3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRmGUd1jZCuCUomzGzNZaWs13Q8dxM83DQKpTXKcpwO0hIit9-L5w>

Twitching u *Pseudomonas aeruginosa* probíhá díky koordinovanému natahování a stahování pili a vyžaduje množství proteinů a minoritních pilinů (Giltner *et al.*, 2006).

Pili IV. typu také umožňují gramnegativní bakterii *Bdellovibrio bacteriovorus* predaci jiných gramnegativních bakterií, protože zajišťují adhezi na „kořist“. Také je diskutována možnost, že tato bakterie využívá pili IV. typu k průniku skrz vnější membránu do periplazmy hostitelské bakterie (Mahmoud a Koval, 2010).

5.4. Pili grampozitivních bakterií

Pili grampozitivních bakterií jsou až 1 μm dlouhé, 1-10 nm široké vláknité struktury buněčného povrchu. Například povrch bakterie *Lactobacillus rhamnosus* obsahuje několik desítek pili (10-50), z nichž je většina nahloučená na pólech buňky (viz Obr. 15); (Kankainen *et al.*, 2009).



Obr. 15: Pili nahromaděné na pólech *L. rhamnosus* (snímek z transmisního elektronového mikroskopu).

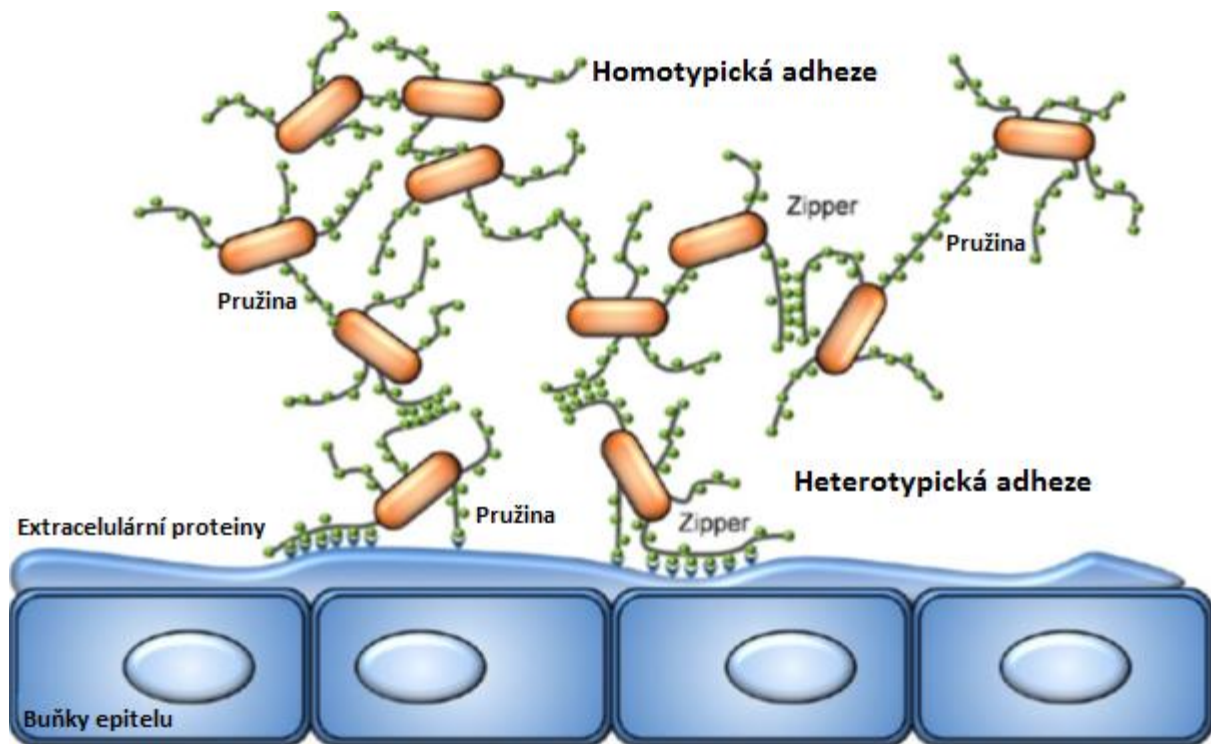
Převzato z Kankainen *et al.* (2009).

Pili jsou hlavním nástrojem patogenity řady grampozitivních bakterií, protože zprostředkovávají adhezi k epitelům (Okahashi *et al.*, 2010). Významná role pili v adhezi k epitelům je potvrzena u *Streptococcus agalactiae* (Konto-Ghiorghi *et al.*, 2009), *Streptococcus sanguinis* (Okahashi *et al.*, 2010) a *Lactobacillus rhamnosus* (Tripathi *et al.*, 2013).

Pili grampozitivních bakterií se svou stavbou a adhezivními vlastnostmi liší od pili gramnegativních bakterií (Tripathi *et al.*, 2013). Jednotlivé majoritní podjednotky pili jsou spojovány enzymem sortázou, která provádí transpeptidaci C-konce jedné podjednotky (kde se nejčastěji nachází treonin) na lysin druhé podjednotky. Sortáza také zodpovídá za připojení pili na peptidoglykanovou stěnu (Konto-Ghiorghi *et al.*, 2009). Každá podjednotka je navíc zpevněna dvěma autokatalytickými intramolekulárními izopeptidickými vazbami mezi vedlejšími řetězci lysinu a asparaginu (Kang *et al.*, 2007). Kromě majoritních pilinů tvořících kostru pili, obsahuje pilus další minoritní piliny, jako je adhezin. Pili se váží na extracelulární matrix epitelu hostitele a zodpovídají za tvorbu biofilmu.

PilC je adhezinem *Streptococcus sanguinis* a váže fibronektin (Okahashi *et al.*, 2010) SpaC je adhezinem *Lactobacillus rhamnosus* a váže mucin a kolagen, ale podílí se i na agregaci bakterií (Tripathi *et al.*, 2013). Pilus *Streptococcus agalactiae* obsahuje Von Willebrandovu adhezní doménu, která slouží ke specifické adhezi na epitelové buňky. PilA je nezbytný ke tvorbě biofilmu a nespecifické adhezi (Konto-Ghiorghi *et al.*, 2009).

Obecné adhezivní vlastnosti pili grampozitivních bakterií jsou dány dvěma specifickými mechanickými odpověďmi na působící sílu. Při nízké smykové síle pilus zprostředkovává zipovitou interakci a při vysoké střížné síle přejde do tuhé konformace a získává tím vlastnosti nanopružiny (viz Obr. 16); (Tripathi *et al.*, 2013).



Obr. 16: Molekulární mechanismus adheze prostřednictvím pili.

SpaC specificky váže mucin a kolagen (heterotypická adheze) a podílí se i na agregaci buněk (homotypická adheze). V závislosti na působící střížné síle vykazují pili dva rozdílné mechanismy vazby: „molecular zipper“ je mechanismus výrazně posilující adhezi bakterie-hostitel a bakterie-bakterie, vlastnosti pružiny umožňují vydržet vysoké střížné napětí. Převzato a upraveno z Tripathi *et al.* (2013).

6. Povrchy regulující bakteriální adhezi

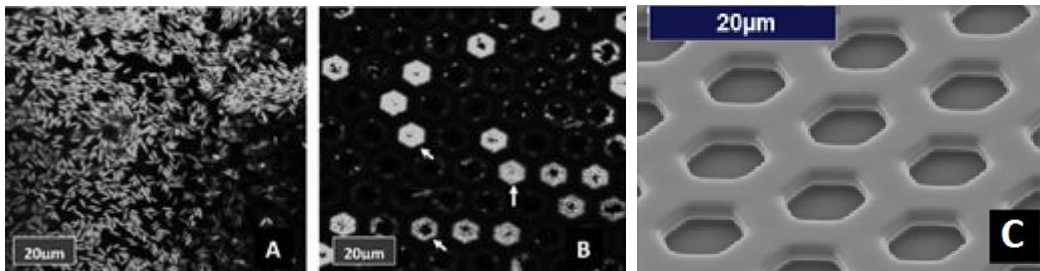
Bakterie žijící v biofilmu získávají kromě mechanické odolnosti i vysokou odolnost vůči běžným desinfekčním a antimikrobiálním látkám, což činí velmi obtížným biofilm odstranit. V řadě odvětví jsou bakteriální biofilmy nežádoucí, a proto je důležité umět tvorbě biofilmu předcházet. Z hlediska prevence tvorby biofilmu lze rozlišit dva základní způsoby: antiadhezivní povrchy zabraňují bakterii adherovat a antibakteriální povrchy bakterii aktivně hubí.

6.1 Antiadhezivní povrchy

Povrch je považován za antiadhezivní, pokud dokáže zabránit přichycení bakterií. Mezi nejběžnější antiadhezivní úpravy patří pokrytí povrchu antiadhezivními polymery, které jsou elektroneutrální a hydrofilní, takže jsou silně hydratované. Energetická náročnost vyvázání molekuly vody pak brání adhezi proteinů (Zeng *et al.*, 2015). Poslední dobou se objevují superhydrofobní povrchy založené na změnách topografie a hrubosti povrchu.

Z antiadhezivních polymerů jsou nejčastěji používány „kartáče“ z polyethylenglykolu (PEG). Jejich aplikace vychází z předpokladu, že povrch odolávající adsorpci proteinů odolá i adhezi bakterií. Avšak ne všechny bakterie využívají k adhezi proteiny. Například grampozitivní *Staphylococcus epidermidis* adheruje prostřednictvím polysacharidů a extracelulární DNA, které pronikají do vrstvy PEG a způsobují vyvázání polymerů od povrchu. Experimentálně bylo zjištěno, že zvýšení množství polymerů na jednotku plochy zabrání adhezi i této bakterie, protože zamezí průniku extracelulární DNA a polysacharidů do vrstvy PEG (Zeng *et al.*, 2015).

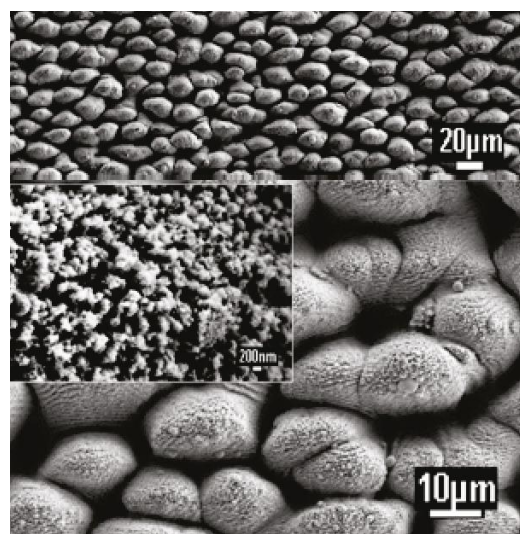
Možným využitím vlivu povrchové hrubosti a topografie na bakteriální adhezi je aplikace mikrostrukturovaných povrchů. Správně nastavená velikost prohlubní způsobí, že bakterie adherují pouze do sníženin, čímž dojde ke snížení plochy dostupné pro adhezi bakterií. Například hexagonální prohlubně o hloubce 3 μm a šířce 7 μm (viz Obr. 17) vedou k výraznému snížení množství adherovaných buněk *Enterobacter cloacae* (Vasudevan *et al.*, 2014).



Obr. 17: Adheze bakterií na hladký a mikrostrukturovaný povrch.

Oproti hladkému povrchu (A) způsobí hexagonální prohlubně (B, v detailu C) snížení míry bakteriální adheze. Převzato a upraveno z Vasudevan *et al.* (2014).

Vhodnou změnou topografie a hrubosti povrchu lze vytvořit superhydrofobní povrchy. Napodobením struktury listů lotosu byl pomocí laseru připraven titanový povrch s dvoustupňovou hrubostí. Prvním stupněm jsou mikrometrová zrna velká 10–20 μm , na jejichž povrchu je druhý stupeň, nerovnosti o velikosti pod 200 nm (viz Obr. 18). Takto vytvořený povrch získává velký kontaktní úhel ($\theta = 166^\circ$), čímž se stává superhydrofobním. Tento povrch selektivně snižuje adhezi bakterie tvaru tyčinky (*P. aeruginosa*), ale neovlivňuje adhezi kulaté bakterie (*S. aureus*). Mechanismus selektivního antiadhezivního charakteru není znám, ale diskutuje se vliv mechanického ukotvení buňky k povrchu (Fadeeva *et al.*, 2011).



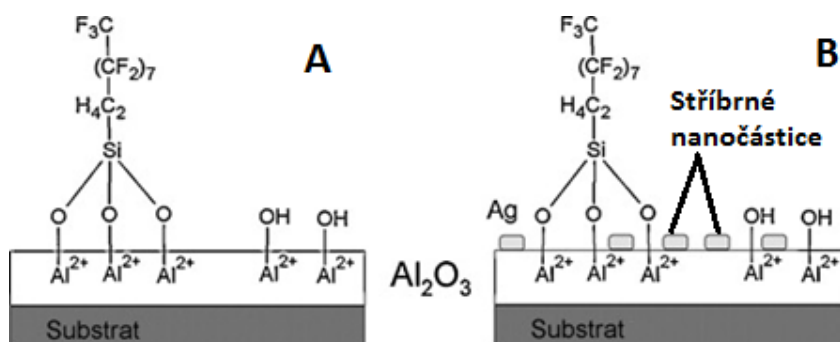
Obr. 18: Superhydrofobní titanový povrch.

Superhydrofobicita povrchu je dána kombinací mikrometrových hrbolků, které jsou pokryté nanometrovými hrbolkami. Převzato a upraveno z Fadeeva *et al.* (2011).

6.2 Antibakteriální povrchy

Antibakteriální povrchy jsou založené na přítomnosti molekuly, která způsobuje smrt bakterií. Největším problémem antibakteriálních povrchů, pokud jde o materiály určené pro implantaci do lidského těla, je riziko poškození tkání pacienta.

Antiadhezivním a antibakteriálním materiálem je například superhydrofobní povrch obsahující stříbrné nanočástice. Tento povrch je připraven postupným nanášením vrstev metodou sol-gel. Nejprve je aplikován oxid hlinitý, který zvýší hrubost substrátu. Na ten je nanášena vrstva (heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl)trimethoxysilanu (FAS), která snižuje povrchovou energii. Na takto vzniklou krycí vrstvu jsou nanášeny stříbrné nanočástice (viz Obr. 19). Přidáním stříbrných nanočástic získává superhydrofobní povrch antibakteriální účinky, zahubí 88 % bakterií. Jeho antibakteriální účinky jsou dány postupným uvolňováním stříbrných kationtů (Ag^+). V neutrálním pH je povrch stabilní, ale v silně kyselém či zásaditém prostředí má krátkou životnost v řádu týdnů, takže je stále předmětem dalšího výzkumu (Heinonen *et al.*, 2014).



Obr. 19: Příklad antibakteriálního povrchu

Na vrstvu oxidu hlinitého, který zvyšuje hrubost substrátu, se kovalentně váže vrstva polymeru FAS (A), na který lze aplikovat vrstvu stříbrných nanočástic (B). Výsledný materiál je superhydrofobní a aktivně hubí bakterie uvolňováním Ag^+ .
Převzato a upraveno z Heinonen *et al.* (2014)

Kombinací biologických antibakteriálních látek s antiadhezivními polymery vznikají struktury, které jsou vhodné k použití v biologickém prostředí. Výborné antibakteriální účinky mají povrchy pokryté polymery s navázanými antimikrobiálními peptidy (Muszanska *et al.*, 2014) či lysozymem (Caro *et al.*, 2009).

Další možností je pokrytí povrchu nanokrystalickým diamantem, který vykazuje antiadhezivní a antibakteriální účinky. Jeho antibakteriální účinky jsou lepší než u Ag^+ , ale horší než u Cu^{2+} . Ale na rozdíl od měděných kationtů je nanokrystalický diamant biokompatibilní, protože nemá negativní vliv na tkáň a zároveň je odolný vůči fyzikálním i chemickým vlivům (Medina *et al.*, 2012). Podobné vlastností mají i amorfní vrstvy DLC (diamond-like carbon); (Marciano *et al.*, 2009) a lze je navíc dopovat atomy kovů jako je Ag nebo Pt (Morrison *et al.*, 2006).

Využití antibakteriálních účinků mědi je možné jejím zakomponováním do slitiny. Slitina titanu a mědi má mechanickou a chemickou odolnost titanu spolu s antibakteriálními účinky mědi, které jsou dány uvolňováním měďnatých kationtů. Při vhodném poměru složek je koncentrace uvolněných měďnatých kationtů velmi malá, takže se antibakteriální účinky projevují pouze při kontaktu bakterie se slitinou. Avšak tato slitina zatím nebyla testována pro použití v medicíně (Zhang *et al.*, 2013).

7. Závěr

Tato práce shrnuje současně využívané způsoby teoretické předpovědi bakteriální adheze, fyzikálně-chemické faktory ovlivňující bakteriální adhezi a podává přehled biologických struktur účastnících se adheze a antiadhezivních a antibakteriálních povrchů.

Předpovědi bakteriální adheze pomocí fyzikálně-chemických teorií, obzvláště pomocí rozšířené DLVO teorie, umožňují celkem přesné popsání bakteriální adheze na rovné anorganické povrchy, ale už ne tak přesný popis adheze na tkáň.

Bakteriální adheze je komplexní proces, který zahrnuje řadu fyzikálně-chemických a biologických vlivů. Přesný dopad těchto vlivů na adhezi je navíc druhově specifický, takže je velmi složité adhezi obecně předpovídat.

I přes velkou pozornost, která je výzkumu adhezivních struktur věnována, je úplné a komplexní pochopení bakteriální adheze v nedohlednu. Aktuální poznatky nám ale umožňují relativně přesnou předpověď bakteriální adheze na různé substráty, což umožňuje vývoj antiadhezivních a antibakteriálních povrchů.

Velká většina antibakteriálních povrchů je ovšem dosud ve fázi laboratorního testování a jejich praktická aplikace v medicíně není zatím možná. Problémem většiny takových povrchů je jejich nízká stabilita v proměnlivém prostředí i jejich potenciální toxický účinek na pacienta či na prostředí. Dalším problémem je vysoká diverzita bakterií, takže antiadhezivní povrchy nemusejí odolávat kolonizaci všech bakteriálních druhů.

Během svého magisterského studia bych se chtěl dále věnovat problematice adheze bakterií na různé uhlíkové nanomateriály.

8. Přehled použité literatury

- Absolom D. R., Lamberti F. V., Policova Z., Zingg W., van Oss C. J. & Neumann A. W.** (1983). Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* **46**(1): 90-97.
- Abu-Lail N. I. & Camesano T. A.** (2003). Role of lipopolysaccharides in the adhesion, retention, and transport of *Escherichia coli* JM109. *Environmental Science & Technology* **37**(10): 2173-2183.
- Allison T. M., Conrad S. & Castric P.** (2015). The group I pilin glycan affects type IVa pilus hydrophobicity and twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa* 1244. *Microbiology* **161**(9): 1780-1789.
- Amoroso P. F., Adams R. J., Waters M. G. & Williams D. W.** (2006). Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an *in vitro* study. *Clinical Oral Implants Research* **17**(6): 633-637.
- Anderl J. N., Franklin M. J. & Stewart P. S.** (2000). Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**(7): 1818-1824.
- Badihi Hauslich L., Sela M. N., Steinberg D., Rosen G. & Kohavi D.** (2013). The adhesion of oral bacteria to modified titanium surfaces: role of plasma proteins and electrostatic forces. *Clinical Oral Implants Research* **24 Suppl A100**: 49-56.
- Bahar O., Goffer T. & Burdman S.** (2009). Type IV pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**(8): 909-920.
- Bayouhd S., Othmane A., Mora L. & Ben Ouada H.** (2009). Assessing bacterial adhesion using DLVO and XDLVO theories and the jet impingement technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **73**(1): 1-9.
- Beaussart A., Baker A. E., Kuchma S. L., El-Kirat-Chatel S., O'Toole G. A. & Dufrene Y. F.** (2014). Nanoscale adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* type IV Pili. *ACS Nano* **8**(10): 10723-10733.
- Bos R. & Busscher H. J.** (1999). Role of acid–base interactions on the adhesion of oral streptococci and actinomyces to hexadecane and chloroform—influence of divalent cations and comparison between free energies of partitioning and free energies obtained by extended DLVO analysis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **14**(1–4): 169-177.
- Busscher H. J., Rinastiti M., Siswomihardjo W. & van der Mei H. C.** (2010). Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *Journal of Dental Research* **89**(7): 657-665.
- Busscher H. J., Weerkamp A. H., van der Mei H. C., van Pelt A. W., de Jong H. P. & Arends J.** (1984). Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* **48**(5): 980-983.
- Caro A., Humblot V., Méthivier C., Minier M., Salmain M. & Pradier C.-M.** (2009). Grafting of lysozyme and/or poly(ethylene glycol) to prevent biofilm growth on stainless steel surfaces. *The Journal of Physical Chemistry B* **113**(7): 2101-2109.
- Cerca N., Pier G. B., Vilanova M., Oliveira R. & Azeredo J.** (2005). Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Research in Microbiology* **156**(4): 506-514.
- Conrad J. C., Gibiansky M. L., Jin F., Gordon V. D., Motto D. A., Mathewson M. A., Stopka W. G., Zelasko D. C., Shrout J. D. & Wong G. C.** (2011). Flagella and pili-

- mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophysical Journal* **100**(7): 1608-1616.
- de Kerchove A. J. & Elimelech M.** (2007). Impact of alginate conditioning film on deposition kinetics of motile and nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(16): 5227-5234.
- Derjaguin B. & Landau L.** (1941). Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Progress in Surface Science* **43**(1): 30-59.
- Dickson J. S. & Koohmaraie M.** (1989). Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* **55**(4): 832-836.
- Duan Q., Zhou M., Zhu X., Bao W., Wu S., Ruan X., Zhang W., Yang Y., Zhu J. & Zhu G.** (2012). The flagella of F18ab *Escherichia coli* is a virulence factor that contributes to infection in a IPEC-J2 cell model *in vitro*. *Veterinary Microbiology* **160**(1-2): 132-140.
- Fadeeva E., Truong V. K., Stiesch M., Chichkov B. N., Crawford R. J., Wang J. & Ivanova E. P.** (2011). Bacterial retention on superhydrophobic titanium surfaces fabricated by femtosecond laser ablation. *Langmuir* **27**(6): 3012-3019.
- Farahat M., Hirajima T., Sasaki K. & Doi K.** (2009). Adhesion of *Escherichia coli* onto quartz, hematite and corundum: Extended DLVO theory and flotation behavior. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **74**(1): 140-149.
- Friedlander R. S., Vlamakis H., Kim P., Khan M., Kolter R. & Aizenberg J.** (2013). Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**(14): 5624-5629.
- Friedlander R. S., Vogel N. & Aizenberg J.** (2015). Role of flagella in adhesion of *Escherichia coli* to abiotic surfaces. *Langmuir* **31**(22): 6137-6144.
- Garai R. M., Sánchez I. C., García R. T., Rodríguez Valverde M. A., Cabrerizo Vilchez M. A. & Hidalgo - Álvarez R.** (2005). Study on the effect of raw material composition on water repellent capacity of paraffin wax emulsions on wood. *Journal of Dispersion Science and Technology* **26**(1): 9-18.
- Garrett T. R., Bhakoo M. & Zhang Z.** (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* **18**(9): 1049-1056.
- Garrido K. D., Palacios R. J. S., Lee C. & Kang S.** (2014). Impact of conditioning film on the initial adhesion of *E. coli* on polysulfone ultrafiltration membrane. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **20**(4): 1438-1443.
- Giaouris E., Samoilis G., Chorianopoulos N., Ercolini D. & Nychas G.-J.** (2013). Differential protein expression patterns between planktonic and biofilm cells of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* PT4 on stainless steel surface. *International Journal of Food Microbiology* **162**(1): 105-113.
- Giltner C. L., van Schaik E. J., Audette G. F., Kao D., Hodges R. S., Hassett D. J. & Irvin R. T.** (2006). The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. *Molecular Microbiology* **59**(4): 1083-1096.
- Gordesli F. P. & Abu-Lail N. I.** (2012). The role of growth temperature in the adhesion and mechanics of pathogenic *L. monocytogenes*: an AFM study. *Langmuir* **28**(2): 1360-1373.
- Haiko J. & Westerlund-Wikström B.** (2013). The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology* **2**(4): 1242.

- Harimawan A., Rajasekar A. & Ting Y.-P.** (2011). Bacteria attachment to surfaces – AFM force spectroscopy and physicochemical analyses. *Journal of Colloid and Interface Science* **364**(1): 213-218.
- Haznedaroglu B. Z., Zorlu O., Hill J. E. & Walker S. L.** (2010). Identifying the role of flagella in the transport of motile and nonmotile *Salmonella enterica* serovars. *Environmental Science & Technology* **44**(11): 4184-4190.
- Heinonen S., Huttunen-Saarivirta E., Nikkanen J.-P., Raulio M., Priha O., Laakso J., Storgårds E. & Levänen E.** (2014). Antibacterial properties and chemical stability of superhydrophobic silver-containing surface produced by sol-gel route. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **453**: 149-161.
- Hemery G., Chevalier S., Bellon-Fontaine M.-N., Haras D. & Orange N.** (2006). Growth temperature and OprF porin affect cell surface physicochemical properties and adhesive capacities of *Pseudomonas fluorescens* MF37. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **34**(1): 49-54.
- Hermansson M.** (1999). The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **14**(1-4): 105-119.
- Honda T., Arita M. & Miwatani T.** (1984). Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli*: a possible new colonization factor. *Infection and Immunity* **43**(3): 959-965.
- Hori K. & Matsumoto S.** (2010). Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal* **48**(3): 424-434.
- Houry A., Briandet R., Aymerich S. & Gohar M.** (2010). Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology* **156**(4): 1009-1018.
- Hsu L. C., Fang J., Borca-Tasciuc D. A., Worobo R. W. & Moraru C. I.** (2013). Effect of micro- and nanoscale topography on the adhesion of bacterial cells to solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* **79**(8): 2703-2712.
- Hunter K. A. & Liss P. S.** (1982). Organic matter and the surface charge of suspended particles in estuarine waters1. *Limnology and Oceanography* **27**(2): 322-335.
- Hwang G., Kang S., El-Din M. G. & Liu Y.** (2012). Impact of conditioning films on the initial adhesion of *Burkholderia cepacia*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **91**: 181-188.
- Hwang G., Liang J., Kang S., Tong M. & Liu Y.** (2013). The role of conditioning film formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adhesion to inert surfaces in aquatic environments. *Biochemical Engineering Journal* **76**: 90-98.
- Ji Y. W., Cho Y. J., Lee C. H., Hong S. H., Chung D. Y., Kim E. K. & Lee H. K.** (2015). Comparison of surface roughness and bacterial adhesion between cosmetic contact lenses and conventional contact lenses. *Eye Contact Lens* **41**(1): 25-33.
- Jucker B. A., Harms H., Hug S. J. & Zehnder A. J. B.** (1997). Adsorption of bacterial surface polysaccharides on mineral oxides is mediated by hydrogen bonds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **9**(6): 331-343.
- Jucker B. A., Harms H. & Zehnder A. J.** (1996). Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and teflon. *Journal of Bacteriology* **178**(18): 5472-5479.
- Kang H. J., Coulibaly F., Clow F., Proft T. & Baker E. N.** (2007). Stabilizing isopeptide bonds revealed in gram-positive bacterial pilus structure. *Science* **318**(5856): 1625-1628.
- Kankainen M., Paulin L., Tynkkynen S., von Ossowski I., Reunanen J., Partanen P., Satokari R., Vesterlund S., Hendrickx A. P. A., Lebeer S., De Keersmaecker S. C. J., Vanderleyden J., Hämäläinen T., Laukkanen S., Salovuori N., Ritari J., Alatalo E., Korpela R., Mattila-Sandholm T., Lassig A., Hatakka K., Kinnunen K.**

- T., Karjalainen H., Saxelin M., Laakso K., Surakka A., Palva A., Salusjärvi T., Auvinen P. & de Vos W. M.** (2009). Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(40): 17193-17198.
- Kirchner M. & Meyer T. F.** (2005). The PilC adhesin of the *Neisseria* type IV pilus-binding specificities and new insights into the nature of the host cell receptor. Molecular Microbiology **56**(4): 945-957.
- Konto-Ghiorgi Y., Mairey E., Mallet A., Dumenil G., Caliot E., Trieu-Cuot P. & Dramsi S.** (2009). Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. PLoS Pathogens **5**(5): e1000422.
- Krogfelt K. A., Bergmans H. & Klemm P.** (1990). Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. Infection and Immunity **58**(6): 1995-1998.
- Lameiras F. S., Souza A. L. d., Melo V. A. R. d., Nunes E. H. M. & Braga I. D.** (2008). Measurement of the zeta potential of planar surfaces with a rotating disk. Materials Research **11**: 217-219.
- Lim J. Y., Shaughnessy M. C., Zhou Z., Noh H., Vogler E. A. & Donahue H. J.** (2008). Surface energy effects on osteoblast spatial growth and mineralization. Biomaterials **29**(12): 1776-1784.
- Liu Y. & Zhao Q.** (2005). Influence of surface energy of modified surfaces on bacterial adhesion. Biophysical Chemistry **117**(1): 39-45.
- Mahmoud K. K. & Koval S. F.** (2010). Characterization of type IV pili in the life cycle of the predator bacterium *Bdellovibrio*. Microbiology **156**(4): 1040-1051.
- Marciano F. R., Bonetti L. F., Da-Silva N. S., Corat E. J. & Trava-Airoldi V. J.** (2009). Wettability and antibacterial activity of modified diamond-like carbon films. Applied Surface Science **255**(20): 8377-8382.
- Marshall K. C., Stout R. & Mitchell R.** (1971). Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. Microbiology **68**(3): 337-348.
- Mazariego-Espinosa K., Cruz A., Ledesma M. A., Ochoa S. A. & Xicohtencatl-Cortes J.** (2010). Longus, a type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*, is involved in adherence to intestinal epithelial cells. Journal of Bacteriology **192**(11): 2791-2800.
- Medina O., Nocua J., Mendoza F., Gómez-Moreno R., Ávalos J., Rodríguez C. & Morell G.** (2012). Bactericide and bacterial anti-adhesive properties of the nanocrystalline diamond surface. Diamond and Related Materials **22**: 77-81.
- Merz A. J., Enns C. A. & So M.** (1999). Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque formation in epithelial cells. Molecular Microbiology **32**(6): 1316-1332.
- Mi B. & Elimelech M.** (2008). Chemical and physical aspects of organic fouling of forward osmosis membranes. Journal of Membrane Science **320**(1-2): 292-302.
- Morrison M. L., Buchanan R. A., Liaw P. K., Berry C. J., Brigmon R. L., Riester L., Abernathy H., Jin C. & Narayan R. J.** (2006). Electrochemical and antimicrobial properties of diamondlike carbon-metal composite films. Diamond and Related Materials **15**(1): 138-146.
- Murga R., Miller J. M. & Donlan R. M.** (2001). Biofilm formation by gram-negative bacteria on central venous catheter connectors: effect of conditioning films in a laboratory model. Journal of Clinical Microbiology **39**(6): 2294-2297.
- Muszanska A. K., Rochford E. T. J., Gruszka A., Bastian A. A., Busscher H. J., Norde W., van der Mei H. C. & Herrmann A.** (2014). Antiadhesive polymer brush coating functionalized with antimicrobial and RGD peptides to reduce biofilm formation and enhance tissue integration. Biomacromolecules **15**(6): 2019-2026.

- Okahashi N., Nakata M., Sakurai A., Terao Y., Hoshino T., Yamaguchi M., Isoda R., Sumitomo T., Nakano K., Kawabata S. & Ooshima T.** (2010). Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to fibronectin and contribute to cell adhesion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **391**(2): 1192-1196.
- Peng J.-S., Tsai W.-C. & Chou C.-C.** (2002). Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International Journal of Food Microbiology* **77**(1–2): 11-18.
- Perni S., Preedy E. C. & Prokopovich P.** (2014). Success and failure of colloidal approaches in adhesion of microorganisms to surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* **206**: 265-274.
- Porter J. R.** (1976). Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriological Reviews* **40**(2): 260-269.
- Saldias M. S., Ortega X. & Valvano M. A.** (2009). *Burkholderia cenocepacia* O antigen lipopolysaccharide prevents phagocytosis by macrophages and adhesion to epithelial cells. *Journal of Medical Microbiology* **58**(12): 1542-1548.
- Satou N., Satou J., Shintani H. & Okuda K.** (1988). Adherence of streptococci to surface-modified glass. *Journal of General Microbiology* **134**(5): 1299-1305.
- Sharma P. K. & Hanumantha Rao K.** (2002). Analysis of different approaches for evaluation of surface energy of microbial cells by contact angle goniometry. *Advances in Colloid and Interface Science* **98**(3): 341-463.
- Sharma P. K. & Hanumantha Rao K.** (2003). Adhesion of *Paenibacillus polymyxa* on chalcopyrite and pyrite: surface thermodynamics and extended DLVO theory. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **29**(1): 21-38.
- Schneck E., Papp-Szabo E., Quinn B. E., Konovalov O. V., Beveridge T. J., Pink D. A. & Tanaka M.** (2009). Calcium ions induce collapse of charged O-side chains of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of The Royal Society Interface* **6**(Suppl 5): S671-S678.
- Singh A. V., Vyas V., Patil R., Sharma V., Scopelliti P. E., Bongiorno G., Podestà A., Lenardi C., Gade W. N. & Milani P.** (2011). Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation. *PLoS ONE* **6**(9): e25029.
- Strauss J., Burnham N. A. & Camesano T. A.** (2009). Atomic force microscopy study of the role of LPS O-antigen on adhesion of *E. coli*. *Journal of Molecular Recognition* **22**(5): 347-355.
- Sun X., Shao Y., Boluk Y. & Liu Y.** (2015). The impact of cellulose nanocrystals on the aggregation and initial adhesion to a solid surface of *Escherichia coli* K12: Role of solution chemistry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **136**: 570-576.
- Svensson S. L., Pryjma M. & Gaynor E. C.** (2014). Flagella-mediated adhesion and extracellular DNA release contribute to biofilm formation and stress tolerance of *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE* **9**(8): e106063.
- Tieszer C., Reid G. & Denstedt J.** (1998). Conditioning film deposition on ureteral stents after implantation. *The Journal of Urology* **160**(3, Part 1): 876-881.
- Tripathi P., Beaussart A., Alsteens D., Dupres V., Claes I., von Ossowski I., de Vos W. M., Palva A., Lebeer S., Vanderleyden J. & Dufrene Y. F.** (2013). Adhesion and nanomechanics of pili from the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *ACS Nano* **7**(4): 3685-3697.
- Truong V. K., Lapovok R., Estrin Y. S., Rundell S., Wang J. Y., Fluke C. J., Crawford R. J. & Ivanova E. P.** (2010). The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. *Biomaterials* **31**(13): 3674-3683.

- van Loosdrecht M. C., Lyklema J., Norde W., Schraa G. & Zehnder A. J.** (1987). The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* **53**(8): 1893-1897.
- van Oss C. J.** (1989). Energetics of cell-cell and cell-biopolymer interactions. *Cell Biochemistry and Biophysics* **14**(1): 1-16.
- van Oss C. J.** (1995). Hydrophobicity of biosurfaces — Origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **5**(3–4): 91-110.
- van Oss C. J.** (2008). Chapter Five - The interfacial tension/free energy of interaction between water and identical condensed-phase entities, i, immersed in water, w. *Interface Science and Technology*. Carel J. v. O., Elsevier. **16**: 59-72.
- Van Oss C. J., Good R. J. & Chaudhury M. K.** (1986). The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **111**(2): 378-390.
- Vasudevan R., Kennedy A. J., Merritt M., Crocker F. H. & Baney R. H.** (2014). Microscale patterned surfaces reduce bacterial fouling-microscopic and theoretical analysis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **117**: 225-232.
- Verwey E. J. W.** (1947). Theory of the stability of lyophobic colloids. *The Journal of Physical and Colloid Chemistry* **51**(3): 631-636.
- Verwey E. J. W. & Overbeek J. T. G.** (1948). Theory of the stability of lyophobic colloids. New York, Elsevier.
- Walker J. T. & Marsh P. D.** (2004). A review of biofilms and their role in microbial contamination of dental unit water systems (DUWS). *International Biodeterioration & Biodegradation* **54**(2–3): 87-98.
- Wang S., Parsek M. R., Wozniak D. J. & Ma L. Z.** (2013). A spider web strategy of type IV pili-mediated migration to build a fibre-like Psl polysaccharide matrix in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology* **15**(8): 2238-2253.
- Yoda I., Koseki H., Tomita M., Shida T., Horiuchi H., Sakoda H. & Osaki M.** (2014). Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion. *BMC Microbiol* **14**: 234.
- Yoshihara A., Nobuhira N., Narahara H., Toyoda S., Tokumoto H., Konishi Y. & Nomura T.** (2015). Estimation of the adhesive force distribution for the flagellar adhesion of *Escherichia coli* on a glass surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **131**: 67-72.
- Zeng G., Ogaki R. & Meyer R. L.** (2015). Non-proteinaceous bacterial adhesins challenge the antifouling properties of polymer brush coatings. *Acta Biomaterialia* **24**: 64-73.
- Zgair A. K. & Chhibber S.** (2011). Adhesion of *Stenotrophomonas maltophilia* to mouse tracheal mucus is mediated through flagella. *Journal of Medical Microbiology* **60**(7): 1032-1037.
- Zhang E., Li F., Wang H., Liu J., Wang C., Li M. & Yang K.** (2013). A new antibacterial titanium–copper sintered alloy: Preparation and antibacterial property. *Materials Science and Engineering: C* **33**(7): 4280-4287.
- Zhang Z. & Christopher G.** (2016). Effect of particulate contaminants on the development of biofilms at air/water interfaces. *Langmuir* **32**(11): 2724-2730.
- Zita A. & Hermansson M.** (1997). Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater *in situ*. *FEMS Microbiology Letters* **152**(2): 299-306.