

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017

Tereza Kopřivová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko – technologická

Rezistence bakterií v biofilmu

Tereza Kopřivová

Bakalářská práce
2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tereza Kopřivová**
Osobní číslo: **C14210**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Rezistence bakterií v biofilmu**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte literární rešerši na dané téma, v úvodu práce charakterizujte antimikrobiální látky (dělení, vlastnosti, použití).
2. Stručně popište co je biofilm a přehledně charakterizujte jednotlivé hypotézy, které se snaží objasnit mechanismy rezistence bakterií v biofilmu.
3. Z nejnovějších odborných publikací uveďte konkrétní příklady rezistence bakterií v biofilmu k antimikrobiálním látkám (které mikroorganismy tvořily biofilm, použitá antimikrobiální látka, koncentrace).
4. Získané závěry zhodnoťte a popište způsoby ošetření biofilmu (prevence, příp. nové antimikrobiální látky, atd.).
5. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí Úpa č. 9/2012 ve znění dodatku č. 1 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Petra Mořková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

28. listopadu 2016

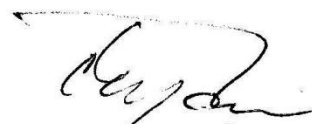
Termín odevzdání bakalářské práce:

7. července 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2017

Tereza Kopřivová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce paní Ing. Petře Motkové, Ph.D. za její cenné rady a poskytnutí znalostí při vypracování této bakalářské práce. Velice jí děkuji za její pomoc a obětavý přístup po celou dobu jejího vedení.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá mechanismy působení antimikrobiálních látek na mikroorganismy. Stručně popisuje vznik mikrobiálního biofilmu. Hlavní část bakalářské práce vysvětluje různé mechanismy rezistencí bakterií v biofilmu. Závěrečná část se zaměřuje na prevenci vzniku biofilmu a jeho odstranění.

KLÍČOVÁ SLOVA

Biofilm, bakterie, rezistence, mechanismus, antimikrobiální látky

TITLE

Resistance of bacteria in biofilm

ANNOTATION

Bachelor thesis is focused on the effect of antimicrobial agents on microorganisms. It deals with microbial biofilm formation. Main part describes various mechanisms of bacterial resistance of biofilm. At the end the prevention of biofilm formation and biofilm treatment is described.

KEYWORDS

Biofilm, bacteria, resistance mechanism, antimicrobial agents

Obsah

SEZNAM ZKRATEK

ÚVOD	12
1 Antimikrobiální látky	13
1.1 Dopad antimikrobiálních látek na buňku	13
1.1.1 Mikrobistatický	13
1.1.2 Mikrobicidní	13
1.2 Cíl antimikrobiálního účinku	13
1.2.1 Plísně a kvasinky	13
1.2.2 Viry	14
1.2.3 Prvoci	15
1.2.4 Bakterie	15
1.3 Způsob využití antimikrobiálních látek	16
1.3.1 Dezinfekční prostředky	16
1.3.2 Antiseptika	17
1.3.3 Antibiotika	17
1.4 Mechanismus účinku antimikrobiálních látek	17
1.4.1 Inhibice funkce cytoplazmatické membrány	17
1.4.2 Inhibice syntézy enzymů	18
1.4.3 Inhibice syntézy nukleových kyselin	18
1.4.4 Inhibice syntézy buněčné stěny	18
1.4.5 Inhibice tvorby metabolitů	18
1.5 Původ antimikrobiálních látek	19
1.5.1 Syntetické.....	19
1.5.2 Přírodní	19
1.6 Složení antimikrobiálních látek.....	20
1.6.1 Alkoholy	20
1.6.2 Halogenidy.....	20
1.6.3 Aldehydy.....	20
1.6.4 Peptidy	21
2 Biofilm	22
2.1 Fáze vzniku biofilmu.....	22

2.2	Vlastnosti biofilmu.....	23
3	Mechanismy rezistence bakterií v biofilmech.....	24
3.1	Snížená penetrace do biofilmu.....	24
3.1.1	Snížení propustnosti biofilmu.....	24
3.1.2	Přítomnost efluxních pump.....	24
3.1.3	Hydraulická rezistence biofilmu.....	24
3.1.4	Produkce polymeru.....	25
3.1.5	Tvorba hydrogelu.....	25
3.2	Vznik rezistentního fenotypu bakteriálních buněk.....	25
3.2.1	QS zprostředkující výměnu genů.....	25
3.2.2	Schopnost přizpůsobit se měnícímu prostředí.....	26
3.3	Změna vlastního mikroprostředí v biofilmu.....	26
3.3.1	Poskytování živin přes EPS.....	26
3.3.2	Vznik perzistentních buněk.....	27
4	Rezistence bakterií v biofilmu k antimikrobiálním látkám.....	28
4.1	Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky.....	28
4.1.1	Účinnější přenos plazmidů v biofilmu <i>Escherichia coli</i>	28
4.1.2	Vliv povrchu a pH na biofilm <i>Salmonella typhimurium</i>	28
4.1.3	Rezistence <i>Haemophilus parasuis</i> na β -laktamová antibiotika.....	29
4.1.4	Redukce biofilmu <i>Proteus mirabilis</i> a <i>Proteus vulgaris</i>	29
4.1.5	Produkce ESBL u <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
4.2	Grampozitivní sporující aerobní tyčinky.....	30
4.2.1	EpsA-o produkt <i>Bacillus subtilis</i>	30
4.2.2	Delece inhibitoru syntézy SinR v <i>Bacillus subtilis</i>	31
4.3	Gramnegativní nefermentující tyčinky.....	31
4.3.1	Genová exprese v biofilmu <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
4.3.2	Biofilm <i>Pseudomonas aeruginosa</i> u chronických ran.....	32
4.3.3	Test MRC u <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
4.3.4	Efluxní pumpy <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
4.3.5	Gen <i>blaPER-1</i> kmene <i>Acinetobacter baumannii</i>	33
4.3.6	Eliminace oxidativního stresu <i>Burkholderia cenocepacia</i>	34
4.4	Grampozitivní aerobní a fakultativně anaerobní koky.....	35
4.4.1	Adheze <i>Enterococcus faecalis</i> k dentinu.....	35

4.4.2	Biofilm smíšeného typu <i>Lactobacillus plantarum</i> a <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
4.4.3	Produkce lipázy kmenem <i>Staphylococcus epidermidis</i>	36
4.4.4	Koordinace <i>Streptococcus mutant</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> a <i>Actinomyces viscosus</i>	36
4.4.5	Modifikace lipidů v membráně <i>Staphylococcus aureus</i>	37
4.5	Grampozitivní nesportující aerobní tyčinky	37
4.5.1	Blokace biofilmu <i>Listeria monocytogenes</i>	37
5	Prevence a odstranění biofilmu	39
5.1	Inhibice enzymů v biofilmu	39
5.2	Použití nanočástic stříbra pro prevenci vzniku biofilmu	39
5.3	Využití éterických olejů	39
5.4	Omezení adheze bakterií	40
5.5	Podávání M1-aktivovaných makrofágů pro eliminaci biofilmu	40
5.6	Faktory omezující vznik biofilmu	41
5.7	Vstřebatelné cementy v artroplacii	41
5.8	Odstranění biofilmu ze zavedeného implantátu	42
5.9	Odstranění biofilmu z močových cest	42
5.10	Biofilm v ústní dutině	42
5.11	Kombinace dezinfekčních prostředků v mlékárenském průmyslu	43
6	Závěr	44
7	Seznam použité literatury	45

SEZNAM ZKRATEK

ATP – adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)

AL – antimikrobiální látka

AU – autoinduktor (autoinductor)

A. viscosus – *Actinomyces viscosus*

BHI – mozkosrdcový bujón (brain heart infusion)

B. subtilis – *Bacillus subtilis*

B. cenocepacia – *Burkholderia cenocepacia*

DNA – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

EPS – extracelulární polymerní substance (extracellular polymeric substances)

ESBL – širokospektré β laktamázy (extended spectrum beta lactamase)

E. coli – *Escherichia coli*

FAS – syntéza mastných kyselin (fatty acid synthase)

HAT – lidská trypanosomiáza z Afriky (human African trypanosomiasis)

HGT – horizontální přenos genetické informace (horizontal gene transfer)

HIV – virus nedostatečné lidské imunity (human immunodeficiency virus)

K. pneumoniae – *Klebsiella pneumoniae*

LCMM – mikroskopie laserem zachycující mikrosekce (laser capture microdissection microscopy)

LPS – lipopolysacharid (lipopolysaccharide)

L. plantarum – *Lactobacillus plantarum*

L. monocytogenes – *Listeria monocytogenes*

MBC – minimální baktericidní koncentrace (minimum bactericid concentration)

MBC90 – minimální baktericidní koncentrace pro 90 % populace buněk (minimum bactericid concentration for 90 % cell population)

MBEC – minimální eliminující koncentrace biofilmu (minimum biofilm eliminating concentration)

MBEC50 – minimální eliminující koncentrace 50 % biofilmu (minimum concentration eliminating 50 % of biofilm)

MRC – minimální regenerační koncentrace (minimum recovery concentration)

MIC – minimální inhibiční koncentrace (minimum inhibitory concentration)

MIC50 – minimální inhibiční koncentrace pro 50 % populace buněk (minimum inhibitory concentration for 50 % cell population)

MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)

NAC – N-acetylcystein

NADPH – zredukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát (reduced nicotinamide adeninedinucleotide phosphate)

NADP⁺ – nikotinamidadenindinukleotidfosfát (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

PAA – peroxooctová kyselina (peroxyacetic acid)

PBP – protein vazající penicilin (penicillin binding protein)

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PFGE – pulsní gelová elektroforéza (pulsed field gel electrophoresis)

PHMB – polyhexanmethyl biguanid (polyhexamethylene biguanide)

PQAS – polymerní kvarterní amoniové soli (polymeric quaternary ammonium salt)

P. acnes – *Propionibacterium acnes*

P. mirabilis – *Proteus mirabilis*

P. vulgaris – *Proteus vulgaris*

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

QAC – kvarterní amoniové sloučeniny (quaternary ammonium cation)

QAS – kvarterná amoniové soli (quaternary ammonium salt)

QS – quorum sensing (quorum sensing)

RNA – ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)

RND – nodulační faktory rezistence (resistance nodulation division)

ROS – reaktivní forma kyslíku (reactive oxygen species)

SEM – skenovací elektronová mikroskopie (scanning electron microscope)

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. epidermidis – *Staphylococcus epidermidis*

S. mutant – *Streptococcus mutant*

S. pyogenes – *Streptococcus pyogenes*

S. sanguis – *Streptococcus sanguis*

TCA – trikarboxylová kyselina (tricarboxylic acid)

UV – ultrafialové (ultraviolet)

ÚVOD

Antimikrobiální látky tvoří významnou skupinu látek, které nám umožňují vypořádat se s mnoha onemocněními dnešní doby. V rámci eliminace či inhibice mikroorganismů se využívají jako dezinfekční prostředky, antiseptika a ve zdravotnictví hlavně jako antibiotika.

S častějším a nesprávným užíváním antibiotik, se vyvinuly rezistentní bakteriální kmeny, které činí antibiotickou léčbu mnohdy neúčinnou. S novými studiemi a technologiemi jsme schopni reagovat na vzniklou rezistenci jak u planktonních forem bakterií, tak i u odolných bakteriálních biofilmů.

Biofilm je shluk mikrokolonií z mikroorganismů, připevněných na povrchu pomocí polysacharidů, které mikroorganismy samy produkují.

Odolnost biofilmu vychází z jeho pevné struktury a produkce extracelulární polymerní substance (EPS). Vnější vrstva biofilmu způsobuje hlavní problém, proč tak jindy účinné antimikrobiální látky, nejsou schopny penetrovat do biofilmové struktury. Nenáročnost biofilmu na vnější podmínky a na druhy povrchu, umožňuje vznik biofilmu na místech, kde mechanické odstranění nepřipadá v úvahu.

Vznik biofilmu způsobuje problémy nejen ve zdravotnictví, ale i ve vodovodních systémech či vnějším přírodním prostředí. Zvláště nebezpečný je výskyt biofilmů u hospitalizovaných pacientů, kteří mají sníženou obranyschopnost imunitního systému.

1 Antimikrobiální látky

Antimikrobiální látky (AL), někdy označovány jako mikrobicidy nebo biocidy, jsou anorganické nebo organické chemické látky, které jsou toxické pro mikroorganismy. Antimikrobiální látky se používají pro eliminaci mikroorganismů, nalezených v každodenních domácnostech a průmyslovém prostředí (Czechowski a Stoodley, 2002).

Termín antimikrobiální zahrnuje látky, které mají široké spektrum účinnosti proti bakteriím (antibakteriální), virům (antivirové), plísním a kvasinkám (antifungální) a prvokům (antiprotozoální) (Yah a Simate, 2015).

Správně zvolená antimikrobiální léčba u nemocného pacienta může znamenat rozdíl mezi vyléčením a jeho úmrtím. Vzhledem k široké dostupnosti AL, jejich relativní bezpečnosti a nízkým nákladům na výrobu, jsou AL jedny z nejvíce zneužívaných látek, což má za následek zvýšenou rezistenci mikroorganismů k těmto látkám (Leekha *et al.*, 2011).

1.1 Dopad antimikrobiálních látek na buňku

1.1.1 Mikrobistatický

Jedná se o látky, které se snaží zabránit pomnožení či růstu mikroorganismů. Jedná se o vratný děj, kdy se v dlouhodobé přítomnosti či vysoké koncentraci mikrobistatických látek dochází k usmrcování mikroorganismů a mění se její účinek z mikrobistatického na mikrobicidní. Mikrobistatický účinek má erytromycin, tetracyklin aj. (Sohnle *et al.*, 1993).

1.1.2 Mikrobicidní

Mikrobicidní látky jsou chemické látky, které se běžně používají k usmrcení mikroorganismů. Jedná se o nevratný děj, jehož následkem je usmrcení buňky. Za tímto účelem se využívá penicilin, formaldehyd, chlor aj. (Maillard *et al.*, 2013).

1.2 Cíl antimikrobiálního účinku

1.2.1 Plísně a kvasinky

Antifungální látka způsobuje usmrcení buněk hub. Při pohledu na složení houbové buňky, lze doporučit alespoň šest různých antifungálních mechanismů (Lagrouh *et al.*, 2017).

1.2.1.1 Inhibice tvorby buněčné stěny

Buněčná stěna hub se skládá především z β -glukanů a chitinu. Pokud je inhibice syntézy těchto sloučenin narušena, stává se buněčná stěna permeabilní (Lagrouh *et al.*, 2017).

1.2.1.2 Přerušování permeability buněčné membrány

Pokud jsou steroly v buněčné membráně inhibovány antifungální látkou a jejich syntéza je inhibována, naruší se celistvost buněčné membrány. Tím se membrána stává propustná (Al-hakeim *et al.*, 2012).

1.2.1.3 Dysfunkce houbových mitochondrií

Inhibice transportu mitochondriálních elektronů má za následek snížení potenciálu mitochondriální membrány. Inhibice může nastat prostřednictvím inhibice protonových pump v respiračním řetězci, což vede ke snížení produkce adenosintrifosfátu (ATP) a následnému usmrcení buněk (Yang *et al.*, 2011).

1.2.1.4 Inhibice buněčného dělení

Uskuteční se prostřednictvím inhibice polymerace mikrotubulů, a tím inhibuje tvorbu mitotického vřetena (Lagrouh *et al.*, 2017).

1.2.1.5 Inhibice syntézy RNA/RNG/DNA nebo syntézy proteinů

Pokud antifungální látka vstoupí do buňky, může způsobit defektní syntézu ribonukleové kyseliny (RNA) a inhibici transkripce deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Inhibice syntézy proteinů je také známým antifungálním cílem (Lagrouh *et al.*, 2017).

1.2.1.6 Inhibice efluxních pump

Efluxní pumpy odjímají nahromaděnou antifungální látku z houbové buňky. Nadměrná účinnost efluxních pump může vést k rezistenci vůči antifungálním látkám. Při inhibici efluxních pump se předpokládá, že se rezistence vůči antifungálním látkám sníží (Lagrouh *et al.*, 2017).

1.2.2 Viry

Během posledních 20 let, představovaly nukleosidové analogy v boji proti virům nedostatečné imunity u člověka (HIV), viru hepatitidy B a C a herpes virům, neúčinnější AL. Klasické antivirové nukleosidy, jako je zidovudin, působí poškození řetězců virové RNA.

V závislosti na mechanismu jejich působení se tyto molekuly dělí na likvidátory prodloužených řetězců, pseudo-obligátní likvidátory řetězců a na mutagenní nukleosidy. Likvidátoři prodloužených řetězců (tj. penciclovir, cidofovir a entecavir) blokují polymerázu nukleové kyseliny. Ribavirin a 5-hydroxydeoxycytidin místo účinku na řetězec, zabraňují replikaci viru, což vede k náhodným mutacím, které jsou často pro virus smrtící (Deval, 2009).

1.2.3 Prvoci

1.2.3.1 Trypanocidní sloučeniny

Trypanosoma brucei je příčinou vzniku lidské trypanosomiózy z Afriky (HAT), jinak známé jako spavá nemoc. Pro léčbu HAT se používá suramin, pentamidin, melarsoprol a eflornithin v kombinaci s nifurtimoxem. Eflornithin je jediná sloučenina mezi pěti schválenými léčivy, která má dobře definovaný způsob účinku. Ten zahrnuje inhibici ornitinové dekarboxylázy s následným úbytkem polyaminů (Creek *et al.*, 2014).

1.2.3.2 Antileishmaniální sloučeniny

Po stimulaci lipopolysacharidů (LPS) antileishmaniálními sloučeninami, jsou aktivovány makrofágy, které produkují oxid dusnatý a kontrolují množení intracelulárních parazitů (Wulsten *et al.*, 2017).

1.2.3.3 Antimalarické sloučeniny

Atovaquone je lék proti malárii způsobené parazitem kmenem z rodu *Plasmodium spp.* Inhibicí komplexu cytochromu bc-1 v elektronovém transportním řetězci, dochází ke ztrátě membránového potenciálu v mitochondriích a následnému narušení syntézy pyrimidinu (Creek *et al.*, 2014).

1.2.4 Bakterie

Během 60-ti let rozvoje antibakteriálních látek se vývoj zaměřil na objev sloučenin z přírodních zdrojů (zejména půdních bakterií ze skupin aktinomycetů a hub) a vývoje syntetických AL. Většina antibiotik, která se stále ještě dnes používají, byla objevena v polovině minulého století, včetně beta-laktamů, aminoglykosidů, makrolidů, aminokumarinů, tetracyklinů, ionoforů a glykopeptidů a jejich semi-syntetických derivátů (Taylor a Wright, 2008).

1.2.4.1 Inhibitory syntézy buněčné stěny

Inhibice syntézy peptidoglykanové stěny je cílem antibakteriální léčby, protože buněčná stěna je životně důležitá pro bakterie a poskytuje oporu buňce díky velmi zesílené struktuře. Mezi inhibitory syntézy buněčné stěny patří karbapeny, monobactamy, cefalosporiny aj.

1.2.4.2 Inhibitory replikace DNA

Tímto účinkem fungují chinoliny. Mezi nevíce používaný je delafloxacin. Na rozdíl od starších chinolonů působí také proti grampozitivním bakteriím.

1.2.4.3 Inhibice syntézy mastných kyselin

Syntéza mastných kyselin (FAS) je multienzymový komplex, jehož substráty jsou acetyl-coA a zredukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH). Léčivo isoniazid inhibuje mykobakteriální FabI.

1.2.4.4 Inhibitory syntézy bílkovin

Mezi inhibitory syntézy bílkovin patří ketolidy, tetracykliny, aminoglykosidy aj. (Shah, 2015).

1.2.4.5 Inhibitory syntézy RNA

Rifampicin, patřící do skupiny ansamycinů, je antibiotikum se širokým spektrem účinku proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím, kde ovlivňuje iniciační fázi syntézy RNA (Lange *et al.*, 2007).

1.3 Způsob využití antimikrobiálních látek

1.3.1 Dezinfekční prostředky

Dezinfekce zahrnuje snížení počtu patogenních a podmíněně patogenních mikroorganismů na povrchu, v kapalinách nebo ve vzduchu. Chemické dezinfekční prostředky se liší svou antimikrobiální aktivitou, od inhibice růstu až po smrtící účinek. Dezinfekční prostředky, které vykazují sporicidní aktivitu, jsou obvykle považovány za účinné proti všem mikroorganismům a někdy jsou označovány jako sterilanty. Dezinfekční prostředky jsou k dispozici v kapalných, polotekutých, pěnových a plynových přípravcích. Během posledních pěti až deseti let byly nové druhy výrobků, jako dezinfekční ubrousky,

antimikrobiální povrchy a textilie, uváděny na trh pro lékařské, veterinární, potravinářské a domácí použití.

Mezi základní mechanismy účinku patří reakce s membránově aktivními látkami, specifická interakce s enzymy, účinek oxidačních či alkylačních činidel, interkalujících činidel a interakce s thiolovými skupinami (Maillard a Mc-Donnell, 2012).

1.3.2 Antiseptika

Antiseptika patří mezi mikrobicidy, které buď usmrtí, nebo inhibují růst mikroorganismů v živé tkáni nebo na jejím povrchu. Účinek antiseptika se určuje *in vivo* podle jeho účinku na planktonních bakteriích. Kvarterní amoniové sloučeniny (QAC), biguanidy nebo jod, patří mezi nejčastěji používaná antiseptika. QAC vytvářejí vazbu mezi vlastní kationtovou skupinou (směřující směrem od buňky) a bakteriální buněčnou stěnou. Hydrofobní konec AL vytvoří vazbu s lipidovou dvouvrstvou v cytoplazmatické membráně a způsobí narušení buňky s následným únikem buněčné cytoplazmy (Vestby a Nesse, 2015).

1.3.3 Antibiotika

Antibiotika jsou účinná proti bakteriálním buňkám. Používání antibiotik využívá rozdíly ve struktuře buněk mezi prokaryotickými a eukaryotickými buňkami. Tento jev je známý jako selektivní toxicita. Selektivita vychází ze zásady, že antibiotika inhibují základní biochemické procesy v bakteriích bez vážného ovlivnění buněk hostitele. U některých antibakteriálních léků se mohou vyskytnout nepříznivé účinky u hostitele, pokud je koncentrace vysoká. K dispozici jsou čtyři klíčové mechanismy činnosti antibakteriálních léků, z nichž všechny jsou založeny na koncepci selektivní toxicity. Tyto mechanismy zahrnují inhibici syntézy bakteriální buněčné stěny (např. cefalosporiny a peniciliny), inhibici syntézy bakteriální DNA (např. rifampicin a rifamycin), inhibici syntézy proteinů bakterií (např. aminoglykosidy a tetracykliny) a inhibici syntézy folátů např. sulfoamidy (Kaufman, 2011).

1.4 Mechanismus účinku antimikrobiálních látek

1.4.1 Inhibice funkce cytoplazmatické membrány

Antimikrobiální peptidy se nejprve musí setkat s bakteriální buňkou a poté následuje mechanismus elektrostatického propojení mezi aniontovými nebo kationtovými peptidy a bakteriální strukturou (Brogden, 2005).

Po interakci cytoplazmatické membrány a kationtového antimikrobiálního peptidu vznikne nový poměr lipidů a peptidů v membráně. Dokud je poměr peptidů a lipidů nízký, kationtové antimikrobiální peptidy zůstanou paralelně spojeny s rovinou membrány, která je uložena na rozhraní hydrofilních lipidových skupin a hydrofobních mastných acylových řetězců. Jak se zvyšuje poměr peptidů a lipidů, jsou se peptidy schopny agregovat nebo přeorientovat složení membrány a narušit její integritu (Hale a Hancock, 2007).

1.4.2 Inhibice syntézy enzymů

Enzymy a buněčné struktury jsou převážně tvořené z proteinů. Syntéza proteinů je nezbytný metabolický proces, využívaný pro množení a přežití mikroorganismů. Část AL poruší syntézu enzymů vznikem vazby na podjednotku 30S či 50S, nacházející se v intracelulárním ribozomu. Následkem je narušení buněčného metabolismu. Jsou to látky typu aminoglykosidy, makrolidy, streptograminy atd. (Bockstael a Aerschot, 2009).

1.4.3 Inhibice syntézy nukleových kyselin

Látky inhibující syntézu nukleových kyselin zahrnují např. metronidazoly, quinolony, tinidazoly nebo ornidazolyly. Neaktivní forma AL pasivně difunduje do buňky, kde je aktivována. Nitroskupina redukována na aniontové radikálové cíle, oxiduje DNA, což vede k poškození řetězce a smrti buněk. Proto má mnoho AL jak antimikrobiální, tak mutagení účinek (Patil *et al.*, 2013).

1.4.4 Inhibice syntézy buněčné stěny

Bakteriální buňky jsou obklopeny buněčnou stěnou nebo vrstvami peptidoglykanu. Jedná se o polymer s hlavním uhlovodíkovým řetězcem, který poskytuje mechanickou oporu nezbytnou k ochraně před osmolýzou. Primárními cíli β -laktamových látek jsou proteiny vázající penicilin (PBP). Po nukleofilní zásahu na β -laktamovém kruhu atomu kyslíku v postranním řetězci serinového zbytku (v aktivním místě enzymu), vzniká komplex penicilloyl-enzymu, což vede k inaktivaci enzymu a blokování enzymu pomocí transpeptidace s následnou lýzou buňky (Bockstael a Aerschot, 2009).

1.4.5 Inhibice tvorby metabolitů

Sulfonamidy a trimethoprim patří mezi inhibitory kyseliny listové v metabolismu. Kombinace sulfoamidů a trimethoprimu působí na odlišné fáze stejné biosyntetické dráhy.

Vykazují synergii a redukují míru mutace, čímž způsobují rezistenci. Sulfonamidy inhibují dihydropteroát syntézu.

V konkurenční vazbě, mají vyšší afinitu k enzymu než přirozený substrát *p*-aminobenzoové kyseliny. Látky jako trimethoprim působí v pozdějším stadiu syntézy kyseliny listové a potlačují enzym dihydrofolát reduktázu (Bockstael a Aerschot, 2009).

1.5 Původ antimikrobiálních látek

1.5.1 Syntetické

Kationtové kvarternizované polymery obsahující amoniové funkční skupiny s poměrně dlouhými alkylovými substituenty nebo bočními hydrofobními alkyly tvoří stejně jako polymery s antimikrobiálním účinkem, široké využití v mnoha odvětvích. Jedním z nejdůležitějších využití je kontrola infekce na klinikách, v nemocnicích, v potravinářském průmyslu a v domácích zařízeních. Hydrofilní kationtové amonné polymery, polymerní biguanidy a polymerní kvarterní amoniové soli (PQAS) našly použití jako dezinfekční prostředky. Ve srovnání s běžnými mikrobicidy mají kvarterní amoniové soli (QAS), polyhexanmethyl biguanid (PHMB) a PQAS větší účinnost, zejména proti grampozitivním bakteriím a nízkou toxicitu (Timofeeva a Kleshcheva, 2011).

1.5.2 Přírodní

Trvalé a nekontrolované používání syntetických látek vedlo k potřebě nalézt nové přípravky přírodního původu. Je známo, že dlouhodobé použití syntetických látek často způsobuje řadu vedlejších účinků, včetně rezistence. Na rozdíl od syntetických látek, bioaktivní přírodní produkty mají příznivý vliv na celý organismus bez nežádoucích účinků (Rankovic *et al.*, 2011).

Použití různých rostlinných přírodních látek jako antibakteriálních a antifungálních je strategií pro objevování bioaktivních AL. Rostliny jsou bohaté na širokou škálu sekundárních metabolitů, jako jsou flavonoidy, alkaloidy, taniny a terpenoidy, které byly nalezeny *in vitro* a mají antimikrobiální účinek. Existuje vztah mezi chemickými složkami rostlinných extraktů a olejů s antimikrobiálním účinkem. Antibakteriální látky rostlinného původu inhibují efluxní pumpu, quorum sensing (QS) nebo tvorbu biofilmu (Savoia, 2012).

1.6 Složení antimikrobiálních látek

1.6.1 Alkoholy

Hydroxylové skupiny, aminoskupiny a aromatické kruhy jsou obecné, a zvláště důležité funkční skupiny u biologicky aktivních sloučenin. Terciární alkoholy s aromatickými kruhy připojenými ke kvartérnímu atomu uhlíku by měly vykazovat biologické aktivity a usnadnit interakce s příslušnými receptory molekul. Terciární alkoholové deriváty vykazují účinek tromboxanu A₂ a inhibici receptoru prostaglandinu H₂, proto jsou používány k léčbě řady poruch, jako je koronární vazospasmus, astma a peptické vředy.

Terciární butylalkohol může být rovněž aplikován při přípravě hydrofobního hydroxypropyl β -cyklodextrin komplexu, který zvyšuje rozpustnost léčiv jak v simulované žaludeční šťávě, tak v simulované střevní tekutině, což zlepšuje absorpci a farmakodynamické vlastnosti léků. Diaryl chinoliny patří do skupiny sloučenin chinolinů mající centrální heterocyklické chinolinové jádro a postranní řetězce s terciárními alkoholy a terciárními aminovými skupinami, které jsou zodpovědné za jejich antimykobakteriální aktivitu. *p*-amino alkoholy představují velkou skupinu sloučenin se širokou škálou bioaktivit, jako jsou antiplasmodiální, antileishmaniální a antiproliferační (Baseer *et al.*, 2011).

1.6.2 Halogenidy

Chlor a jeho deriváty patří mezi nejstarší dezinfekční prostředky používané v lékařské praxi a v domácnosti. Jsou to levné a účinné látky, které jsou široce využívány. Zvláště se používají k ošetření pitné vody, vody v bazénech, v domácnosti apod. Chlor je nejdůležitější AL mezi všemi halogeny. Fluor je příliš reaktivní a nelze jej použít jako dezinfekční prostředek.

Chlor se používá v průmyslu i v lékařské praxi také jako chlornan (zejména chlornan sodný). V alkalických roztocích se uvolňuje chlornanový iont, který způsobuje zvýšení pH. Neionizovaná kyselina chlorná je zodpovědná za antimikrobiální účinek chloru ve vodě, proto jsou sloučeniny chloru aktivnější v kyselém nebo neutrálním médiu (Burlibasa *et al.*, 2013).

1.6.3 Aldehydy

Mezi nejrozšířenější aldehydy patří glutaraldehyd, formaldehyd, benzaldehyd, sukcinlaldehyd a několik β -nenasycených aldehydů. Aldehydy reagují s proteiny, v cytoplazmatické membráně, které mají sulfhydrylové skupiny. Penetrace aldehydů do buněk

je závislá na pH, protože aldehydy pracují lépe při bazickém pH. Sloučeniny typu hydrazin, obsahující azomethin, tvoří důležitou skupinu sloučenin pro vývoj nových léků. Hydrazinové skupiny hrají důležitou roli v antimikrobiální léčbě. Řada hydrazid-hydrazonových derivátů má antibakteriální, antifungální, protizánětlivý a antituberkulózní účinky (Gurkok *et al.*, 2008).

1.6.4 Peptidy

Antimikrobiální peptidy získávají schopnost nahradit běžná antibiotika. Antimikrobiální peptidy jsou důležité sloučeniny imunitního systému, protože mají širokou schopnost usmrtit mikroorganismy. Velké antimikrobiální proteiny (> 100 a.a.) jsou často lytické bílkoviny vázající živiny nebo se specificky zaměřují na mikrobiální makromolekuly. Množství antimikrobiálních peptidů bylo zjištěno v epitelálních vrstvách, fagocytech a tělesných tekutinách mnohobuněčných buněk zvířat i lidí. Vedle své role endogenních antibiotik mají antimikrobiální peptidy funkce při zánětu, opravě ran a regulaci adaptivního imunitního systému (Pathan *et al.*, 2010).

2 Biofilm

Biofilmy jsou organizované shluky mikroorganismů, které zůstávají připevněny k pevným povrchům. Tyto mikroorganismy vytvářejí síť z bílkovin, nukleonových kyselin extracelulární polymerní substance (EPS), která působí jako ochranný štít pro bakterie v biofilmu. Biofilm vytváří prostředí vhodné pro výměnu genetického materiálu mezi mikroorganismy v rámci biofilmu. Schopnost výměny plazmidů se více vyskytuje v biofilmech než u volně planktonních bakterií. Zvýšená úroveň konjugace, ke které dochází v biofilmech, může být výsledkem ochrany mikroorganismů před smykovými silami vyvolanými proudem tekutiny v extracelulárním prostředí. Biofilmy složené z jediného mikrobiálního kmenu jsou méně odolné, zatímco odolnější biofilmy se tvoří z více kmenů. Biofilm je schopen se vytvořit na různém povrchu, včetně živé tkáně, zdravotnickém vybavení, průmyslovém vodovodu či v přírodním vodním systému.

2.1 Fáze vzniku biofilmu

Fáze 1 začíná změnou environmentálních signálů skládající se z pH, teploty, osmolarity a koncentrace živin. Během tohoto stádia mikroorganismy adherují k povrchu. Toto počáteční připojení je reverzibilní, charakterizované opakovaným připevněním a odpojením od povrchu.

Fáze 2 zahrnuje ireverzibilní vznik adheze na pevný povrch a je charakterizována mikroorganismy, které zůstávají připevněné k povrchu i přes vnější smykové síly. V tomto stádiu nastává růst a agregace biofilmu. Pohyblivost mikroorganismů se snižuje v důsledku tvorby EPS (Krivit a Heuertz 2011).

Fáze 3 zahrnuje růst a expanzi bakterií. Monovrstva mikroorganismů přitahuje sekundární bakterie k tvorbě mikrokolonií. Tyto mikrokolonie jsou shluky bakterií s laterálním a vertikálním růstem. Během zkoumání reakcí při tvorbě biofilmu, lze popsat dva typy interakcí. Koadheze je proces rozpoznání planktonních bakterií a bakterií, již jsou připojeny k biofilmu. Koagregace je proces, kdy se rozeznají geneticky odlišné bakterie v biofilmu a výsledkem je tvorba shluků.

Fáze 4 je vyplavení mikroorganismů z biofilmu do okolí. Vyplavení jednotlivých kolonií je programované oddělení planktonních bakteriálních buněk, způsobené lokální

hydrolyzou EPS. Rozptýlení celých shluků je fyzikálně zprostředkovaný separační proces, ve kterém se biofilmová mikrokolonie odděluje od zralého biofilmu. Mikrokolonie je nesena prostředím, dokud se mikrokolonii nepodaří adherovat na nový povrch a zahájit novou tvorbu populace biofilmu (Usha, 2010).

Základní strukturní jednotka biofilmu je mikrokolonie, která může být složena z 10 – 25 % bakterií a 75 - 90 % EPS, v závislosti na kmenu mikroorganismu. Biofilm také obsahuje vodní kanály, které umožňují přepravu základních živin a kyslíku pro růst bakterií (Tenke *et al.*, 2012).

2.2 Vlastnosti biofilmu

Bakterie v biofilmu jsou 500 až 1 500krát odolnější vůči antimikrobiální léčbě než planktonní bakterie. Zpočátku vědci věřili, že EPS poskytuje bariéru, která chrání bakterie před přímým účinkem AL. Nyní se zdá, že bakterie jsou v biofilmu metabolicky aktivnější, což omezuje funkci AL. Bakterie se v biofilmu nereplikují tak rychle, jak se děje v planktonním stavu, a proto se části biofilmu v daný okamžik vyskytují v různých stádiích růstu (tj. statické, stacionární, exponenciální), avšak celá rychlost růstu biofilmů je konstantní. Bakterie v biofilmu, které jsou nejvíce náchylné k antibiotikům, jsou v exponenciální růstové fázi, protože antibiotika vyžadují vysokou rychlost metabolismu a buňky ve fázi dělení, aby byly účinné (Paulson, 2005).

3 Mechanismy rezistence bakterií v biofilmech

3.1 Snížená penetrace do biofilmu

3.1.1 Snížení propustnosti biofilmu

Odolnost proti průtoku v mikrobiálním biofilmu je způsobena účinkem EPS. Účinek EPS může být prospěšný, tzn. vytvářet interní biofilmovou architekturu, která je propustná kvůli vyskytujícím se dutinám a kanálkům. V případě polymerních gelů, dochází k hydrodynamickému tření při vytékání vody z gelu.

Míra propustnosti EPS je výsledkem rovnováhy mezi odporovými silami a silami, které řídí pohyb vody skrz biofilm.

Velikost pórů, heterogenita a prostorová uspořádání EPS určuje propustnost biofilmu. EPS také určuje celkovou vnitřní strukturu a tím ovlivňuje proniknutí látek do biofilmu (Derlon *et al.*, 2016).

3.1.2 Přítomnost efluxních pump

Bakterie jsou vystaveny řadě stresových situací, pomocí kterých se jim vyvinuly obranné mechanismy, umožňující vyrovnat se s kolísáním prostředí, jako jsou náhlé změny teploty, oxidační stres, nízká aktivita vody, poškození DNA, hladovění a další. Mnoho z těchto stresových reakcí byly charakterizovány pomocí molekulárních a genetických detailů u planktonních bakterií. Tyto stresové reakce byly prokázány i u biofilmu (Stewart, 2002).

Funkce víceúčelových efluxních pump jsou geneticky zakódované v chromozomech. Efluxní pumpy jsou schopné zprostředkovat odolnost vůči mnoha biologickým formám toxických látek. Tyto funkce se nevyvíjely jako reakce na antibiotika, a tak rezistence proti toxickým látkám může zahrnovat pumpy nodulační faktorové rezistence (RND). Geny pro tvorbu efluxních pump se více vyskytují v biofilmech než v planktonních bakteriích (Olsen, 2015).

3.1.3 Hydraulická rezistence biofilmu

Hustota bakterií v biofilmu o tloušťce 100 μm je obvykle v rozmezí $7 - 8 \times 10^8$ bakterií/ cm^2 , což představuje méně než 5 % celkového objemu biofilmu. Hlavní část biofilmu se skládá z EPS, který je silně hydratován vodou. Vysoce hydratované

biopolymery, tvořící hydrogel s obsahem vody 95 - 99 %, se nejvíce podílejí na hydraulické odolnosti biofilmu. Biofilmy mohou ovlivňovat membránové systémy pomocí transmembránové rezistence, která se skládá z odolnosti proti poklesu přijímání živin, shlukování minerálních nánosů či akumulace odumřelých částic v důsledku adhezivních vlastností biofilmové matrice.

Membránové vodovodní systémy poskytují dostatečný prostor pro mikroorganismy přenášené vodou, které mohou volně adherovat ke všem povrchům v těchto systémech. Výskyt biofilmů v membránových procesech způsobuje zhoršení kvality procházející vody a biologickou kontaminaci jiných složek membránových systému. (Dreszer *et al.*, 2013).

3.1.4 Produkce polymeru

Bakterie umístěné hluboko produkují polymer, aby posunuly dceřiné bakterie ze středu biofilmu do více okysličeného prostředí. Zároveň tento polymer brání nežádoucím bakteriím v existenci.

Buňky produkující EPS se lépe shlukují, což vede k silným interakcím mezi generacemi bakterií a upevňuje jejich vzájemnou spolupráci. Adhezivní vlastnosti EPS mohou poskytnout další evoluční výhody jako je odolnost proti smykovému napětí a aktivní vyplavování nežádoucích bakteriálních buněk na povrch biofilmu (Steenackers *et al.*, 2016).

3.1.5 Tvorba hydrogelu

Široká škála biofilmů vyskytujících se ve vodním proudu, nebo v horkém prostředí, vykazují klasické elastické chování. Tyto vlastnosti umožňují biofilmům odolat přechodné období rychle se měnícího prostředí. Po delší době vnitřního namáhání biofilmu, je smykové napětí rozptýleno přes vizkózní tok nebo dojde ke zjednodušení struktury pro snížení vnitřního odporu. Bariérové vlastnosti EPS hydrogelu mohou také chránit před ultrafialovým (UV) světlem a dehydratací (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

3.2 Vznik rezistentního fenotypu bakteriálních buněk

3.2.1 QS zprostředkující výměnu genů

Komunikace mezi buňkami je zprostředkována pomocí QS, ten koordinuje buněčné akce založené na hustotě bakterií. V QS systému, jednotlivé bakterie vylučují chemické signální molekuly v podobě autoinduktorů (AI). Jak se zvyšuje množství bakteriálních buněk

v biofilmu, zvyšuje se také koncentrace AI v biofilmu. AI reagují se signálními receptory buněk, vyskytujícími se na okolních bakteriích. Acylované laktonové homoserinové AI zprostředkovávají komunikaci hlavně mezi gramnegativními bakteriemi.

Jiné peptidy, vyloučené buňkami, známé jako autoindukční peptidy, usnadňují QS u grampozitivních bakterií. Vedle použití QS jako prostředku komunikace pro tvorbu biofilmů, mohou bakterie využít QS pro zvýšení virulence. Vylepší virulentních genů, které zvyšují tvorbu biofilmu, může usnadnit výměnu genů zodpovědných za rezistenci k antibiotikům (Schroeder *et al.*, 2017).

3.2.2 Schopnost přizpůsobit se měnícímu prostředí

Adhezní fáze tvorby biofilmu se skládá jak z reverzibilní, tak ireverzibilní fáze adheze. Připojení bakterií na povrch často vede k jejich proliferaci do složitějších struktur. Vznik bakteriálních mikrokolonií do vysoce organizovaných struktur, se skládá z molekulárních reakcí a je výsledkem několika faktorů (např. signalizační mechanismy mezi buňkami, které monitorují hustotu biofilmu a hrají hlavní roli při tvorbě struktury biofilmu). Koordinovanou expresí genu, během signalizačních mechanismů, se bakterie mohou přizpůsobit měnícímu se prostředí a koordinovat transkripci různých operonů a regulátorů prostřednictvím inter-systému cross talk.

Pohyblivost a chemotaxe umožňují pohyb přes různý prostor na místa, kde je vyšší dostupnost živin. Metabolické reakce mezi různými organismy hrají roli v expanzi mikrokolonií tím, že dovolují organismům koexistovat v symbióze (Klemm *et al.*, 2007).

3.3 Změna vlastního mikroprostředí v biofilmu

3.3.1 Poskytování živin přes EPS

V přírodě existuje EPS jako extrémně hydratovaný (98 % tvoří voda) gel sestávající ze sítě zapouzdřených shluků různých mikrobiálních kmenů, které mohou zahrnovat jak prokaryotické, tak eukaryotické buňky. Vlákna EPS neurčují jen stavbu biofilmu, ale také konzervují a koncentrují trávicí enzymy uvolňované z bakterií. Biofilmová matrice představuje aktivní reaktivní prostor, ideálně vhodný pro zachycení různých zdrojů z vnějšího prostředí. To umožňuje biofilmu absorbovat různé živiny a zadržovat extracelulární enzymy, což v důsledku reakce mezi enzymy a polysacharidy, vedlo k vytvoření zásoby živin mimo

buňku. Extracelulární enzymy mohou také rozložit substrát, což vede k biodegradaci jeho částic. EPS zajišťuje poskytování živin a tím zvyšuje šanci přežití mikroorganismů v biofilmu (Flemming, 2006).

3.3.2 Vznik perzistentních buněk

Všechny perzistentní buňky v biofilmech žijí ve vysoce odolném fenotypu, rostou jinou rychlostí a stanovují se podobně jako spory. Tento fenotyp buněk přispívá ke snížení citlivosti vůči AL a objasňuje jeden z mechanismů rezistence bakterií v biofilmu. Většina populace vícekmenových biofilmů je rychle usmrcena antimikrobiálním ošetřením, ale zlomek buněk není ovlivněn ani prodlouženou dobou léčby AL, což potvrzuje výskyt perzistentních bakterií v biofilmu. Perzistentní buňky jsou odolné proti inhibičním koncentracím AL a vykazují schopnost překonat vnější stresující situace, kvůli transkripčnímu programování (Zhou *et al.*, 2015).

4 Rezistence bakterií v biofilmu k antimikrobiálním látkám

4.1 Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky

4.1.1 Účinnější přenos plazmidů v biofilmu *Escherichia coli*

Nejrychlejším mechanismem dědičného získání rezistence vůči více AL je horizontální přenos genetické informace (HGT). Jedním z hlavních mechanismů HGT je zprostředkovaná bakteriální konjugace pomocí plazmidů. Mnoho plazmidů z různých skupin, které nesou více genů pro rezistenci k AL, se může konjugativně přenášet mezi buňkami nesoucí plazmid a buňkami bez plazmidu. Konjugace vyžaduje těsný kontakt mezi buňkami a minimální smykové síly. Vzhledem k tomu, že obě tyto vlastnosti jsou charakteristické pro biofilmy, je přenos konjugačního genu v mikrobiálních biofilmech vysoce výkonný.

Předpokládá se, že donorové kmeny, které lépe adherují k biofilmu, mají účinnější přenos plazmidu. Pro potvrzení hypotézy se porovnála účinnost přenosu plazmidů pB10 a RP4 v kapalině a biofilmu mezi dvěma donory (účinným biofilmem *Escherichia coli* MG1655 a biofilmem kmene MG1655). V obou prostředích byl počet buněk plazmidů MG1655 připojených k biofilmu přibližně 3krát vyšší než u typu MG1655, což mělo za následek téměř 5krát vyšší účinnost konjugace pro pB10 a RP4.

E. coli je známý modelový organismus s dobře charakterizovanými mechanismy přenosu plazmidů. Zatímco většina laboratorních kmenů *E. coli* ztratila schopnost tvořit silné biofilmy, mnoho přirozeně vyskytujících se kmenů vytváří biofilmy a způsobuje ohrožení lidského zdraví kolonizací abiotických povrchů, zdravotnických nástrojů či kontaminací potravin (Król *et al.*, 2013).

4.1.2 Vliv povrchu a pH na biofilm *Salmonella typhimurium*

Rozdílné faktory jako povrch, pH nebo teplota mají významný vliv na rezistenci *Salmonella typhimurium* v biofilmu, proti dezinfekčním prostředkům. Testované dezinfekční prostředky byly QAC (200 ppm), směs kyseliny peroxooctové (PAA) a 0,1% organické kyseliny a chlornanu sodného (50 ppm). Pro biofilmy vytvořené při teplotě 7 – 37 °C byl neúčinnější dezinfekční prostředek QAC a směs PAA a organické kyseliny. Odolnost biofilmu vytvořeného na nerezové oceli při teplotě 6 - 37 °C se zvyšuje s rostoucím stářím biofilmu. U 168 hodinového biofilmu vytvořeného při pH 6 byla rezistence vůči všem třem

dezinfekčním prostředkům nejvyšší při 37 °C, oproti 28 a 42 °C. Bylo zjištěno, že za stejných podmínek testu, roste s pH i rezistence biofilmu k AL. Tyto výsledky ukazují, že rezistence biofilmů proti dezinfekci závisí na stáří biofilmu a pH (Nguyen a Yuk, 2013).

4.1.3 Rezistence *Haemophilus parasuis* na β -laktamová antibiotika

Haemophilus parasuis je etiologickým původcem systémového onemocnění Glässerova choroba, která je charakterizovaná fibrinózní polyserozitidou, artritidou a meningitidou u prasat. Ve studii byly použity různé kmeny k schopnosti tvorby biofilmu 110 H. Sedmdesát tři kmenů *Haemophilus parasuis* (66,4 %) vykazuje tvorbu biofilmu a většina z nich vykazuje slabou schopnost tvorby biofilmu (38/73). Všechny kmeny byly testovány na antimikrobiální citlivost na osmnáct AL mikrodiluční metodou. Testované kmeny vykazovaly velmi vysokou rezistenci (> 90 %) na sulfanilamid, kyselinu nalidixovou a trimetoprim. Kmeny se schopností tvořit biofilm, vykazovaly souvislost s rezistencí na β -laktamová antibiotika, neboť rezistence na osm antibiotik jako je penicilin (41,1 % vs. 8,1 %), ampicilin (31,5 % vs. 8,1 %), amoxicilin (28,8 % vs. 5,4 %), gentamicin (46,6 % vs. 24,3 %), cefazolin (19,2 % vs. 8,1 %), doxycyklin (19,2 % vs. 8,1 %), cefotaxim (11 % vs. 2,7 %) a cefaclor (13,7 % vs. 5,4 %) byla u kmenů tvořících biofilm vyšší než u kmenů, které nemají schopnost tvořit biofilm (Zhang *et al.*, 2014).

4.1.4 Redukce biofilmu *Proteus mirabilis* a *Proteus vulgaris*

Hodnota minimální koncentrace AL, která eliminuje 50 % biofilmu (MBEC50) ciprofloxacinu byla pro kmeny obou zkoumaných druhů 1,0 $\mu\text{g/ml}$. Tato hodnota byla 16krát vyšší než minimální inhibiční koncentrace pro 50 % populace bakterií (MIC50), určená pro planktonní bakterie. Hodnota minimální baktericidní koncentrace, která usmrtí 90 % populace bakterií (MBC90) ciprofloxacinu u kmenů *P. vulgaris* byla 64 $\mu\text{g/ml}$ a 512 $\mu\text{g/ml}$ u kmenů *P. mirabilis*. Hodnota MBC90 byla 512 a 128krát vyšší než hodnota minimální inhibiční koncentrace pro 90 % populace bakterií MIC90 pro *P. mirabilis* a *P. vulgaris*. Nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v rezistenci biofilmu tvořeného kmeny *P. mirabilis* a *P. vulgaris*. Na základě výsledků spektrofotometrické studie byl stanoven stupeň redukce biofilmu obou testovaných kmenů. U kmenů druhů izolovaných z tamponů z ran byl v případě osmi kmenů (53,3 %) pozorován stupeň snížení nad 50 % pro koncentraci 0,06 $\mu\text{g/ml}$ testovaného antibiotika. U kmenů *P. vulgaris* nebyl rozdíl v míře redukce biofilmu při

nejnižších testovaných koncentracích ciprofloxacinu. Koncentrace 0,06 µg/ml vedla ke snížení více než 50 % biofilmu *P. vulgaris* (Kwiecinska-Pirog *et al.*, 2016).

4.1.5 Produkce ESBL u *Klebsiella pneumoniae*

Vuotto *et al.* (2014) poukazovali na schopnost biofilmu *Klebsiella pneumoniae* produkovat širokospektré β-laktamázy (ESBL). Ze 150 bakteriálních kmenů dokáže 44,7 % tvořit biofilmy, z nichž 45,3 % dokáže produkovat ESBL. Kmen *K. pneumoniae*, obsahuje faktor virulence, jako je schopnost tvorby biofilmu. Souvislost mezi rezistencí vůči antibiotikům a tvorbou biofilmu byla rovněž zkoumána růstem kmenů *K. pneumoniae* pod vlivem antibiotik, většinou se sub-inhibiční koncentrací AL. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) cefotaximu na *K. pneumoniae* produkující CTX-M-15 byla 516 mg/l a MIC ofloxacinu byla 2 mg/l. Zatímco v přítomnosti Sub-MIC ofloxacinu, se množství biofilmu snížilo v poměru ke koncentraci antibiotik, v přítomnosti cefotaximu v koncentracích sub-MIC, se tvorba biofilmu zvýšila.

4.2 Grampozitivní sporulující aerobní tyčinky

4.2.1 EpsA-o produkt *Bacillus subtilis*

Izolovaný kmen *Bacillus subtilis* vykazuje vysokou odolnost proti různým oxidačním činidlům. Stabilní izolát vytváří velmi silný biofilm se specifickými výběžky ve srovnání s jinými kmeny *B. subtilis*. Studie prokázala, že sublethální dávky chloru skutečně stimulovaly tvorbu biofilmu *B. subtilis*, což je proti původnímu záměru použití. Vysoká odolnost je spojena především se zvýšenou produkcí extracelulární matrice. Narušení trojrozměrné struktury biofilmu a promytí bakterií vedlo k obnovení citlivosti na peroxooctovou kyselinu (PAA), která byla pozorovaná u planktonních bakterií.

Biochemický test ukázal, že množství cukrů a bílkovin obsažených v biofilmu *B. subtilis*, bylo 2,6 a 3,1krát větší než u biofilmu tvořeného kmenem označeným 168. Zapojily se molekulové složky, o kterých je již známo, že se účastní EPS konstrukce *B. subtilis*, jako jsou produkty operonu epsA-O nebo TasA amyloidní vlákna. Nukleotidové sekvence epsA-O a yqxM/sipW/tasA, včetně jejich promotoru, byly identické v obou kmenech NDmedical a 168. Konstrukce transkripční fúze neprokázaly žádný významný rozdíl mezi expresí epsA-O operonu testovaného kmene a kmene 168, zatímco YqxM/sipW/tasA operon byl významně

vyšší v biofilmech referenčního kmene ve srovnání s izolovaným kmenem *B. subtilis*. Společně tyto údaje naznačily, že pozorovaná rezistence kmene *B. subtilis* pravděpodobně nebyla způsobena změnou kteréhokoli z hlavních faktorů v EPS *B. subtilis*, ale byla způsobena neidentifikovanými geny (Bridier *et al.*, 2012).

4.2.2 Delece inhibitoru syntézy SinR v *Bacillus subtilis*

TasA a TapA jsou nezbytné geny, nacházející se v bakteriích a tvořící biofilm *Bacillus subtilis*. Tyto proteiny se nevyskytují v nižších vrstvách biofilmu. Mutace sipW u jistých nepatogenních kmenů způsobují nedostatečnou adhezi na skleněné nebo polyvinylchloridové plochy. To je proto, že SipW je funkční protein s dvěma funkcemi. Aktivuje signální peptidázy, která může zpracovávat TasA a TapA a také aktivuje karboxy-terminální složku, která následně aktivuje expresi genu *eps*. Tato aktivace je zásadní pro adhezi a nastane pouze tehdy, když jsou buňky v povrchově adherovaném stavu. Dostatečně nadměrná exprese *eps* obnoví tvorbu biofilmu, zprostředkovanou SipW mutantem. Kromě TasA je další sekretovaný protein BslA. Ten je důležitý pro povrchovou hydrofobicitu, komplexní tvorbu kolonií, morfologii a tvorbu shluků v biofilmu.

Porušený biofilm s mutantním fenotypem bslA může být extracelulárně obnoven, smícháním tohoto mutantu s mutantní látkou a TasA. *eps* a TasA poskytují smíšenou populaci mutantů BslA (Vlamakis *et al.*, 2013).

4.3 Gramnegativní nefermentující tyčinky

4.3.1 Genová exprese v biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*

U biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* jsou rhamnolipidy povrchově aktivní látky, které jsou důležité pro správný vývoj biofilmu. Exprese genů *rhlAB*, syntetizující rhamnolipid, je pod vlivem QS. Exprese *pqsA* v jednodenním biofilmu byla lokalizována ve starších vrstvách biofilmu. U dvoudenního biofilmu byla lokalizována ve vnější vrstvě biofilmové struktury. Čtvrtý den bylo množství *pqsA* téměř zanedbatelné. Genová exprese v biofilmech se tedy liší jak v čase, tak v prostoru.

Ve snaze studovat interakce mezi subpopulacemi bakterií v rozvíjejícím se biofilmu, se analyzovaly smíšené biofilmy, které byly označeny různými fluorescenčními markery. Výzkumy prokázaly omezení exprese genu *pvdA* (nutný pro výrobu sideroforického

pyoverdinu) na vnitřní prostor biofilmu, kde exprese genu *pvdA* je potřebná pro tvorbu ochranných struktur zralých bakterií.

Výzkumníci z centra pro biofilmové inženýrství využili techniku mikroskopie zachycující laserem mikrosekce (LCMM), která začíná řešit heterogenitu biofilmu tím, že umožňuje izolaci specifických sekcí biofilmu. LCMM s následnou PCR umožňuje charakterizaci genů v jednotlivých buňkách. Při použití LCMM a PCR se identifikovaly buňky lokalizované v horní a spodní vrstvě biofilmu *P. aeruginosa*. Metoda prokázala výskyt transkripčního děje, indikující aktivní metabolismu v horní části biofilmu. Metabolicky neaktivní buňky na dolní vrstvě biofilmu byly méně citlivé na ciprofloxacin ve srovnání s buňkami v aktivní části biofilmu (Mah, 2012).

4.3.2 Biofilm *Pseudomonas aeruginosa* u chronických ran

V chronické ráně se často uchycují ve velkém množství kmeny, které mají schopnost vytvářet biofilmy. K testu se použilo 205 náhodně vybraných klinických kmenů od pacientů, získaných z různých anatomických míst. Byla použita sbírka kmenů methicilin citlivých a methicilin rezistentních *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*. Tvorba biofilmu byla testována s využitím mikrotitračních destiček a skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Z 205 testovaných klinických kmenů bylo zjištěno, že 126 kmenů (61,4 %) vytváří biofilmy *in vitro* v hladinách větší nebo stejné jako *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*, který má největší počet kmenů produkujících biofilm. Antimikrobiální rezistence je vrozený rys bakterií. Bakterie tvořící biofilm kromě zvýšené rezistence k AL, mohou dále komplikovat léčbu pacienta. *P. aeruginosa* kmeny tvořící biofilm, se častěji vyskytují ve fenotypech rezistentních na cefalosporiny. Tyto *P. aeruginosa* kmeny tvořící biofilm jsou častěji izolované z kostí a měkkých tkání (Sanchez *et al.*, 2013).

4.3.3 Test MRC u *Pseudomonas aeruginosa*

Abbas *et al.* (2012) popisuje studii synergického účinku N-acetylcysteinu (NAC) a ambroxolu s ciprofloxacinem, cefoperazonem, tobramycinem, amikacinem a imipenem. Synergický účinek byl testován proti předem vytvořeným biofilmům, tvořenými pěti klinickými kmeny *Pseudomonas aeruginosa*. Antimikrobiální účinek antibiotik byl testován stanovením minimální regenerační koncentrací (MRC). Ambroxol vykazoval větší aktivitu antibiotik než antibiotická aktivita NAC. Inhibiční aktivita antibiotik se v přítomnosti sub-

MRC ambroxolu zvýšila až o 16 - 256 jednotek a v přítomnosti sub-MRC NAC až o 4 - 256 jednotek. Společně se sub-MRC ambroxolu byl imipenem nejsilnějším antibiotikem (s poklesem MRC až o 4 - 512 jednotek), následovaný cefoperazonem (8 - 256 jednotek), ciprofloxacinem a amikacinem (až 4 - 32 jednotek). Nejnižší snížení MRC bylo zjištěno u kombinace tobramycinu s ambroxolem (2 - 16 jednotek). V přítomnosti NAC byl tobramycin nejvíce rozšířené antibiotikum (MRC byly sníženy až o 4 - 256 jednotek), následoval imipenem (až 2 - 128 jednotek), amikacin (až 2 - 64 jednotek) a cefoperazonem (až 8 - 32 jednotek), zatímco ciprofloxacín byl nejméně účinný.

Antibiotika fluorochinolony a ciprofloxacín vykazují sníženou rezistenci proti biofilmům tvořeným *P. aeruginosa*. Fluorochinolony, na rozdíl od aminoglykosidů, mohou snadno bez problémů proniknout do biofilmové matrice. Odolnost tohoto biofilmu vůči fluorochinolonom je zprostředkována snížením koncentrace kyslíku, pomalým růstem a zpomalením metabolismu bakterie. Studie prokázala, že efluxní pumpa PA1874 - PA1877 se podílí na specifické rezistenci biofilmu *P. aeruginosa* proti ciprofloxacínu a že tvorba perzistentních bakterií *P. aeruginosa* prokazatelně zvyšuje rezistenci biofilmu na ciprofloxacín.

4.3.4 Efluxní pumpy *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotická rezistence je definována jako zvýšení MIC antibiotika v důsledku trvalé změny v buňce (např. mutace nebo získání odporových funkcí horizontálním přenosem genů). Naproti tomu antibiotická tolerance je definována jako schopnost buněk přežít při expozici antibiotik v důsledku obranného reverzibilního fenotypu. Genom *Pseudomonas aeruginosa* obsahuje geny kódující celkem 12 efluxních pump RND, z nichž některé se podílely na klinické rezistenci a reakci na stresové situace v biofilmu. Biofilmy *Pseudomonas aeruginosa* vykazují zvýšenou expresi několika efluxních pump, včetně MexCD-OprJ a MexXY, které představují mechanismus antibiotické rezistence specifické pro biofilmy *P. aeruginosa* (Mah *et al.*, 2012).

4.3.5 Gen *blaPER-1* kmene *Acinetobacter baumannii*

U klinických izolátů *Acinetobacter baumannii* se objevila souvislost mezi biofilmem a přítomností širokospektré β -laktamázy, zejména genu *blaPER-1*. Celkově bylo 55 izolátů podrobena zkoušce citlivosti metodou disulfidové difuze pro 13 klinicky významných antibiotik. Screening pro produkci biofilmu byl prováděn jak kvalitativními, tak i

kvantitativními metodami pomocí testu zkumavky a mikrotitrační destičky. Přítomnost *blaPER-1* byla zkontrolována pomocí PCR. Klinické izoláty *Acinetobacter baumannii* vykazovaly velmi vysokou rezistenci (> 75 %) na imipenem, cefotaxim, amikacin a ciprofloxacin. Pouze na cefoperazonu, netillinuanorfloxacinu byly kultury citlivé. Rezistence na čtyři antibiotika, jako je amikacin (82 % vs. 17,6 %, $P < 0,001$), ceftioxim (88 % vs. 11 %, $PP < 0,001$), ciprofloxacin (70 % vs. 29 %, 38 % vs. 11 %, $P = 0,039$) byl relativně vyšší u izolátů produkující biofilm než u kmenů, které biofilm neprodukuje. Mikrotitrační test dodatečně detekoval 14 kmenů s nízkou adhezí. Pouze 11 klinických izolátů mělo gen *blaPER-1* a mezi těmito byly dva producenti biofilmů. Zbylé testované kmeny byly kmeny se slabou adhezí k povrchu. Po provedení řady testů se prokázala metoda mikrotitračních destiček velmi citlivá k detekci tvorby biofilmu (Rao *et al.*, 2008).

4.3.6 Eliminace oxidativního stresu *Burkholderia cenocepacia*

Během série experimentů bylo zjištěno, že baktericidní antibiotika (včetně β -laktamů, fluorochinolonů a aminoglykosidů) indukují tvorbu hydroxylových radikálů u *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Biochemické změny, které jsou následkem léčby letálními dávkami těchto baktericidních antibiotik, vytváří intracelulární prostředí, které podporuje tvorbu vysoce škodlivých reaktivních forem kyslíku (ROS). Primární interakce mezi antibiotiky a cílovou látkou stimuluje oxidaci nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADP^+) prostřednictvím elektronového transportního řetězce. Hyperaktivace tohoto transportního řetězce elektronů, který závisí na cyklu trikarboxylové kyseliny (TCA). To stimuluje produkci superoxidů ($\text{O}_2\bullet$). Tento $\text{O}_2\bullet$ poškozují FeS sloučeniny v proteinech, takže Fe^{2+} je k dispozici pro oxidaci na Fe^{3+} ve Fentonově reakci ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}\bullet + \text{OH}^-$). To vede k tvorbě vysoce reaktivního hydroxylového radikálu ($\text{HO}\bullet$), který může poškodit buněčné makromolekuly, což vede k smrti buněk.

Údaje získané u biofilmů *Burkholderia cenocepacia* ošetřených tobramycinem potvrdily, že zabránění vystavení ROS, vytvořeného antibiotiky, je klíčovým faktorem při přežívání v biofilmech. Biofilmy *B. cenocepacia* byly ošetřeny vysokými koncentracemi aminoglykosidového antibiotika tobramycinu a produkce ROS byla zvýšena, ale přibližně 0,1 % buněk přežilo antibiotickou léčbu. Srovnání profilů genové exprese těchto odolných bakterií s bakteriemi nevystavených působení antibiotik odhalilo, že množství genů z TCA cyklu a genů zapojených do transportního řetězce elektronů bylo zredukováno, zatímco množství genů z glyoxylátové dráhy se zvýšilo.

To naznačuje, že přežívající perzistentní bakterie redukují TCA cyklus, aby se zabránilo tvorbě ROS, a současně aktivují alternativní dráhu v podobě glyoxylátové dráhy. Množství perzistentních bakterií přežívající antibiotickou léčbu s vysokými koncentracemi tobramycinu nebo ciprofloxacinu bylo v biofilmech až 1 000krát vyšší než u planktonních bakterií. Výsledek dokazuje, že eliminace oxidativního stresu chrání buňky biofilmu před baktericidními a fungicidními látkami (Van Acker *et al.*, 2014).

4.4 Grampozitivní aerobní a fakultativně anaerobní koky

4.4.1 Adheze *Enterococcus faecalis* k dentinu

V případě perzistentní apikální parodontitidy je *Enterococcus faecalis* běžně izolovaný druh, kde jeho dlouhodobé přežití v systému kořenových kanálků je způsobeno jeho schopností adherovat k dentinu, napadat dentinální tubuly a vytvářet biofilmy, které mohou přispět k rezistenci bakterií a perzistenci po antimikrobiální léčbě. Komplexní anatomie kořenového kanálu představuje potíže při jeho odstraňování, protože biofilmy perzistentních mikroorganismů uvnitř kořene mohou být umístěny na vnitřních stěnách a dalších špatně dostupných místech (Jhajharia *et al.*, 2015).

4.4.2 Biofilm smíšeného typu *Lactobacillus plantarum* a *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae a *Lactobacillus plantarum* dokáží vytvořit biofilm smíšeného typu. Koexistence a symbióza kvasinek s bakteriemi mléčného kvašení se využívá v různých oblastech. Biofilm smíšeného druhu je velmi odolný proti vnějším vlivům v porovnání s jednkulturním biofilmem *S. cerevisiae*. V biofilmu smíšeného typu, byla výroba ethanolu mírně nižší, než v jednkulturním systému *S. cerevisiae*. Přijetí biofilmu smíšených druhů dokázalo vyrobit dostatek ethanolu z 10% nebo 20% glukózy během desetkrát opakovaných vsádkových kultur. V důsledku produkce laktátu bylo pH stabilně udržované pod pH 4, což naznačuje vysokou odolnost proti vnější kontaminaci. Inokulované modelové kontaminanty *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis* nebyly schopny života ve vytvořeném biofilmu. Biofilm smíšeného druhu ze *S. cerevisiae* a *L. plantarum* se používá během etanolové fermentace, pro jeho produktivitu a stabilitu v důsledku vysoké odolnosti vůči vnější kontaminaci (Abe *et al.*, 2013).

4.4.3 Produkce lipázy kmenem *Staphylococcus epidermidis*

Nozokomiální infekce způsobené multirezistentními stafylokoky se stávají problémem v mnoha zdravotnických zařízeních. Hodnocení odolnosti vůči AL u klinických kmenů a od kmenů v neizolované populaci, může přispět k pochopení distribuce a přenosu rezistence.

Výsledky ukázaly, že klinické i kontrolní kmeny byly odolné vůči penicilinu a ampicilinu. Z 98 klinických kmenů bylo 82,6 % rezistentních na gentamycin, 79,6 % na erythromycin, 76,5 % na trimethoprim, 74,5 % ke clindamycinu, 72,4 % na cefalotin a oxacilin a 71,4 % na ciprofloxacin. Všechny kmeny byly citlivé na vankomycin. Mezi klinickými kmeny bylo 72,4 % rezistentních vůči všem testovaným β -laktamovým antibiotikům. Všechny kmeny z neizolované populace a 27,6 % klinických kmenů byly rezistentní pouze na penicilin a ampicilín. Rezistence k těmto antibiotikům se připisuje k produkci penicilinázy nebo β -laktamázy.

Prokázalo se, že extracelulární lipázy jsou patogenní faktory různých mikroorganismů, včetně *Staphylococcus epidermidis*. Lipázy přispívají k přežití mikroorganismů v prostředích, obsahující vysoké koncentrace lipidů a ovlivňují schopnost mikroorganismu proniknout do kůže a napadnout epidermální tkáň. Mezi kmeny *S. epidermidis* bylo 90 % pozitivních na aktivitu lipázy. Proteázy se stejně jako lipázy účastní poškození tkáně a zánětlivé reakce. Proteázy tak činí jako při degradaci signálních peptidů (např. neutrofilních proteinů, antimikrobiálních protilátek), které zprostředkovávají imunitní odpověď (Michelim *et al.*, 2005).

4.4.4 Koordinace *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* a *Actinomyces viscosus*

Monolaurin je glycerol monoester aktivní kyseliny laurové proti širokému spektru bakteriálních kmenů, zvláště grampozitivních bakterií, včetně několika ústních bakterií, jako je *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* a *Actinomyces viscosus*. Monolaurin působí na buněčnou membránu, která ovlivňuje transport látek do buňky. Zoocin A je D-alanyl-L-alanin-endopeptidáza, schopná vázat a štěpit bakteriální peptidoglykan. MIC zoocinu A pro *S. mutans* byla 50 $\mu\text{g/ml}$, zatímco *S. sanguis* a *A. viscosus* byly rezistentní na Zoocin A. MIC lauricidinu pro všechny tři druhy byla 60 $\mu\text{g/ml}$. Jediný *S. mutans* získaný z biofilmu vystavenému lauricidinu, prokázala zvýšenou odolnost k lauricidinu. *S. mutans* vykazuje růst na agaru při 180 $\mu\text{g/ml}$ koncentraci lauricidinu. Subkultura *S. mutans* v BHI obsahující 5 $\mu\text{g/ml}$ lauricidinu se vyvinula v kmen, ve kterém byla MIC pro zoocin A

a lauricidin dvojnásobná než pro *S. mutans*. Subkultura *S. mutans* v BHI bez lauricidinu měla stejnou MIC pro zoocin A a lauricidin jako původní *S. mutans*. Kombinace zoocinu A a lauricidinu byly účinnější při snižování kariogenní aktivity *S. mutans* než použití obou látek samostatně (Lester a Simmonds, 2012).

4.4.5 Modifikace lipidů v membráně *Staphylococcus aureus*

Cytoplazmatická membrána je první bariéra bakterie při kontaktu bakteriální buňky a AL (např. QAC a PHMB). Hydrofilní část QAC reaguje s negativním nábojem cytoplazmatické membrány, zatímco hydrofobní konec QAC silně interaguje s mastnými kyselinami uvnitř cytoplazmatické membrány *Staphylococcus aureus*, což způsobuje přesmyk a poškození membrány. PHMB spolupracuje s povrchově s negativně nabitými kyselými fosfolipidy, což způsobuje jeho agregaci a tím i narušení lipidové dvojvrstvy v membráně. Složení mastných kyselin v membráně, zabezpečuje její průchodnost a může hrát roli v bakteriální rezistenci vůči AL s antimikrobiálním mechanismem proti cytoplazmatické membráně.

Výsledky dokázaly vliv inkubační teploty i doby inkubace na mastné kyseliny v cytoplazmatické membráně kmene *S. aureus*. Rezistence biofilmu je závislá na několika environmentálních faktorech jako je teplota a typ povrchu, které můžou změnit odolnost biofilmu. Tato studie tak naznačuje, že hodnocení dezinfekční účinnosti by se mělo provádět proti biofilmům, vytvořených za různých podmínek, aby se snížilo mikrobiologické riziko související s jejich perzistencí (Abdallah *et al.*, 2014).

4.5 Grampozitivní nesportující aerobní tyčinky

4.5.1 Blokace biofilmu *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je běžně vyskytující se bakterie, odolná proti vysokým koncentracím solí a schopná se množit při nízkých teplotách. Oktenidin hydrochlorid účinně usmrcuje planktonní bakterie a biofilmy *L. monocytogenes* při různých teplotách (od 4 do 37 °C) za produkce organických látek. *L. monocytogenes* mohou tvořit mono – nebo multi-druhy biofilmu. Pro studium multispeciálních biofilmů byly použity různé typy biofilmů *Lactococcus lactis*, které vykazovaly různé struktury, perezitu, typy matic a vlastnosti jednotlivých buněčných povrchů, aby se zjistily faktory upravující počáteční

adhezi *L. monocytogenes* k biofilmům. Adhezi *L. monocytogenes* bylo téměř zabráněno přítomností EPS produkovaného *L. lactis*. Přítomnost biofilmů, které mohou zabránit kontaminaci povrchů *L. monocytogenes*, může představovat nový přístup k eliminaci *L. monocytogenes*. Avšak porézní biofilm *L. lactis* může také zvýšit adhezi biofilmu *L. monocytogenes*.

Adheze biofilmu u *L. monocytogenes* začíná pohyblivostí bičíku. Při eliminaci pohyblivosti bičíku je počáteční adheze biofilmu snížena, ale později vzniká biofilm s vysokou hustotou. Systém sledování peptidu Agr kmene *L. monocytogenes*, který kóduje předpokládaný QS, má úlohu při tvorbě biofilmu vytvořením delečního mutanta AgrD. AgrD mutant měl bez QS sníženou schopnost tvořit biofilm a napadnout intestinální epiteliální buňky. Extracelulární DNA může být centrální složkou matrice biofilmu *L. monocytogenes*, protože léčba DNázou rozptýlila biofilm a exogenní DNA nebyla schopna započít novou tvorbu biofilmu (Jacques *et al.*, 2010).

5 Prevence a odstranění biofilmu

5.1 Inhibice enzymů v biofilmu

V zásadě lze použít několik experimentálních přístupů v boji proti vývoji biofilmu. Zásadní je omezit tvorbu biofilmu, než vznikne zralý biofilm. Profylaktický přístup k inhibici vývoje biofilmu zahrnuje použití léků, které interferují se selektivními biosyntézami prekursorů složek biofilmu nebo léčbu látkami, které blokují počáteční adhezi, akumulaci a agregaci bakterií u vícekmenných kolonií. Inhibice enzymů, které se podílejí na syntéze biofilmu, objasňují funkce, které způsobují blokující enzymy Ica. Důležité jsou inhibitory N-acetyl-D-glukosamin-1-fosfátu acetyl transferáza (GlmU), enzym podílející se na syntéze aktivovaného nukleotidového cukru UDP-GlcNac. Ve skutečnosti je to N-ethyl maleimidový analog, který účinně blokuje účinnost GlmU a tím inhibuje tvorbu biofilmu *Staphylococcus epidermidis* (Speziale *et al.*, 2008).

5.2 Použití nanočástic stříbra pro prevenci vzniku biofilmu

Biofilm lze jen obtížně odstranit, kvůli pevné struktuře EPS. V současných studiích byl prokázán účinek nanočástic stříbra při destrukci biofilmu a prevenci jeho tvorby. Nanočástice stříbra mohou být zapojeny do rozrušení mikrokolonií bakterií v biofilmu nebo do prevence jeho tvorby. Průtok AL v okolí biofilmu nedokázal žádné odstranění bakteriálního biofilmu. Vylučování adhezivních látek (polysacharidů a bílkovin) je zásadní pro počáteční adhezi bakterií, stejně jako udržení biofilmových bakterií v těsné blízkosti. Nanočástice stříbra mohou být zapojeny do neutralizace adhezivních látek, čímž se zabrání tvorbě biofilmu. Bakteriální biofilmy jsou vysoce rezistentní vůči antibiotikům, avšak v blízké budoucnosti mohou nanočástice stříbra určovat významnou roli v léčbě problémů souvisejících s biofilmem. Nanočástice stříbra byly syntetizovány z extraktu listů *Cymbopogon citratus*. Metoda představuje příklad čisté, netoxické a ekologicky šetrné metody pro získání nanočástic stříbra (Masurkar *et al.*, 2012).

5.3 Využití éterických olejů

Antimikrobiální a antibiofilmové vlastnosti éterických olejů máty peprné a rozmarýnu lékařského a chlorhexidinu byly hodnoceny proti *Streptococcus mutans* a *Streptococcus*

pyogenes. Minimální baktericidní koncentrace (MBC) olejů máty peprné a rozmarýnu lékařského a chlorhexidin byly (6 000, 2 000, 8 000 ppm) a (1 000, 4 000, 1 000 ppm) pro *S. mutans* a *S. pyogenes*. Doba eliminace kmene *S. mutans*, vystaveného působením olejů při jejich hladinách MBC byla 2,8 minuty, zatímco chlorhexidin vykazoval delší dobu. Doby eliminací *S. pyogenes* při expozici MBC hladin olejů máty peprné a rozmarýnu lékařského a chlorhexidinu byly 2,14; 4,28 a 2,8 minuty, což naznačuje vyšší účinnost oleje máty peprné. Tvorba biofilmu byla prováděna kultivací kmene *S. mutans* s éterickými oleji a bez nich *in vitro*. Inhibiční vlastnosti biofilmu byly největší u máty peprné, následoval rozmarýn lékařský a chlorhexidin. *In vivo* experimenty na vlastnostech biofilmu ukázaly, že všechny koncentrace olejů jsou účinnější než chlorhexidin. Závěrem lze konstatovat, že éterické oleje mohou být považovány za bezpečné látky při vývoji nových AL (Rasooli *et al.*, 2008).

5.4 Omezení adheze bakterií

Prevence tvorby biofilmu je nezbytným krokem k úspěšné profylaxi infekcí. Jednou z možností omezení biofilmu je inhibice adheze bakterií pomocí modifikací povrchu polymerů. Byla stanovena drsnost povrchu, hustota povrchového náboje a kontaktní úhel modifikovaných polymerů vztažených k adhezii *Staphylococcus epidermidis*. Přestože nebyl pozorován vliv drsnosti povrchu a hustoty náboje na adhezii bakterií, byla pozorována souvislost mezi volnou entalpií adheze (odhadovaná z měření kontaktních úhlů) a adhezí. Existuje určitá minimální adheze bakterií, nezávislá na povaze povrchu polymeru. Modifikované polymery s negativním povrchovým nábojem umožňují adhezii bakterií. Tyto polymery mohou být dále vylepšeny zavedením iontů stříbra na testovaný povrch. Antimikrobiální polymery jsou schopny zabránit bakteriální kolonizaci, která je předpokladem pro tvorbu biofilmu. Předpokládá se, že modifikace polymerů a následná povrchová úprava může být účinným postupem pro prevenci tvorby bakteriálních biofilmů (Ansen a Kohnen, 1995).

5.5 Podávání M1-aktivovaných makrofágů pro eliminaci biofilmu

V první metodě byl vyvolán zánět, lokálním podáváním klasicky aktivovaných M1 makrofágů a v druhém se použilo hojení agonistou receptoru C5a (agonista EP67), který vyvolává zánětlivou odpověď. Včasné podávání M1-aktivovaných makrofágů nebo EP67 významně omezilo tvorbu biofilmu MRSA. Několik prozánětlivých mediátorů bylo

významně zvýšeno u tkáně infikované biofilmem, což odhalilo efektivní přeprogramování prostředí biofilmu do zánětlivé fáze. Podávání neutrofilů nemělo vliv na tvorbu biofilmu.

Léčba zavedených biofilmových infekcí s M1-aktivovanými makrofágy také významně snížila množství biofilmu ve srovnání s léčbou antibiotiky. Zaměření na protizánětlivou aktivitu makrofágů může překonat lokální imunitní inhibiční prostředí vytvořené během infekce biofilmem a představuje novou terapeutickou strategii (Hanke *et al.*, 2013).

5.6 Faktory omezující vznik biofilmu

Tryptofanáza (tzv. Tnáza) je ojedinělý bakteriální enzym v eukaryotických buňkách. Umožňuje produkci amoniaku, indolu a pyruvátu. Signalizace indolu hraje důležitou roli při stabilní udržování plazmidů s jejich vícenásobnými aplikátory. Tnáza je schopna vázat Rcd, krátkou molekulu RNA, která se podílí na rozlišení plazmidových multimerů. Vazba Rcd zvyšuje afinitu tnázy k tryptofanu a bylo zjištěno, že se indol podílí na množení bakterií a tvorbě biofilmu. Optimální a specifické faktory, které interagují s tnázou, mohou být použity jako nástroj pro studium úlohy tohoto multifunkčního enzymu, stejně jako AL, které mohou ovlivnit tvorbu biofilmu (Scherzer *et al.*, 2009).

5.7 Vstřebatelné cementy v artroplatie

Úloha *Propionibacterium acnes* v ramenní artroplastice a ortopedických protetických infekcí je často zanedbávána, přičemž tvorba biofilmu je identifikována jako klíčový faktor virulence, přičítaný invazivním kmenům. Zkoumání vstřebatelných cementů společně s nanesením širokospektré kombinace antibiotik, funguje jako účinná preventivní strategie proti *P. acnes* biofilmům. Působení tvorby biofilmu na nenaloženém syntetickém cementovém korálku ze síranu vápenatého, bylo vyhodnoceno pomocí SEM v průběhu 14 dnů. Korálky s naneseným samotným tobramycinem nebo samotným vancomycinem (jako srovnávací kontrola) a korálky naložené dvojí léčbou vancomycin a tobramycinem byly hodnoceny pro svou schopnost eliminace planktonních bakterií *P. acnes*. Půdní kolonizace *P. acnes* a tvorba biofilmu na korálcích síranu vápenatého byla nedostatečná. Korálky obsahující antibiotika byly schopny usmrtit planktonní kultury obsahující 10⁶ bakterií/ml ve vyrostlé kolonii. Tyto korálky zabránily bakteriální kolonizaci a výrazně snižovaly tvorbu biofilmu v průběhu týdnů. Kompletní eliminace zavedených biofilmů byla dosažena za 1 týden. Studie ukazuje, že korálky síranu vápenatého obsahující antibiotika mohou představovat účinnou antibakteriální

a antibiofilní strategii pro boj s protetickými infekcemi, v nichž se podílí *P. acnes* (Howlin *et al.*, 2017).

5.8 Odstranění biofilmu ze zavedeného implantátu

Při infekci vyvolané biofilmem je antibiotická léčba sama o sobě nedostatečná. Obvyklé léčebné postupy mohou být rozděleny podle toho, zda se v těle vyskytuje zavedený implantát nebo nevyskytuje. Pokud se biofilm vyskytuje na zavedeném implantátu, může dlouhodobá léčba vysokými dávkami antibiotik infekci odstranit. Avšak, pro úspěšný výsledek léčby, je nutné, ve většině případů implantát odstranit. V ostatních případech nastane pouhé snížení vrstvy biofilmu, následované jeho chronickým výskytem (Wu *et al.*, 2015).

5.9 Odstranění biofilmu z močových cest

Biofilm *Pseudomonas aeruginosa* by mohl být odstraněn pomocí streptokinázy, která byla použita jako defibrinující látka. Po kultivaci biofilmu na silikonové podložce v modifikovaném médiu produkujícím alginát *in vitro*, byl tento roztok ošetřen streptokinázou nebo DNázou I. V obou ošetřeních byl biofilm odstraněn v závislosti na koncentraci použitých látek. Streptokináza byla účinná za podmínky, že biofilm byl vystaven více než 625 U/ml (čtvrtina koncentrace léčebné látky) po dobu 3 hodin, dvakrát po sobě při 37 °C. DNázy, DNáza I a streptokináza byly účinné při eliminaci biofilmu *P. aeruginosa in vitro*. V klinické praxi by mohla být streptokináza užitečná při infekci močových cest a odstranění biofilmu *P. aeruginosa* (Nemoto *et al.*, 2003).

5.10 Biofilm v ústní dutině

Perorální biofilmy hrají hlavní roli při onemocnění dutiny ústní. Zubní plak je povrchově spojený a funkčně uspořádaný z multikulturních biofilmů. Kontrola periorálních onemocnění je založena na odstranění zavedených biofilmů z oblastí úst a na odstranění faktorů udržujících zubní plak.

Chlorhexidin se ukázal jako nejúčinnější AL při eliminaci množství plaku. Mechanická eliminace, jako je hoblování kořenů, odstraní většinu biofilmu a naruší bakteriální komplexy na určitém místě. Mění se koncentrace O₂, pH a složení živin ovlivní mikroflóru v zubním plaku. Eliminace zubního plaku může spočívat např. přidáním methylenové modře k dentálním kanálkům, což zvyšuje redox potenciál a může inhibovat *Porphyromonas gingivalis* nebo snižovat přívod živin k biofilmu (Manjunath, 2011).

5.11 Kombinace dezinfekčních prostředků v mlékárenském průmyslu

Standardní programy na čištění a sanitaci v mlékárenských zařízeních prokázaly, že mají proměnlivou schopnost odstraňovat zdejší biofilmy. Agresivní postup (2% hydroxid sodný při 75 °C po dobu 30 minut a následně 1,8% kyseliny dusičné při 75 °C po dobu 30 minut) může způsobit usmrcení termofilních bakterií v biofilmu a odstranit všechny zbytky EPS. Důležitým určujícím faktorem pro snadné odstranění biofilmu mohou být hydrodynamické podmínky, ve kterých se biofilmy vyvíjejí. Například v podmínkách vysokého smykového namáhání jsou biofilmy mnohem odolnější, což může ovlivnit schopnost dezinfekční látky rozpustit a odstranit biofilm. Dezinfekční látky, setkávající se s povrchem biofilmu, se vlivem EPS nedostanou ke všem živým buňkám uvnitř biofilmu. Z tohoto důvodu je důležitá kombinace dezinfekčních látek a teplot (Lowry, 2010).

6 Závěr

Tato práce se zabývá sledováním mechanismu rezistence v biofilmu. Biofilmy se vyznačují složitou strukturou tvořenou z vícekmenných mikrokolonií nebo složenou z extracelulární polymerní substance, která dodává biofilmu strukturu a pevnost.

Kromě lidského těla, může biofilm vznikat na kterémkoliv místě, kde je dostatek živin. Hrubé a hydratované povrchy, představují ideální místo pro zachycení volných planktonních bakterií a následný vznik biofilmu. Mezi patogeny, tvořící biofilm, patří bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Tato gramnegativní nefermentující bakterie se strukturou tyčinky je nenáročná na přísun živin a oxidačně-redukční potenciál. Biofilm kmene *P. aeruginosa* produkuje účinné efluxní pumpy, které zabraňují antimikrobiálnímu účinku. Jeho schopnost tvorby biofilmu v chronických ranách a abiotických materiálech z něho činí jednoho z nejvíce patogenních kmenů.

I přes neustálý vývoj nových antimikrobiálních látek či syntetických povrchů, si bakterie s využitím genové mutace vždy vyvinou rezistentní mechanismus jak opětovně adherovat na povrch nebo zabránit penetraci antimikrobiální látky do biofilmu. Kvůli špatnému použití antimikrobiálních látek se u bakterií stále více vyvíjí rezistence k těmto látkám.

V dnešní době moderního vývoje se přes provedené studie dozvídáme, že antimikrobiální látky přírodního původu, jsou mnohdy účinnější při prevenci vzniku a odstranění biofilmu než synteticky vyrobené antimikrobiální látky.

7 Seznam použité literatury

- ABBAS, H., F. SERRY a E. EL-MASRY. N-acetylcysteine and ambroxol: can mucolytics dissolve the resistance of biofilms to antibiotics. *Research Journal of pharmacy and Technology* [online]. 2012, vol. 5, no. 7, s. 6-917. ISSN 09743618.
- ABDALLAH, M., G. CHATAIGNE, C. BENOLIEL, D. DRIDER et al. Effect of growth temperature, surface type and incubation time on the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, vol. 98, no. 6, s. 2597-607. ISSN 01757598.
- ABE, A., S. FURUKAWA, S. WATANABE a Y. MORINAGA. Yeasts and lactic acid bacteria mixed-specie biofilm formationis a promising cell immobilization technology for ethanol fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2013, vol. 171, no. 1, s. 72-9. ISSN 02732289.
- AL-HAKEIM, H., A. MUHSIN a M. HUSSEIN. Evaluation of the biological activity of a new hydrocortisone derivative against some pathogenic skin fungi. *Clinical Medicine Insights.Dermatology* [online]. 2012, vol. 5, s. 1.
- ANSEN, B. a W. KOHNEN. Prevention of biofilm formation by polymer modification. *Journal of Industrial Microbiology* [online]. 1995, vol. 15, no. 4, s. 391-396. ISSN 0169-4146, 0169-4146.
- BASEER, M., F. ANSARI, Z. ASHRAF a R. SAEEDULLHAG. Synthesis, characterization, anti-inflammatory and *in vitro* antimicrobial activity of some novel alkyl/aryl substituted tertiary alcohols. *Molecules* [online]. 2011, vol. 16, no. 12, s. 10337-10346.
- BLANCHETTE, K. a C. ORIHUELA. Future perspective on host-pathogen interactions during bacterial biofilm formativ within the nasopharynx. *Future Microbiology* [online]. 2012, vol. 7, no. 2, s. 227-39. ISSN 1746-0913.

- BOCKSTAEL, K. a A. VAN AERSCHOT. Antimicrobial resistance in bacteria. *Central European Journal of Medicine* [online]. 2009, vol. 4, no. 2, s. 141-155. ISSN 1895-1058.
- BRIDIER, A., M. SANCHEZ-VIZUETE, D. LE-COQ, S. AYMERICH et al. Biofilms of a *Bacillus subtilis* hospital isolate protect *Staphylococcus aureus* from biocide action. *PLoSOne* [online]. 2012, vol. 7, no. 9.
- BROGDEN, K. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews.Microbiology* [online]. 2005, vol. 3, no. 3, s. 238-50. ISSN 17401526.
- BURLIBASA, M., M. CERNUSCA, C. BURCEA, M. MITARIU et al. Halogen compounds- theoretical, physiological and practical aspects regarding the decontamination, disinfection and sterilisation of instruments and biomaterials in dental medicine practise. *Metalurgia International* [online]. 2013, vol. 18, no. 3, s. 54-57. ISSN 15822214.
- CREEK, D. a M. BARRETT. Determination of antiprotozoal drug mechanisms by metabolomics approaches. *Parasitology* [online]. 2014, vol. 141, no. 1, s. 83-92. ISSN 00311820.
- CZECHOWSKI, M. a P. STOODLEY. Antimicrobials and biofilms. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2002, vol. 29, no. 6, s. 325. ISSN 13675435.
- DERLON, N., A. GRUETTER, F. BRANDENBERGER, A. SUTTER et al. The composition and compression of biofilms developed on ultrafiltration membranes determine hydraulic biofilm resistance. *Water Research* [online]. 2016, vol. 102, s. 63-72. ISSN 0043-1354, 0043-1354.
- DEVAL, J. Antimicrobial strategies: inhibition of viral polymerases by 3'-hydroxyl nucleosides. *Drugs* [online]. 2009, vol. 69, no. 2, s. 151-66. ISSN 00126667.

- DRESZER, C., J. VROUWENVELDER, A. PAULITSCH, A. ZWIJNENBURG, J. KRUITHOF et al. Hydraulic resistance of biofilms. *Journal of Membrane Science*. [online]. 2013, s. 436-447. ISSN 0376-7388, 0376-7388.
- FLEMMING, H. EPS-Then and Now. *Microorganisms* [online]. 2016, vol. 4, no. 4, s. 41.
- GADDY, J. a L. ACTIS. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiology* [online]. 2009, vol. 4, no. 3, s. 273-8. ISSN 1746-0913.
- GURKOK, G., N. ALTANLAR a S. SUZEN. Investigation of antimicrobial activitie of indole-3-aldehyde hydrazide/hydrazone derivatives. *Chemotherapy* [online]. 2008, vol. 55, no. 1, s. 15-9. ISSN 00093157.
- HALE, J. a R. HANCOCK. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Reviewof Anti-Infective Therapy* [online]. 2007, vol. 5, no. 6, s. 951-9. ISSN 1478-7210.
- HALL-STOODLEY, L., J. COSTERTON a P. STOODLEY. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2004, vol. 2, no. 2, s. 95-108. ISSN 17401526.
- HANKE, M., C. HEIM, A. ANGLE, S. SANDERSON et al. Targeting macrophage activation for the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infections. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* [online]. 2013, vol. 190, no. 5, s. 2159-2168.
- HOWLIN, R., C. WINNARD, E. ANGUS, C. FRAPWELL et al. Prevention of *Propionibacterium acnes* biofilm formation in prosthetic infections in vitro. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery* [online]. 2017, vol. 26, no. 4, s. 553-563.
- JACQUES, M., V. ARAGON a Y. TREMBLAY. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Animal Health Research Reviews* [online]. 2010, vol. 11, no. 2, s. 97-121. ISSN 14662523.

- JHAJHARIA, K., A. PAROLIA, K. SHETTY a L. MEHTA. Biofilm in endodontics: A review. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry* [online]. 2015, vol. 5, no. 1. ISSN 22310762
- KAUFMAN, G. Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. *Nursing Standard (through 2013)* [online]. 2011, vol. 25, no. 42, s. 49-55. ISSN 00296570.
- KLEMM, P., V. HANCOCK, M. KVIST a M. SCHEMBRI. Candidate targets for new anti-virulence drugs: selected cases of bacterial adhesion and biofilm formation. *Future Microbiology* [online]. 2007, vol. 2, no. 6, s. 643-53. ISSN 1746-0913.
- KRIVIT, B. a R. HEUERTZ. Bacterial biofilms and HAIs. *Medical Laboratory Observer* [online]. 2011, vol. 43, no. 6, s. 36-9. ISSN 05807247.
- KRÓL, J., A. WOJTOWICS, L. ROGERS, H. HEUER et al. Invasion of *E. coli* biofilms by antibiotic resistance plasmids. *Plasmid* [online]. 2013, vol. 70, no. 1, s. 110-119. ISSN 0147-619X, 0147-619X.
- KWIECINSKA-PIROG, J., K. SKOWRON, W. BARTCZAK a E. GOSPODAREK-KOMKOWSKA. The ciprofloxacin impact on biofilm formation by *Proteus mirabilis* and *P. vulgaris* strains. *Jundishapur Journal of Microbiology* [online]. 2016, vol. 9, no. 4, s. 8-11. ISSN 2008-3645.
- LAGROUH, F., N. DAKKA a Y. BAKRI. The antifungal activity of moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *Journal De Mycologie Medicale* [online]. 2017.
- LANGE, R., H. LOCHER, P. WYSS a R. THEN. The Targets of currently used antibacterial agents: lessons for drug discovery. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2007, vol. 13, no. 30, s. 3140-54. ISSN 13816128.

- LEEKHA, S., C. TERRELL a R. EDSON. General principles of antimicrobial therapy. *Mayo Clinic Proceedings* [online]. 2011, vol. 86, no. 2, s. 156-67. ISSN 00256196.
- LESTER, K. a R. SIMMONDS. Zoocin A and lauricidin in combination reduce *Streptococcus mutant* growth in a multispecies biofilm. *Caries Research* [online]. 2012, vol. 46, no. 3, s. 185-93. ISSN 00086568.
- LOWRY, D. Advances in cleaning and sanitation. *Australian Journal of Dairy Technology* [online]. 2010, vol. 65, no. 2, s. 106-112. ISSN 00049433.
- MAH, T. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology* [online]. 2012, vol. 7, no. 9, s. 1061-72. ISSN 1746-0913.
- MAILLARD, J. a G. MCDONNELL. Selection and use of disinfectants. *In Practice* [online]. 2012, vol. 34, no. 5, s. 292. ISSN 0263841X.
- MAILLARD, J., S. BLOOMFIELD, J. COELHO, P. COLLIER et al. Does microbicide use in consumer products promote antimicrobial resistance? A critical review and recommendations for a cohesive approach to risk assessment. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)* [online]. 2013, vol. 19, no. 5, s. 344-354.
- MANJUNATH, N. Oral biofilm - a microbial home. *International Journal of Clinical Dental Science* [online]. 2011, vol. 2, no. 4. ISSN 22297790.
- MASURKAR, S., P. CHAUDHARI, V. SHIDORE a S. KAMBLE. Effect of biologically synthesised silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* biofilm quenching and prevention of biofilm formation. *IET Nanobiotechnology* [online]. 2012, vol. 6, no. 3, s. 110-114. ISSN 17518741.

- MICHELIM, L., M. LAHUDE, P. ARAUJO, D. GIOVANAZ a G. MULLER. Pathogenic factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 2005, vol. 36, no. 1, s. 17. ISSN 15178382.
- NEMOTO, K., K. HIROTA, K. MURAKAMI, K. TANIGUTI et al. Effect of varidase (streptodornase) on biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy* [online]. 2003, vol. 49, no. 3, s. 121-5. ISSN 00093157.
- NGUYEN, H. a H. YUK. Changes in resistance of *Salmonella Typhimurium* biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. *Food Control*. [online]. 2013, vol. 29, no. 1, s. 236-240. ISSN 0956-7135, 0956-7135
- OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* [online]. 2015, vol. 34, no. 5, s. 877-886. ISSN 0934-9723.
- PATHAN, F., D. VENKATA a S. PANGULURI. Recent patents on antimicrobial peptides. *Recent Patents on DNA and Gene Sequences* [online]. 2010, vol. 4, no. 1, s. 10-16. ISSN 1872-2156, 1872-2156.
- PATIL, V., R. MALI a A. MALI. Systemic anti-microbial agents used in periodontal therapy. *Journal of Indian Society of Periodontology* [online]. 2013, vol. 17, no. 2, s. 162-168. ISSN 0972124X.
- PAULSON, D. Efficacy of preoperative antimicrobial skin preparation solutions on biofilm bacteria. *Association of Operating Room Nurses.AORN Journal* [online]. 2005, vol. 81, no. 3, s. 492-501; quiz 503-6. ISSN 00012092.

- RAO, R., R. KARTHIKA, S. SINGH, P. SHASHIKALA et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian Journal of Medical Microbiology* [online]. 2008, vol. 26, no. 4, s. 333-7. ISSN 02550857.
- RANKOVIC, B., M. KOSANIC a T. STANOJKOVIC. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2011, vol. 11, s. 97.
- RASOOLI, I., S. SHAYEGH, M. TAGHIZADEH a S. ASTANEH. Phytotherapeutic prevention of dental biofilm formation. *Phytotherapy Research: PTR* [online]. 2008, vol. 22, no. 9, s. 1162-1167.
- SANCHEZ, C., K. MENDE, M. BECKIUS, K. AKERS et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infectious Diseases* [online]. 2013, vol. 13, s. 47.
- SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiology* [online]. 2012, vol. 7, no. 8, s. 979-90. ISSN 1746-0913.
- SCHERZER, R., G. GDALEVSKY, Y. GOLDGUR, R. COHEN-LURIA et al. New tryptophanase inhibitors: towards prevention of bacterial biofilm formation. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2009, vol. 24, no. 2, s. 350-355.
- SCHROEDER, M., B. BROOKS a A. BROOKS. The complex relationship between virulence and antibiotic resistance *genes* [online]. 2017, vol. 8, no. 1, s. 39.
- SHAH, N. Reversing resistance: The next generation antibacterials. *Indian Journal of Pharmacology* [online]. 2015, vol. 47, no. 3. ISSN 02537613.

- SOHNLE, P. a B. HAHN. Inhibition of pseudohyphal growth as a neutrophil-mediated host defense mechanism against experimental deep *Candida albicans* infections in mice. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* [online]. 1993, vol. 121, no. 2, s. 235-243. ISSN 0022-2143, 0022-2143.
- SPEZIALE, P., L. VISAI, S. RINDI, G. PIETROCOLA et al. Prevention and treatment of *Staphylococcus* biofilms. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2008, vol. 15, no. 30, s. 3185-95. ISSN 09298673.
- STEENACKERS, H., I. PARIJS, A. DUBEY, K. FOSTER et al. Experimental evolution in biofilm populations. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2016, vol. 40, no. 3, s. 373-397. ISSN 01686445.
- STEWART, P. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology* [online]. 2002, vol. 292, no. 2, s. 107-13. ISSN 14384221.
- TAYLOR, P. a G. WRIGHT. Novel approaches to discovery of antibacterial agents. *Animal Health Research Reviews* [online]. 2008, vol. 9, no. 2, s. 237-46. ISSN 14662523.
- TENKE, P., B. KOVES, K. NAGY, S. HULTGREN, W. MENDLING et al. Update on biofilm infections in the urinary tract. *World Journal of Urology* [online]. 2012, vol. 30, no. 1, s. 51-7. ISSN 07244983.
- TIMOFEEVA, L. a N. KLESHCHEVA. Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2011, vol. 89, no. 3, s. 475-92. ISSN 01757598.
- USHA, H. Biofilm In Endodontics: New Understanding To An Old Problem. *International Journal of Contemporary Dentistry* [online]. 2010, vol. 1, no. 3. ISSN 22293493.

- VAN ACKER, H., P. VAN DIJCK, a T. COENYE. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends in Microbiology* [online]. 2014, vol. 22, no. 6, s. 326-333.
- VESTBY, L. a L. NESSE. Wound care antiseptics – performance differences against *Staphylococcus aureus* in biofilm. *Acta Veterinaria Scandinavica* [online]. 2015, vol. 57. ISSN 0044605X.
- VLAMAKIS, H., Y. CHAI, P. BEAUREGARD, R. LOSICK et al. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews.Microbiology* [online]. 2013, vol. 11, no. 3, s. 157-68. ISSN 17401526.
- VUOTTO, C., F. LONGO, M. BALICE, G. DONELLI et al. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens* [online]. 2014, vol. 3, no. 3, s. 743-758.
- WU, H., C. MOSER, H. WANG, N. HOIBY a Z. SONG. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science* [online]. 2015, vol. 7, s. 1-7. ISSN 16742818.
- WULSTEN, I., T. COSTA-SILVA, J. MESQUITA, M. LIMA et al. Investigation of the anti-leishmania (leishmania) infantum activity of some natural sesquiterpene lactones. *Molecules* [online]. 2017, vol. 22, no. 5, s. 685.
- YAH, C. a G. SIMATE. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. *Daru* [online]. 2015, vol. 23, no. 9, s. 1-14. ISSN 15608115.
- YANG, C., C. HAMEL, V. VUNAJNOVIC a Y. GAN. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. *ISRN Ecology* [online]. 2011. ISSN 20904614.

- ZHANG, J., C. XU, H. SHEN, J. LI et al. Biofilm formation in *Haemophilus parasuis*: relationship with antibiotic resistance, serotype and genetic typing. *Research in Veterinary Science* [online]. 2014, vol. 97, no. 2, s. 171-5. ISSN 00345288.
- ZHOU, G., Q. SHI, X. HUANG a X. XIE. The three bacterial lines of defense against antimicrobial agents. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2015, vol. 16, no. 9, s. 21711-21733.