

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

Katedra biologických a biochemických věd

Sledování tvorby biofilmu u bakterií izolovaných z chronických ran

Bc. Lenka Jemelková

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Jemelková**
Osobní číslo: **C16475**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Sledování tvorby biofilmu u bakterií izolovaných z chronických ran**
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. Vypracujte literární rešerši na téma nových trendů sledování tvorby a detekce biofilmu u bakterií izolovaných z chronických ran.
2. Otestujte spektrofotometricky tvorbu biofilmu jak u sbírkových kmenů, tak u kmenů klinických, získaných ze stěrů nehojících se ran.
3. Porovnejte tvorbu biofilmu u bakterií izolovaných z chronických ran a u sbírkových kmenů bakterií.
4. Získané výsledky zhodnoťte, vyvoďte závěry a porovnejte s dostupnou literaturou.
5. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa 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 diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Petra Mořková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Ing. Iveta Brožková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

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 1. 5. 2018

Bc. Lenka Jemelková

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí své diplomové práce Ing. Petře Mořkové, Ph.D. a konzultantce Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za pomoc, cenné rady a vstřícnost při vypracovávání diplomové práce. Ráda bych také poděkovala své rodině za podporu během studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá sledováním tvorby biofilmu u bakterií izolovaných z chronických ran. Práce zahrnuje informace o vzniku biofilmu, jeho funkci a vlivu na hojení ran. Dále jsou popsány bakterie přítomné v chronických ranách a způsoby odstranění vzniklého biofilmu. V neposlední řadě je v práci uveden přehled metod používaných k detekci tvorby biofilmu, se zaměřením na bakterie vyskytující se v nehojících se ránách. V experimentální části byla ke sledování tvorby biofilmu použita Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách. Tvorba biofilmu u bakterií izolovaných z chronických ran byla vyhodnocena a porovnána se sbírkovými kmeny.

KLÍČOVÁ SLOVA

biofilm, chronické rány, detekce tvorby biofilmu, Christensenova metoda, mikrotitrační destičky

TITLE

Detection of biofilm formation in bacteria isolated from chronic wounds

ANNOTATION

This thesis deals with monitoring of biofilm formation in bacteria isolated from chronic wounds. The work includes informations about biofilm formation, its function and influence on wound healing. The thesis also describes bacteria isolated from chronic wounds and treatment for the removal and prevention of biofilm. The work provides an overview of methods used for biofilm detection, mainly focused on bacteria isolated from non-healing wounds. In the experimental part is used the Christensen's method in microtiter plates. Biofilm formation of bacteria isolated from chronic wounds was evaluated and compared with culture microorganisms.

KEYWORDS

biofilm, chronic wounds, detection of biofilm formation, Christensen's method, microtiter plates

OBSAH

| | |
|---|----|
| Seznam obrázků..... | 9 |
| Seznam tabulek..... | 10 |
| Seznam grafů..... | 11 |
| Seznam zkratk a značek..... | 12 |
| ÚVOD..... | 14 |
| 1 TEORETICKÁ ČÁST..... | 15 |
| 1.1 Biofilm..... | 15 |
| 1.1.1 Vznik biofilmu..... | 16 |
| 1.1.2 Quorum sensing..... | 17 |
| 1.1.3 Funkce biofilmu a jeho nežádoucí vliv..... | 18 |
| 1.2 Chronické rány a biofilm..... | 20 |
| 1.2.1 Definice chronických ran..... | 20 |
| 1.2.2 Bakterie v chronických ranách..... | 22 |
| 1.3 Zabránění tvorby biofilmu..... | 25 |
| 1.3.1 Postup odstranění biofilmu..... | 25 |
| 1.3.2 Debridement..... | 26 |
| 1.3.3 Antimikrobiální obvazy..... | 26 |
| 1.4 Detekce biofilmu..... | 27 |
| 1.4.1 Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách..... | 27 |
| 1.4.2 Kultivace na agaru s kongo červení..... | 30 |
| 1.4.3 Mikroskopické metody..... | 32 |
| 1.4.4 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace..... | 35 |
| 1.4.5 Polymerázová řetězová reakce..... | 37 |
| 2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE..... | 40 |
| 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | 41 |
| 3.1 Použité chemikálie, přístroje, pomůcky a živná média..... | 41 |
| 3.1.1 Chemikálie..... | 41 |
| 3.1.2 Přístroje..... | 41 |
| 3.1.3 Pomůcky..... | 41 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.1.4 | Živná média a pracovní roztoky | 42 |
| 3.2 | Použité mikrobiální kmeny | 44 |
| 3.3 | Uchovávání kmenů a příprava suspenze | 45 |
| 3.4 | Detekce biofilmu pomocí Christensenovy metody v mikrotitračních destičkách | 46 |
| 4 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 47 |
| 4.1 | Christensenova metoda | 47 |
| 4.1.1 | Optimalizace jednotlivých kroků Christensenovy metody | 47 |
| 4.1.2 | Interpretace výsledků Christensenovy metody | 48 |
| 4.1.3 | Růst planktonních buněk v testovaných médiích | 52 |
| 4.1.4 | Tvorba biofilmu u testovaných mikroorganismů..... | 60 |
| 5 | ZÁVĚR | 68 |
| 6 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 69 |
| 7 | PŘÍLOHY | 78 |

Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obrázek 1 - Vývojová stádia tvorby biofilmu | 16 |
| Obrázek 2 - Fotografie vybraných chronických ran | 21 |
| Obrázek 3 - Mikrotitrační destička ukazující různou schopnost mikroorganismů tvořit biofilm | 28 |
| Obrázek 4 - Růst bakterií na agaru s kongo červení | 31 |
| Obrázek 5 - Mikroskopické zobrazení části vzorku z debridementu od pacienta s diabetickou nohou | 33 |
| Obrázek 6 - Snímek vícedruhového biofilmu pořízený SEM..... | 34 |
| Obrázek 7 - Biofilm kmene <i>Pseudomonas aeruginosa</i> v chronické ráně - vizualizace pomocí PNA-FISH s konfokální laserovou skenovací mikroskopií..... | 37 |
| Obrázek 8 - Gelová elektroforéza PCR produktů | 39 |

Seznam tabulek

| | |
|--|----|
| Tabulka 1 - Diagnostické znaky infekce chronických ran..... | 22 |
| Tabulka 2 - Výskyt bakterií v chronických ranách, analýza vzorků od 2963 pacientů pomocí 16S rDNA pyrosekvenování..... | 23 |
| Tabulka 3 - Mc Farlandova zákalová stupnice | 43 |
| Tabulka 4 - Použité kmeny izolované z chronických ran | 45 |
| Tabulka 5 - Rozdělení testovaných kmenů do kategorií podle jejich schopnosti tvořit biofilm | 50 |

Seznam grafů

| | |
|--|----|
| Graf 1 - Porovnání růstu <i>Proteus species</i> ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C..... | 52 |
| Graf 2 - Porovnání růstu <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C..... | 53 |
| Graf 3 - Porovnání růstu <i>Pseudomonas putida</i> ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C..... | 54 |
| Graf 4 - Porovnání růstu <i>Serratia marcescens</i> ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C..... | 55 |
| Graf 5 - Porovnání růstu <i>Staphylococcus aureus</i> ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C..... | 56 |
| Graf 6 - Porovnání růstu <i>Staphylococcus epidermidis</i> ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C..... | 57 |
| Graf 7 - Porovnání růstu <i>Staphylococcus intermedius</i> ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C..... | 58 |
| Graf 8 - Porovnání růstu <i>Streptococcus agalactiae</i> ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C..... | 59 |
| Graf 9 - Porovnání tvorby biofilmu <i>Proteus species</i> ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C..... | 60 |
| Graf 10 - Porovnání tvorby biofilmu <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C..... | 61 |
| Graf 11 - Porovnání tvorby biofilmu <i>Pseudomonas putida</i> ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C..... | 62 |
| Graf 12 - Porovnání tvorby biofilmu <i>Serratia marcescens</i> ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C..... | 63 |
| Graf 13 - Porovnání tvorby biofilmu <i>Staphylococcus aureus</i> ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C..... | 64 |
| Graf 14 - Porovnání tvorby biofilmu <i>Staphylococcus epidermidis</i> ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C..... | 65 |
| Graf 15 - Porovnání tvorby biofilmu <i>Staphylococcus intermedius</i> ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C..... | 66 |
| Graf 16 - Porovnání tvorby biofilmu <i>Streptococcus agalactiae</i> ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C..... | 67 |

Seznam zkratek a značek

| | |
|------------------------|--|
| BHI | bujón z mozkosrdcové infúze |
| cfu | kolonie tvořící jednotky |
| CLSM | konfokální laserová skenovací mikroskopie |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| EMA | ethidium monoazid |
| FISH | fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace |
| EPS | extracelulární polymerní látky |
| MPA | masopeptonový agar |
| MRSA | methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| Pel | polysacharid kódovaný operonem Pel |
| PMA | propidium monoazid |
| PNA | peptidová nukleová kyselina |
| PNA-FISH | fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace používající peptidovou nukleovou kyselinu |
| <i>Ps. putida</i> | <i>Pseudomonas putida</i> |
| Psl | polysacharid kódovaný operonem Psl |
| qPCR | kvantitativní polymerázová řetězová reakce |
| rDNA | ribozomální deoxyribonukleová kyselina |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>S. epidermidis</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| <i>S. intermedius</i> | <i>Staphylococcus intermedius</i> |
| SEM | skenovací elektronová mikroskopie |
| <i>Ser. marcescens</i> | <i>Serratia marcescens</i> |
| sp. | specie, blíže neurčený druh příslušného rodu |
| spp. | species, blíže neurčené druhy příslušného rodu |

| | |
|------------------------|------------------------------------|
| <i>Str. agalactiae</i> | <i>Streptococcus agalactiae</i> |
| TEM | transmisní elektronová mikroskopie |
| TIME postup | postup léčby chronických ran |
| TSB | trypton-sojový agar |
| UV záření | ultrafialové záření |

ÚVOD

Bakterie se vyskytují ve dvou formách, a to ve formě planktonních buněk nebo ve formě biofilmu. Biofilm je společenstvo mikroorganismů, které je vázané k určitému povrchu a obklopené polysacharidy, které bakterie v biofilmu vylučují. Existence v biofilmu je pro bakterie z mnoha důvodů výhodnější. Biofilm umožňuje bakteriím odolávat mechanickému poškození, vysušení, ultrafialovému záření, imunitnímu systému hostitele a ošetření antimikrobiálními prostředky.

Mezi nejčastěji se vyskytující infekce, které jsou způsobené bakteriemi ve formě biofilmu, patří chronické plicní infekce, infekce chronických ran, chronické záněty středního ucha a infekce různých druhů implantátů.

Sledování tvorby biofilmu je velmi důležité, protože biofilm tvoří významný faktor patogenity a znalost přítomnosti biofilmu v infekcích by měla mít vliv na postup při léčbě pacienta. Závažnost těchto infekcí je dána především zvýšenou rezistencí bakterií v biofilmu vůči antimikrobiálním látkám.

K detekci biofilmu se využívá celá řada metod, mezi které patří metody kultivační, mikroskopické a metody založené na molekulární biologii. Vzhledem k nevýhodám jednotlivých metod lze nejlepších výsledků dosáhnout jejich vzájemnou kombinací.

Tato diplomová práce je zaměřena na problematiku tvorby a detekce bakteriálních biofilmů u patogenních mikroorganismů vyskytujících se v chronických ranách. Biofilm byl detekován Christensenovou metodou v mikrotitračních destičkách. Cílem bylo porovnat tvorbu biofilmu u bakterií izolovaných z chronických ran se sbírkovými kmeny.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Biofilm

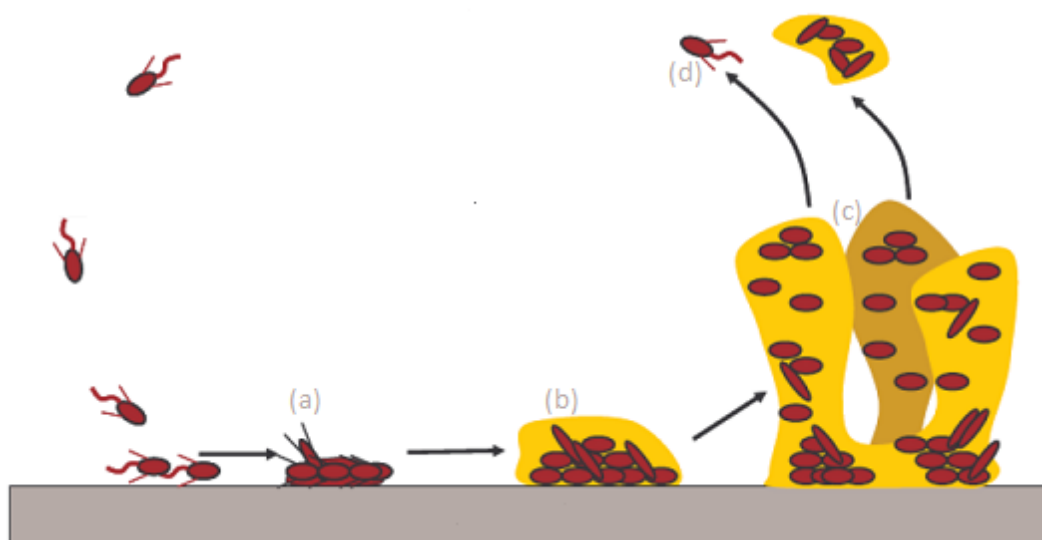
Biofilm je společenství mikroorganismů, které je často připevněné na povrch nebo navzájem k sobě a obalené extracelulárními polymerními látkami (EPS) (Percival *et al.*, 2010). Většina biofilmu se skládá z EPS (80-85%) a zbývající část ze samotných mikroorganismů (Omar *et al.*, 2017). Bakteriální biofilmy mohou být jednodruhové nebo vícedruhové (Malic *et al.*, 2009). Objevují se skoro ve všech prostředích bohatých na mikroorganismy, a to jak v přírodních, tak humánních (Steele *et al.*, 2014).

EPS hrají významnou úlohu při hojení ran. Skládají se ze složité směsi polysacharidů, proteinů, glykolipidů a deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Jejich složení je dáno přítomnými mikroorganismy a vnějším prostředím, které biofilm obklopuje. Z funkčního hlediska jsou EPS významná pro zrání biofilmu, kromě jiných mechanismů podporují vlastní rezistenci biofilmu k antimikrobiálním látkám a imunitnímu systému hostitelského organismu. EPS působí jako „lešení“, jsou schopny vázat a uchovávat živiny, enzymy a ionty kovů (např. ionty železa). To vše podporuje biofilm a udržuje jeho stabilitu, a tím napomáhá přežití mikroorganismů (Percival *et al.*, 2010). Toto uspořádání umožňuje bakteriím dlouhodobě přežít v prostředí a odolávat mechanickému poškození, vysušení, UV záření a ošetření antimikrobiálními prostředky (Purkrťová a kol., 2009). Biofilm také vytváří vhodné fyzikálně-chemické prostředí, jako je například snížený oxidačně-redukční potenciál (Chandki *et al.*, 2011).

Bylo zjištěno, že molekulární mechanismy, které regulují tvorbu biofilmu, se velmi liší nejen mezi různými druhy, ale i mezi různými kmeny stejného druhu. Všechny biofilmy obsahují EPS, které drží buňky pohromadě a jejich složení závisí na růstových podmínkách, médiu a substrátu. Například druh *Pseudomonas aeruginosa* tvoří biofilm tím, že produkuje tři odlišné exopolysacharidy - alginát, Pel a Psl polysacharidy. Význam a přínos každého exopolysacharidu se liší v závislosti na studovaný kmen (López *et al.*, 2010).

1.1.1 Vznik biofilmu

Tvorba biofilmu zahrnuje následující kroky (viz Obrázek 1). Prvním krokem (a) je reverzibilní přichycení planktonních bakterií na povrch prostřednictvím pil, flagel nebo specifických receptorů. Druhým krokem (b) je nevratná adheze pomocí sekrece EPS. Dalšími kroky (c) jsou proliferace buněk, růst a diferenciace, které jsou zakončeny zralým biofilmem s charakteristickými strukturálními rysy, jako jsou mohutné klastry buněk s vodními kanálky, které umožňují přísun živin i do hlubších vrstev biofilmu. Konečným krokem (d) je uvolňování buněk biofilmu aktivním nebo pasivním odpojením (Clinton a Carter, 2015; Holá, 2012).



Obrázek 1 - Vývojová stádia tvorby biofilmu (Soumya *et al.*, 2012)

(a) přichycení planktonních bakterií, (b) nevratná adheze, (c) proliferace a maturace, (d) uvolňování buněk biofilmu

Koncentrace živin v přírodě jsou vyšší na površích než koncentrace živin v roztoku. Proto jsou povrchy pro bakterie velmi vhodným prostředím a koncentrace mikroorganismů na povrchu jsou vždy vyšší než v okolí. Biofilmy se tvoří jak na anorganických površích, tak i na živých organismech. Vhodné podmínky na površích zajišťují volné statické náboje, které usnadňují adsorpci bakterií (Lhotský, 2015).

1.1.2 Quorum sensing

Bakterie žijící v biofilmu produkují signální molekuly, tzv. quorum sensing, které jim umožňují působit jako komplexní mnohobuněčné společenství (Percival *et al.*, 2012; Clinton a Carter, 2015). Bakterie využívají quorum sensing ke koordinaci tvorby biofilmu, virulence a odolnosti vůči antibiotikům. Tyto molekuly se mohou vyskytovat u jednoho druhu bakterií, ale i mezi různými druhy, můžou regulovat celou řadu různých procesů a vycházejí z hustoty bakteriální populace, slouží tedy jako indikátor hustoty populace nebo rychlosti šíření buněk do prostředí. Mezi tyto signály patří řada různých molekul. Nejběžnější třídy signálních molekul jsou oligopeptidy u grampozitivních bakterií, N-acyl-homoserin laktony u gramnegativních bakterií a autoinduktor-2 u grampozitivních i gramnegativních bakterií (Miller a Bassler, 2001).

Je známo, že bakterie, které přecházejí z planktonního stavu do stavu, v němž tvoří biofilmy, prodělávají fyziologické a morfologické změny, které jsou dány zvýšeným množstvím signálů v jejich okolí (Lhotský, 2015). Dochází také k výrazným rozdílům na úrovni genové transkripce. Rozdíly v genové expresi buněk způsobují i změnu fenotypu buněk v biofilmu (Kvasničková a kol., 2016). Například bylo prokázáno, že roste-li druh *Pseudomonas aeruginosa* v biofilmu, tak exprimuje navíc dalších 73 genů, v porovnání s jeho planktonní formou. Modulace genové exprese bakterií je důležitá pro udržení mikrobů na povrchu a pomáhá připravit mikroorganismy na rychlou adaptaci během nepříznivých vnějších podmínek (Percival *et al.*, 2010).

Biofilmy jsou skoro vždy tvořeny více druhy bakterií. V mnoha případech mohou být biofilmy extrémně rozmanité. Důsledkem existence vícedruhových biofilmů jsou mezidruhové interakce, které ovlivňují nejen strukturu a organizaci společenství, ale také jejich funkci (Tan *et al.*, 2017).

Vícedruhové biofilmy umožňují mikroorganismům s různým genetickým a fyziologickým potenciálem spolu interagovat, což ovlivňuje vývoj a funkci těchto komunit. Obecně lze mezidruhové interakce rozlišit na mezidruhové kooperativní interakce, které vedou k výhodám pro jeden nebo všechny druhy, nebo kompetitivní, které vedou ke snížení produktivity pro některé nebo všechny druhy. Existují také neutrální interakce, u kterých nebyly nalezeny významné působení mezi druhy (West *et al.*, 2007). Jako příklad mezidruhové kooperativní interakce lze uvést biofilm tvořený bakteriemi rodu *Pseudomonas*

a *Acinetobacter*, který jim umožňuje vstřebávat nebo odstraňovat uhlovodíky a jiné látky, které jednodruhové populace nemohou (Christensen *et al.*, 2002).

1.1.3 Funkce biofilmu a jeho nežádoucí vliv

Biofilmy zajišťují důležitou funkci v ekosystému, včetně stabilizace sedimentu, primární produkce a oběhu živin. Bakterie rodu *Pseudomonas* asociují v přírodě s kořeny rostlin, u nichž bakteriální biofilm podporuje růst rostliny (Steele *et al.*, 2014). Z pozitivních vlivů dále můžeme jmenovat kolonizaci gastrointestinálního traktu, kde mikrobiální biofilm chrání sliznici před infekcí patogenními kmeny.

Nežádoucí přítomnost biofilmu můžeme nalézt v potravinářském průmyslu, například při výrobě mléka, piva nebo zpracování masa. Nejčastěji jsou potraviny znehodnoceny biofilmy, které jsou tvořeny druhy *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* nebo bakteriemi rodu *Salmonella*. S negativním vlivem biofilmů se ale setkáváme především v lékařství, kde infekce tvořené biofilmy jsou problematické hlavně kvůli jejich obtížné eliminaci. Buňky v biofilmu jsou vysoce rezistentní vůči dezinfekčním a antimikrobiálním látkám. Uvádí se, že jsou až 1000x více odolné než planktonní buňky (Kvasničková a kol., 2016). Infekce způsobené bakteriemi přítomnými v biofilmu mají pak velký dopad na selhávání zdravotnických prostředků (Malic *et al.*, 2009).

Mezi nejčastější infekce způsobené bakteriemi, které se vyskytují se v biofilmu, patří chronické plicní infekce u pacientů trpících cystickou fibrózou nebo tuberkulózou, chronické záněty středního ucha, vrozené záněty endokardu chlopní, parodontální onemocnění a zubní kaz, obtížně se hojící rány a infekce různých druhů implantátů, a to nejčastěji centrálních žilních katétrů k podávání tekutin, výživy a léčiv, močových katétrů, zubních a kloubních implantátů (Kvasničková a kol., 2016; Malone *et al.*, 2017).

Biofilm lze také nalézt u bakteriálních vaginóz a kandidových vulvovaginitid. Schopnost tvořit biofilm byla experimentálně prokázána u druhu *Gardnerella vaginalis*. Bakterie rodu *Gardnerella* se v biofilmu lépe přizpůsobí relativně chudému prostředí na živiny a lépe odolávají stresovým vlivům, jako je antibiotická léčba. Bakterie rodu *Gardnerella* izolované od pacientek s bakteriální vaginózou mají zřetelně lepší schopnost tvořit biofilm a také vyšší cytotoxicitu a přilnavost k buňkám vaginálního epitelu. Schopnost tvořit biofilm na vaginální sliznici mají také kvasinky rodu *Candida*. Prostřednictvím myšího modelu bylo prokázáno, že vaginální biofilm druhu *Candida albicans* má typickou strukturu, včetně

polysacharidové matrix, a jeho vznik je podmíněn tvorbou pseudomycelia (Špaček a kol., 2013).

Nejběžnější původci bakteriálních infekcí jsou obecně druhy *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, bakterie rodů *Streptococcus* a *Enterococcus* anaerobní bakterie (např. *Clostridium* spp.) a kvasinky (např. *Candida albicans*) (Kvasničková a kol., 2016).

1.2 Chronické rány a biofilm

Chronické rány představují závažný a rostoucí problém, který postihuje celosvětově miliony lidí (Trøstrup *et al.*, 2016). Zdlouhavá léčba chronických ran představuje vysoké náklady na zdravotní péči. Hojení chronických ran je zpomaleno přítomností bakterií, které tvoří biofilm (Clinton a Carter, 2015).

Mnoho výzkumů dokázalo, že bakterie mají schopnost tvořit biofilm v akutních i chronických ranách (Malic *et al.*, 2009). Většina dřívějších výzkumů bakteriální patogeneze se zaměřovala na akutní infekce, u kterých se předpokládá, že obsahují planktonní bakterie, které jsou obecně léčitelné antibiotiky. Úspěšnost jejich léčby samozřejmě závisí na přesné a rychlé diagnostice. Chronické infekce mají pomalejší průběh než infekce akutní, jejich příznaky jsou často neurčité a velmi často jsou tyto infekce způsobené biofilmy (Bjarnsholt, 2013; Costerton, 2007).

Odlišnou prognózu akutních a chronických ran může vysvětlit schopnost bakterií tvořit biofilm. Jako příklad lze uvést výsledky elektronové mikroskopie, pomocí níž byly analyzovány bioptické vzorky z akutních a chronických ran. Rysy biofilmu vykazovalo 60 % vzorků z chronických ran, kdežto u vzorků z akutních ran byl biofilm pozorován ve výrazně menším zastoupení (6%) (Percival *et al.*, 2012).

1.2.1 Definice chronických ran

Rána je definována jako porušení celistvosti kůže, která tvoří bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím. Pojmem chronická rána nebo jinak také nehojící se rána je označována taková porucha integrity kožního krytu, která i přes odpovídající léčbu po dobu 6-9 týdnů nevykazuje známky hojení. Tyto rány jsou charakterizovány trvalou zánětlivou fází spojenou s nadměrnou akumulací a zvýšenou buněčnou aktivitou neutrofilů. Nejčastěji se tvoří v troficky změněných tkáních v důsledku předešlého poškození cévního původu. Chronické rány zahrnují syndrom diabetické nohy, bércové vředy, dekubity, exulcerující malignity, *per secundam* se hojící operační rány a kožní vředy v terénu lymfedému (Pokorná a Mrázová, 2012; Frykberg a Banks, 2015).

Vybrané chronické rány jsou zobrazeny na Obrázku 2.



Obrázek 2 - Fotografie vybraných chronických ran (Hojení ran, 2017)

(1) bérkový vřed, (2) arteriální kožní vřed, (3) dekubitus, (4) kožní vřed v terénu lymfedému

Mezi charakteristické znaky infekce chronických ran patří abnormální granulační tkáň, krvácení z granulační tkáně na povrchu rány, rozpad a zvětšování rány. Vyskytují se také změny v barvě lůžka rány z červené na zelenou, žlutou nebo černou. Rostou zánětlivé příznaky, bolest a zápach. Dalšími rysy jsou tvorba abscesu, zvýšený exsudát a macerace pokožky a nad očekávání opožděné hojení rány (Leaper *et al.*, 2015).

Chronické rány jsou významnou a často nerozpoznanou příčinou nemocí a postižení u starší populace. Tyto rány skrývají různorodou mikroflóru, která přispívá přímo i nepřímo k jejich obtížné léčbě. Vlhký povrch chronických ran s jeho proteinovým podkladem a také přísun živin představují ideální prostředí pro rozvoj biofilmu. Biofilmy jsou přítomny ve většině chronických ran a pravděpodobně se vyskytují jak na povrchu, tak i v hlubších vrstvách a nemusí být v ráně rovnoměrně rozmístěny (Schultz *et al.*, 2017).

Diagnostické znaky, které byly navrženy k rozpoznání přítomnosti biofilmu v chronických ranách jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1 - Diagnostické znaky infekce chronických ran (upraveno dle Leaper *et al.*, 2015)

| Diagnostické znaky infekce chronických ran |
|--|
| Mikrobiologický důkaz infekce spojené s cizím tělesem |
| Mikroskopický důkaz mikrobiálních shluků ze SEM nebo CLSM |
| Recidivující infekce bakteriemi, které jsou klonálně identické |
| Přetrvávající infekce navzdory správné dávce a vhodné době trvání antimikrobiálního přípravku |
| Přítomnost lokálních nebo systémových příznaků infekce, které odezní po vhodné antimikrobiální terapii, ale po ukončení terapie se vrátí |
| Lůžko, které silně vylučuje nebo je pokryté fibrózním nebo nekrotickým materiálem, který vyžaduje opakovaný debridement |

1.2.2 Bakterie v chronických ranách

Druh bakterií a jejich množství se významně liší u jednotlivých ran (Omar *et al.*, 2017). Za použití klasických kultivačních technik je nejčastěji izolovaným mikroorganismem z bércových vředů druh *Staphylococcus aureus*. Mezi další nejčastěji izolované druhy patří *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, koaguláza negativní bakterie rodu *Staphylococcus* a bakterie rodu *Proteus*. Z anaerobních bakterií jsou nalézány druhy *Enterobacter cloacae*, *Peptostreptococcus magnus*, *Corynebacterium striatum* a plísně. Za použití molekulárních technik byly v chronických ranách identifikovány druhy rodů *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Peptoniphilus*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Fingoldia* a *Serratia* (Scali a Kunimoto, 2013).

Wolcott *et al.* (2016) analyzovali pomocí 16S rDNA pyrosekvenování složení bakteriálních komunit přítomných ve vzorcích získaných od pacientů s chronickými diabetickými vředy (910 vzorků), bércovými vředy (916 vzorků), dekubity (767 vzorků) a nehojícími se chirurgickými ranami (370 vzorků). Vzorky z ran obsahovaly vysoký podíl druhů rodů *Staphylococcus* a *Pseudomonas*, a to u 63 a 25 % všech ran. Byla také pozorován vysoký výskyt anaerobních bakterií a bakterií tradičně považovaných za komenzální mikroorganismy (viz Tabulka 2).

Tabulka 2 - Výskyt bakterií v chronických ranách, analýza vzorků od 2963 pacientů pomocí 16S rDNA pyrosekvenování (Wolcott *et al.*, 2016)

| Druh | Nehojící se chirurgické rány | | Syndrom diabetické nohy | | Proleženiny | | Bércové vředy | |
|---|------------------------------|----|-------------------------|----|--------------|----|---------------|----|
| | Počet vzorků | % | Počet vzorků | % | Počet vzorků | % | Počet vzorků | % |
| <i>Anaerococcus vaginalis</i> | 40 | 11 | 120 | 13 | 159 | 21 | 122 | 13 |
| <i>Corynebacterium jeikeium</i> | | | | | 47 | 6 | | |
| <i>Corynebacterium striatum</i> | 42 | 11 | 105 | 12 | 120 | 16 | 90 | 10 |
| <i>Corynebacterium tuberculostearicum</i> | 54 | 15 | 121 | 13 | 85 | 11 | 145 | 16 |
| <i>Delftia acidovorans</i> | 20 | 5 | 49 | 5 | 59 | 8 | 52 | 6 |
| <i>Enterobacter hormaechei</i> | | | 27 | 3 | 53 | 7 | | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 54 | 15 | 159 | 17 | 119 | 16 | 103 | 11 |
| <i>Finegoldia magna</i> | 74 | 20 | 226 | 25 | 259 | 34 | 194 | 21 |
| <i>Flavobacterium succinicans</i> | | | | | | | 74 | 8 |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 18 | 5 | | | 50 | 7 | | |
| <i>Prevotella bivia</i> | | | 46 | 5 | 57 | 7 | 38 | 4 |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | 51 | 14 | | | | | 103 | 11 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 11 | 3 | 35 | 4 | 67 | 9 | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 54 | 15 | 130 | 14 | 144 | 19 | 186 | 20 |
| <i>Serratia nematodiphila</i> | 16 | 4 | 43 | 5 | | | 44 | 5 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 108 | 29 | 297 | 33 | 226 | 29 | 316 | 34 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 119 | 32 | 343 | 38 | 218 | 28 | 318 | 35 |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 62 | 17 | 194 | 21 | 88 | 11 | 212 | 23 |
| <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | 53 | 14 | 160 | 18 | 111 | 14 | 159 | 17 |
| <i>Staphylococcus pettenkoferi</i> | | | 81 | 9 | | | 35 | 4 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 103 | 28 | 142 | 16 | 139 | 18 | 170 | 19 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 19 | 5 | 90 | 10 | 57 | 7 | 61 | 7 |
| <i>Streptococcus salivarius</i> | 29 | 8 | | | | | | |

Malone *et al.* (2017) shrnuli výsledky několika studií, které se zabývaly výskytem bakteriálních biofilmů v chronických ranách. Ze 185 vzorků získaných z chronických ran, které obsahovaly 33 vzorků z diabetických vředů, 67 vzorků z žilních vředů, 26 vzorků z dekubitů, 28 vzorků z nehojících se chirurgických ran a 31 vzorků z nespecifikovaných chronických ran, byl výskyt biofilmu potvrzen u 78 % vzorků.

Ve špatně se hojících ranách lze prokázat komplexní mikrobiální společenstva (Holá, 2012). Některé studie uvádějí, že vícedruhové biofilmy mohou způsobit mnohem vážnější infekce, které jsou mnohem odolnější vůči terapii než jednodruhové biofilmy. Smíšené biofilmy kmene *Staphylococcus aureus* s nízkou denzitou buněk kmene *Pseudomonas aeruginosa* vykazovaly větší míru infekce na potkaních modelech (Hendricks *et al.*, 2001). Stejně tak bakterie rodu *Prevotella* zvyšovaly patogenitu biofilmů tvořených kmenem *Staphylococcus aureus* (Mikamo *et al.*, 1998). Kromě toho bylo zjištěno, že metabolity kmene *Pseudomonas aeruginosa* chrání kmen *Staphylococcus aureus* před usmrcením zprostředkovaným aminoglykosidy (Hoffman *et al.*, 2006).

1.3 Zabránění tvorby biofilmu

První strategie v boji s biofilmem je preventivní a spočívá v zabránění adheze bakterií na daný materiál, a tím předejití vzniku biofilmu. Druhou strategií je odstranění již vzniklého biofilmu (Kvasničková a kol., 2016).

Terapie ran infikovaných biofilmem je velmi složitá a je spojena s problematickým stanovením vhodných léčebných postupů. Pro léčbu se doporučují alternativní postupy specifické pro biofilmy, které jsou založeny na rozpadu biofilmu, kdy bakterie opouští biofilm a rozptýlí se do prostředí, zejména při vyčerpání zdrojů a akumulaci metabolitů. Rozpad biofilmu je často indukován enzymy, které ničí složky matrice. Proto by k odstranění biofilmu mohlo být využito enzymatické štěpení. Podobně také fungují rekombinantní fágy, které napadají buňky v biofilmu a produkují enzymy degradující matrici (Omar *et al.*, 2017).

Současná a potenciální terapie pro léčbu chronických ran zahrnuje probiotickou terapii, zeslabení virulence, útlum exprese biofilmových fenotypů, potlačení imunitní odpovědi a agresivní debridement v kombinaci s antimikrobiálními obvazy (Omar *et al.*, 2017).

Samozřejmě je mnohem lepší tvorbě biofilmu předcházet, namísto složitého odstraňování již rozvinutých infekcí. Mikroorganismy se v biofilmu stávají vysoce tolerantní vůči standardním léčebným postupům a odstranění, jako je mechanický debridement. Léčba je tak velmi obtížná (Thebault *et al.*, 2013; Malone *et al.*, 2017). Problémem je, že biofilm v ranách nemusí být identifikován, což vede k neúspěšné léčbě a zpomalení procesu hojení (Schultz *et al.*, 2017).

1.3.1 Postup odstranění biofilmu

V současnosti se akutní a chronické rány léčí pomocí tzv. TIME postupu (z angl. tissue - tkáň, inflammation - zánět, moisture - vlhkost, epithelization - epitelizace), který popsali Schultz *et al.* (2003), a skládá z několika kroků. Nejprve se odstraní neživá tkáň z rány a jejího okolí pomocí debridementu. Poté se minimalizuje rozvoj infekce a vznik zánětu podáváním antibiotik a protizánětlivých léků. Dále se upravuje nerovnováha ve vlhkosti, obvykle pomocí vhodně zvolených obvazů, a nakonec se podporuje epitelizace a tvorba tkání např. aplikací růstových faktorů.

1.3.2 Debridement

Hlavním postupem pro obnovení optimálních podmínek hojení je agresivní debridement rány. Debridement je rychlý, snadný, bezpečný a relativně levný způsob, jak odstranit biofilm z chronických ran (Scali a Kunimoto, 2013).

Debridement podporuje tvorbu zdravé tkáně a snižuje zatížení rány, na kterém se účastní buňky odumřelých tkání, bakterie, biofilm a staré buňky v ráně. Cílem odstranění neživých částí tkání je obnažení zdravé tkáně na spodině rány a podpora procesu hojení (Pokorná a Mrázová, 2012). Debridement je jedním z nejdůležitějších postupů, ale není schopen odstranit všechny bakterie v biofilmu, a proto by se neměl používat samostatně, ale nejlépe v kombinaci s vhodnými lokálními antiseptiky (Schultz *et al.*, 2017).

Debridement lze provést chirurgicky, enzymaticky a biologicky. Chirurgický debridement je mechanické odstranění neživé tkáně. K chemickému debridementu se používají přirozeně se vyskytující enzymy degradující matrici a biologický debridement využívá např. larvy (Bertesteanu *et al.*, 2014).

Wolcott *et al.* (2010) ve své klinické studii zjistili, že ačkoliv chirurgický debridement účinně odstraní biofilm z lůžka chronické rány, tak se mikroorganismy rostoucí v biofilmu znovu objevily po 2 dnech od debridementu a po 3 dnech bylo detekováno vysoké množství bakterií žijících ve zralých biofilmech. Po provedení debridementu existuje časové okno, během kterého planktonní bakterie rekolonizují ložisko rány. Planktonní buňky jsou náchylné k léčbě, která je může účinně odstranit a zabránit tak reformaci biofilmu (Omar *et al.*, 2017).

1.3.3 Antimikrobiální obvazy

Jedním ze základních způsobů terapie chronických ran je vytvoření vlhkého prostředí, které zajistí přirozené podmínky pro léčbu ran a stimuluje proliferaci fibroblastů, endoteliálních buněk a keratinocytů. Vhodný materiál musíme volit podle aktuální fáze hojení a individualitě spodiny rány. Ideální krycí materiál neexistuje. Mezi obvazy urychlující hojení patří např. hydrokoloidní obvazy, hydrogelová, hydropolymerová a alginátová krytí (Pospíšilová, 2010; Mrázová a kol., 2012).

1.4 Detekce biofilmu

V současné době není pro detekci biofilmů v ranách zaveden rutinní laboratorní test. K detekci se používá skenovací elektronová mikroskopie a konfokální laserová skenovací mikroskopie, které nejsou běžně dostupné v klinických laboratořích (Swanson *et al.*, 2015).

Ke sledování zákonitostí a podmínek tvorby bakteriálních biofilmů bylo navrženo množství přímých i nepřímých experimentálních metod (Purkrťová a kol., 2009).

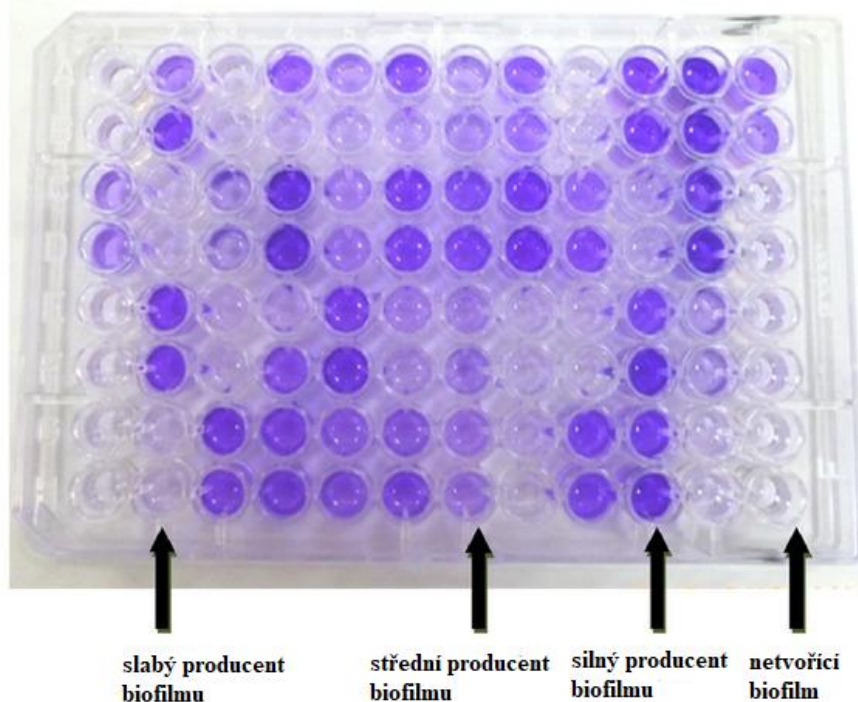
První přímý důkaz přítomnosti bakteriálního biofilmu v chronických ranách byl založen na přímé mikroskopické identifikaci shluků bakterií (Davis *et al.*, 2008; James *et al.*, 2008).

1.4.1 Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách

Pro kvantitativní analýzu vytvořeného biofilmu lze použít metodu, která využívá kultivace bakterií v mikrotitračních destičkách. Tento postup patří k nepřímým metodám měření množství bakteriálního biofilmu (Lindsay a von Holy, 1997).

Detekce tvorby biofilmu v mikrotitračních destičkách je bezesporu nejčastěji používanou metodou. Bakteriální buňky se kultivují v jamkách mikrotitrační destičky z polystyrenu. Po uplynutí doby kultivace se odstraní planktonní buňky a následuje barvení biofilmu, který je připevněný k povrchu jamek (Azeredo *et al.*, 2017).

Podle intenzity zbarvení pak rozdělujeme bakterie do čtyř skupin, na bakterie tvořící biofilm, na bakterie tvořící biofilm slabě, středně a silně (Darwish a Asfour, 2013). Rozdílnou schopnost mikroorganismů tvořit biofilm můžeme vidět na Obrázku 3.



Obrázek 3 - Mikrotitrační destička ukazující různou schopnost mikroorganismů tvořit biofilm (upraveno dle Darwish a Asfour, 2013)

První tuto metodu zavedli Christensen *et al.* (1985), kteří sledovali tvorbu biofilmu u koaguláza negativních bakterií rodu *Staphylococcus*. Testované klinické izoláty rozdělili na adherentní a neadherentní. U patogenních kmenů izolovaných z intravaskulárních katétrů byla pozorována vyšší adheze bakterií na povrch destičky než u saprofytických kmenů. Naopak u pacientů s endokarditidou byla prokázána nižší přilnavost patogenních bakterií v porovnání se saprofytickými kmeny. Nicméně někteří autoři našli velmi malou nebo téměř žádnou souvislost mezi tvorbou biofilmu *in vitro* a klinickými projevy infekce (Perdreau-Remington *et al.*, 1998).

Mulder a Degener (1998) také sledovali tvorbu biofilmu u koaguláza negativních bakterií rodu *Staphylococcus*. Z klinických vzorků byly izolovány především kmeny *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus haemolyticus*. Z 324 testovaných kmenů byla prokázána tvorba biofilmu u 93 kmenů.

Stepanović *et al.* (2000) hodnotili tvorbu biofilmu u 26 klinických izolátů bakterií rodu *Staphylococcus*. Všechny testované kmeny včetně kmenů *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus haemolyticus* prokázaly slabou až silnou schopnost tvorby biofilmu. V této

studii použili autoři upravený postup vycházející z Christensenovy metody, kdy se před měřením krystalová violet rozpustí v etanolu, a tak se dosáhne přesnějších výsledků.

Výhodou mikrotitračních destiček je, že umožňují rychlou analýzu adheze více bakterií za různých růstových podmínek v jednom experimentu. Hlavní nevýhodou je nepřímá indikace tvorby biofilmu, kdy se jako indikace množství biofilmu používá absorbance krystalové violeti v použitém rozpouštědle (Djordjevic *et al.*, 2002).

Jako biofilm se hodnotí veškerá biomasa připevněná k povrchu jamek. Část této biomasy však může pocházet z buněk usazených na dně jamek, které se později začlení mezi extracelulární polymerní látky. K odstranění tohoto problému byla vyvinuta Calgaryho destička, ve které se tvorba biofilmu testuje na krycím víčku, které se skládá z kolíků zapadajících do jamek mikrotitrační destičky. Biomasa na kolících pak nepochází ze sedimentu, ale pouze ze samotného biofilmu (Azeredo *et al.*, 2017).

Krystalová violet je barvivo, které se váže na negativně nabitě povrchové molekuly a polysacharidy v EPS. Barví se tak živé i mrtvé buňky a EPS. K rozlišení živých a mrtvých buněk byly navrženy barvicí techniky založené na metabolické aktivitě životaschopných buněk. Peeters *et al.* (2008) ke sledování tvorby biofilmu kromě krystalové violeti použili i fluorescenční barviva. Jako nejlepší ke sledování tvorby biofilmu byl vyhodnocen fluorescein diacetát a resazurin.

Bakteriofágy jsou schopné lyzovat bakterie a mohou proto sloužit jako účinná antibakteriální léčba. Problematikou odstranění biofilmů kmene *Pseudomonas aeruginosa* pomocí fágů se zabývali Knezevic a Petrovic (2008). Ačkoliv fágy inhibovaly růst a tvorbu biofilmu, tak jejich účinek na již vytvořený biofilm byl velmi nízký. Tato metoda založená na barvení biofilmu a měření optické hustoty v mikrotitračních destičkách byla vyhodnocena jako vhodná pro měření účinnosti bakteriofágů na bakterie přítomné v biofilmu.

Současné laboratorní metody vyvinuté k měření citlivosti bakterií vůči antibiotikům nejsou vhodné pro chronické infekce způsobené bakteriemi přítomnými v biofilmu. Müsken *et al.* (2010) testovali tvorbu biofilmu kmene *Pseudomonas aeruginosa* pomocí mikrotitračních destiček v kombinaci s automatickou konfokální laserovou mikroskopií. Tento postup lze aplikovat i pro stanovení účinnosti antibiotik na bakterie žijící v biofilmu.

Sanchez *et al.* (2013) sledovali tvorbu biofilmu u 205 klinických izolátů, konkrétně u druhů *Staphylococcus aureus*, včetně methicilin-rezistentního *S. aureus* (MRSA),

Acinetobacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*. U 61 % izolátů byla prokázána tvorba biofilmu, přičemž největší počet pozitivních kmenů tvořily kmeny *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Většina izolátů, která byla získána od pacientů s recidivujícími infekcemi, byla silnými producenty biofilmu.

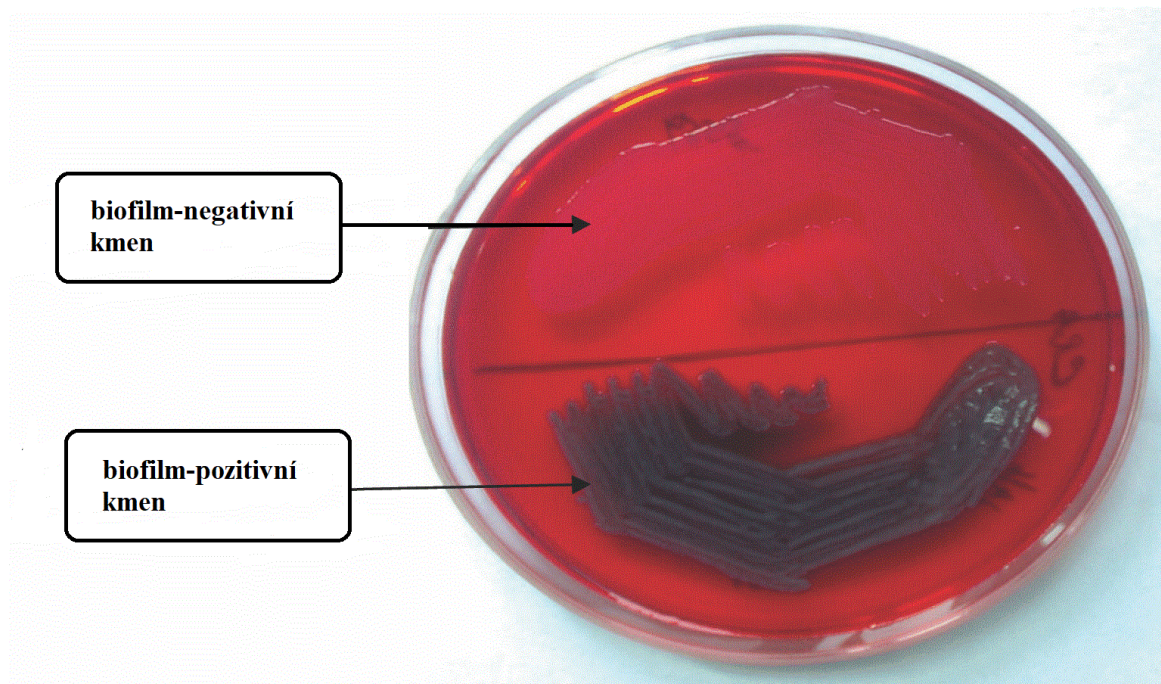
Sabaiefard *et al.* (2014) porovnávali různé způsoby detekce biofilmu u kmene *Pseudomonas aeruginosa*. Pro obarvení biofilmu použili krystalovou violet' a tetrazoliové sole. Tetrazoliová sůl 2,3,5-trifenyl-tetrazolium chlorid byla vyhodnocena jako nejlepší díky nízké ceně a dobré citlivosti.

Mottola *et al.* (2016) hodnotili schopnost tvorby biofilmu u klinických izolátů od pacientů se syndromem diabetické nohy. Všechny testované izoláty, konkrétně bakterie rodů *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* a *Acinetobacter*, tvořily biofilm již po 24 hodinách. Nejsilnější tvorba biofilmu byla stanovena u bakterií rodu *Pseudomonas*, který byl následován rody *Corynebacterium*, *Acinetobacter* a *Enterococcus*. Také bylo zjištěno, že vícedruhová společenství produkovaly více biofilmu než společenství jednodruhová.

Vatan *et al.* (2017) sledovali produkci biofilmu u 339 izolátů získaných z chronických diabetických vředů. Celkem byla tvorba biofilmu prokázána u 34 % z nich. Produkce biofilmu byla výrazně vyšší u gramnegativních bakterií než u grampozitivních bakterií. Nejvyšší produkci biofilmu vykazoval kmeny *Acinetobacter baumannii*, následované kmeny *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiela* spp.

1.4.2 Kultivace na agaru s kongo červení

Sledování schopnosti tvořit biofilm u bakterií rodu *Staphylococcus* na agaru s kongo červení poprvé navrhli Freeman *et al.* (1989). Tato metoda poskytuje průkaz o schopnosti bakterií tvořit EPS tím, že se kongo červeně specificky váže na polysacharidy obsažené v EPS (Oliveira a Cunha, 2010). Naočkované médium se inkubuje po dobu 24 až 48 hodin při 37 °C. Jako pozitivní výsledek se hodnotí černé kolonie se suchou krystalickou konzistencí. Bakterie rodu *Staphylococcus*, které produkují malé množství EPS, rostou obvykle v růžových koloniích a mohou mít tmavě zbarvený střed kolonií – viz Obrázek 4 (Niveditha *et al.*, 2012).



Obrázek 4 - Růst bakterií na agaru s kongo červení (upraveno dle Niveditha *et al.*, 2012)

Tato metoda je rychlá, citlivá, reprodukovatelná a výhodou je také to, že kolonie zůstávají na médiu životaschopné. Nevýhodou je ale subjektivita hodnocení výsledků a ztráta pigmentu v čase (Růžička *et al.*, 2004).

Příčinou infekcí chronických ran je také MRSA. Mariana *et al.* (2009) použili pro průkaz tvorby biofilmu modifikovaný agar s kongo červení. Všechny klinické izoláty, které obsahovaly bakterie rodu *Staphylococcus* rezistentní vůči methicilinu, tvořily na této půdě intenzivně černé kolonie. Změna složení spočívala v použití jiného agaru, snížení koncentrace kongo červeně a sacharózy a vynechání glukózy. Tyto modifikace zlepšily stabilitu černého pigmentu a rovněž snížily náklady na přípravu agaru.

Oliveira a Cunha (2010) testovali schopnost tvorby biofilmu u koaguláza negativních bakterií rodu *Staphylococcus*, které byly izolovány z klinických vzorků. Kmeny byly rozděleny na pozitivní a negativní, podle zbarvení kolonií na agaru s kongo červení. Kmeny rostoucí v lesklých černých nebo suchých černých neprůhledných koloniích byly považovány za producenty biofilmu. Zatímco červené, růžové a vínové kolonie byly klasifikovány jako biofilm-negativní. Ze 100 studovaných kmenů rostlo na agaru s kongo červení 73 kmenů v černých koloniích. U všech pozitivních kmenů byla pak provedena detekce a potvrzena přítomnost *ica* genů pomocí PCR. U devíti kmenů, které tvořily na agaru vínové kolonie a byly

tedy považovány za negativní, byla během PCR detekována přítomnost *ica* genů. Tyto kmeny byly klasifikovány jako falešně negativní.

Cílem práce Kaiser *et al.* (2013) bylo změnit inkubační podmínky a složení agarů s kongo červení tak, aby se zlepšila přesnost detekce biofilm-pozitivních kmenů *Staphylococcus epidermidis*. Optimalizovaná půda byla složena z BHI agarů s 5 % sacharózy, 0,08 % kongo červení, 1,5 % chloridu sodného, 2 % glukózy a 0,5 mg/ml vankomycinu. Z 210 testovaných kmenů bylo 83 % pozitivních na tvorbu biofilmu.

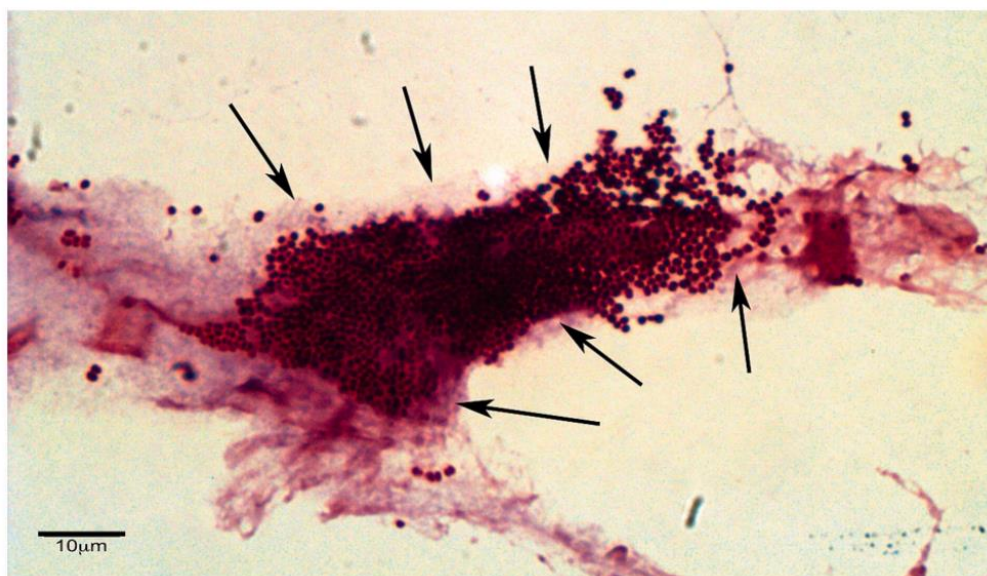
Moghadam *et al.* (2014) sledovali schopnost tvorby biofilmu u bakterií druhu *Staphylococcus aureus*, které byly izolovány od pacientů s popáleninami. Tvorba biofilmu byla potvrzena u 60 % kmenů *Staphylococcus aureus* a 96 % kmenů MRSA.

Lee *et al.* (2016) testovali různé složení agarů obohacených kongo červení. Celkem testovali 47 kmenů rodu *Staphylococcus*, ze kterých bylo 36 kmenů druhu *Staphylococcus aureus*. Výsledky byly porovnány s analýzou genů *icaA* a *icaD*. Geny *ica* byly nalezeny u 32 kmenů *Staphylococcus aureus* a 5 dalších druhů rodu *Staphylococcus* a tyto výsledky se zcela shodovaly s výsledky z trypton-sojového agarů s přidavkem sacharózy.

1.4.3 Mikroskopické metody

Světelná mikroskopie stále zůstává užitečnou základní technikou poskytující vizuální identifikaci tvorby biofilmu. Jako praktické, levné a spolehlivé barvicí metody se osvědčily např. barvení hematoxylin-eosin a modifikované Gramovo barvení podle Browna a Brenna (viz Obrázek 5). Na druhou stranu má světelná mikroskopie poměrně malé zvětšení v porovnání s mikroskopií elektronovou. Nejlepší výsledky poskytuje kombinace světelné mikroskopie s transmisní elektronovou mikroskopií (TEM) nebo skenovací elektronovou mikroskopií (SEM) (Azaredo *et al.*, 2017).

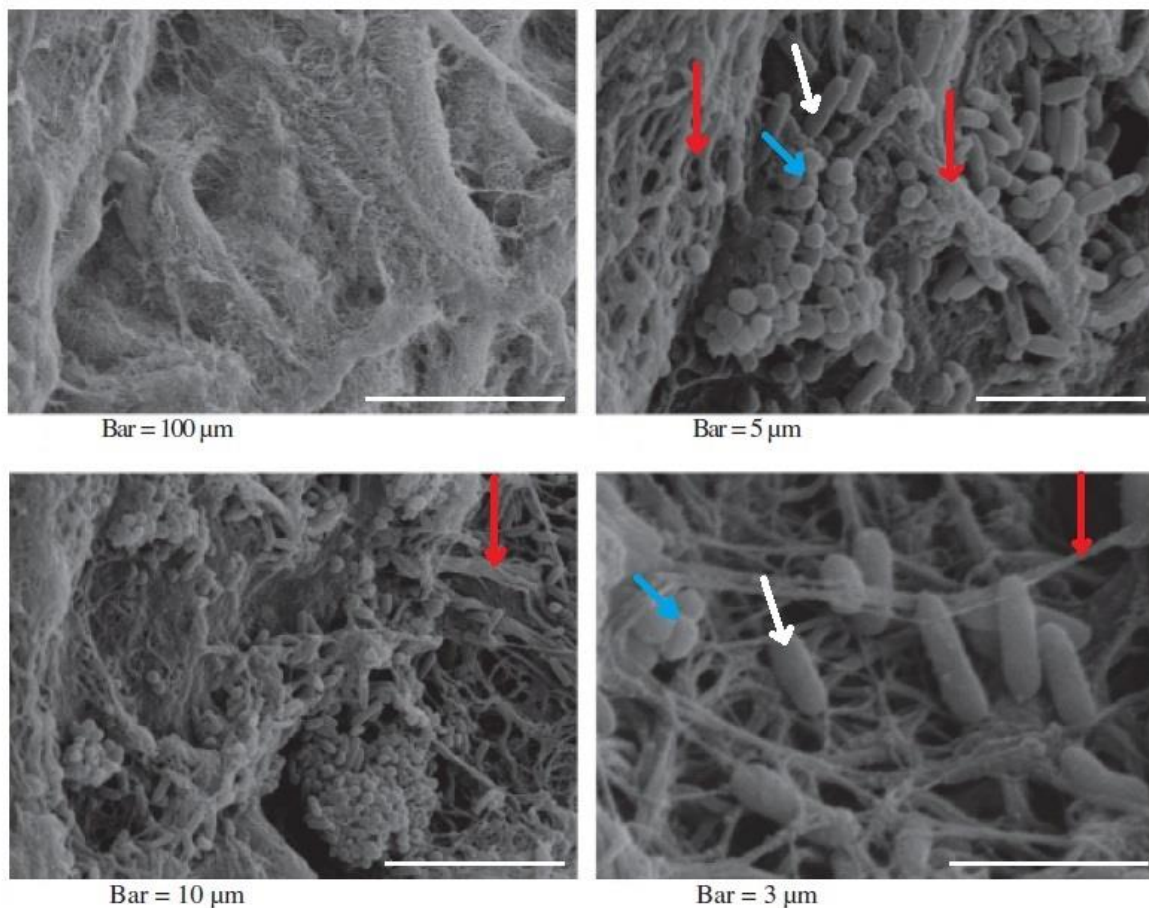
Mikroskopické techniky jsou však náročné na práci, vyžadují drahé vybavení a odborné znalosti (Arciola *et al.*, 2006).



Obrázek 5 - Mikroskopické zobrazení části vzorku z debridementu od pacienta s diabetickou nohou, barveno dle Gramma, předpokládané mikrokolonie bakterií a biofilmová matrice jsou označeny šipkami (Oates *et al.*, 2014)

Klausen *et al.* (2003) pozorovali pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie (CLSM) průběh tvorby biofilmu kmene *Pseudomonas aeruginosa* v čase. Biofilm byl tvořen mnohobuněčnými strukturami ve tvaru houby, které se vytvářely v postupném procesu, který zahrnoval dvě odlišné bakteriální populace, a to nepohyblivou a pohyblivou bakteriální populaci. Nepohyblivé bakterie tvořily houbovitě stonky, po kterých byly schopny stoupat pohyblivé bakterie. Ty tvořily na stoncích houbovitě čepičky.

Sun *et al.* (2008) sledovali strukturu vícedruhového biofilmu, který se skládal z kmenů *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus*. Pro hodnocení struktury biofilmu použili SEM a TEM. Za použití SEM byla pozorována komplexně propojená síť EPS o rozdílné tloušťce, a v této biofilmové matrici byly nalezeny všechny tři druhy bakterií (viz Obrázek 6). Koky a tyčinky se nacházely v bezprostřední blízkosti, což by mohlo naznačovat na vzájemnou spolupráci těchto populací.



Obrázek 6 - Snímek vícedruhového biofilmu pořízený SEM (Sun *et al.*, 2008)

červená šipka – EPS matrix, bílá šipka – tyčinky, modrá šipka – koky

James *et al.* (2008) testovali vzorky získané z chronických a akutních ran. K analýze bylo použito 50 vzorků z chronických ran a 16 vzorků z ran akutních, které byly prohlíženy světelnou a skenovací elektronovou mikroskopií. Bylo zjištěno, že 60 % vzorků chronických ran obsahovalo bakterie přítomné v biofilmu, zatímco v akutních ranách byl výskyt biofilmu stanoven jen u 6 % vzorků.

Bridier *et al.* (2010) sledovali tvorbu biofilmu pomocí CLSM v kombinaci s mikrotitračními destičkami. U trojrozměrných struktur biofilmů tvořených 60 oportunními patogeny, byla pozorována rozmanitá struktura biofilmů. U kmene *Pseudomonas aeruginosa* bylo pozorováno specifické prostorové houbovitě uspořádání. Kombinované použití mikrotitračních destiček s CLSM bylo vyhodnoceno jako dobrá alternativa k ostatním používaným metodám, protože umožňuje přímou, *in situ*, kvalitativní a kvantitativní

charakterizaci struktury biofilmů. Tato metoda by mohla vést k jasnějšímu porozumění vztahu struktury a funkce, které se podílejí na vlastnostech biofilmu.

Neut *et al.* (2011) sledovali tvorbu biofilmu pomocí CLSM u dvou pacientů s diabetickými vředy. Ve vzorcích byly kultivačními technikami identifikovány kmeny *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus cloacae* a *Enterococcus faecalis*. U obou pacientů byla pozorována přítomnost bakterií, která se pohybovala od jednotlivých bakterií až po velké shluky buněk obklopených EPS.

Sanchez *et al.* (2013) sledovali pomocí SEM strukturu biofilmu u kmenů *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*, které byly izolovány z klinických vzorků. Testované kmeny byly schopné vytvářet zralé a silné biofilmy, jejichž struktura byla pro každý druh jedinečná.

Oates *et al.* (2014) analyzovali vzorky od pacientů s diabetickými vředy. Strukturu biofilmu sledovali pomocí několika mikroskopických technik, a to konkrétně světelné mikroskopie, fluorescenční mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie. U všech vzorků byly nalezeny bakterie přítomné v biofilmu všemi třemi technikami, ačkoliv světelná a fluorescenční mikroskopie byly vyhodnoceny jako účinnější při sledování struktury EPS než SEM.

Johani *et al.* (2017) se zaměřili na vyšetření přítomnosti biofilmu u pacientů s diabetickými vředy. Vzorky byly hodnoceny pomocí mikroskopických a molekulárních technik. Pro vizualizaci struktur biofilmu byla použita skenovací elektronová mikroskopie a konfokální laserová skenovací mikroskopie v kombinaci s PNA-FISH. Ze 65 testovaných vzorků, které byly hodnoceny mikroskopicky, byly všechny vyhodnoceny jako biofilm-pozitivní. Snímky ze SEM identifikovaly převahu koků, které byly často potažené vrstvou EPS.

1.4.4 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) používá fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy (většinou dlouhé 15-25 nukleotidů), které hybridizují s ribozomální ribonukleovou kyselinou (RNA) v buňkách. Modifikací klasické FISH je využití analogů nukleových kyselin místo DNA jako rozpoznávacího prvku. Tyto napodobeniny se od DNA nebo RNA liší modifikací na fosfátové skupině a cukru. Nejznámější z těchto molekul je peptidová nukleová kyselina (PNA) (Azeredo *et al.*, 2017). PNA má vyšší afinitu k DNA

a RNA než samotná DNA. To znamená, že sonda může být kratší. Výhodou je také snazší průnik sondy skrze biofilmovou matici a buněčnou stěnu (Cerqueira *et al.*, 2008).

Jelikož většina biofilmů je vícedruhová, je výhodou FISH možnost vizualizace velkého množství různých druhů bakterií současně. Výhodou FISH je také její použití v kombinaci s pokročilými mikroskopickými technikami, jako je CLSM (Wimpenny *et al.*, 2000). Naopak nevýhodou je porušení vzorků (Tan *et al.*, 2017).

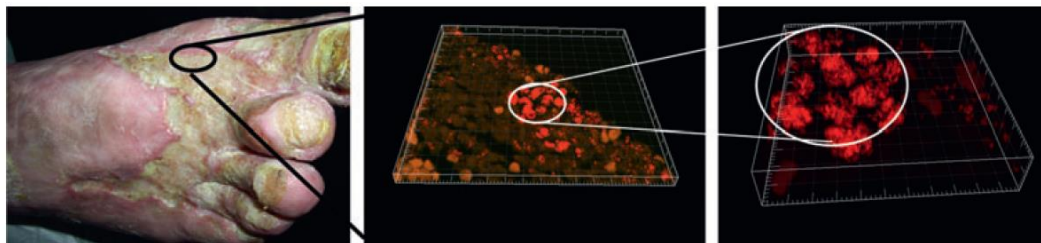
Kirketerp-Møller *et al.* (2008) hodnotili vzorky z chronických ran pomocí metod PNA-FISH a CLSM. Pozorovali bakteriální shluky uzavřené v EPS, které byly složeny převážně z jednodruhových bakterií, buď kmene *Pseudomonas aeruginosa* nebo kmene *Staphylococcus aureus*. Ačkoliv bylo dříve prokázáno, že bakteriální komunity v ranách jsou polymikrobiální, v této studii byly bakteriální shluky složeny z více druhů bakterií pozorovány vzácně, a to i přestože bylo několik druhů bakterií přítomno v jedné ráně.

Malic *et al.* (2009) použili PNA-FISH v kombinaci s CLSM k detekci a charakterizaci prostorové struktury bakterií tvořících biofilm, které se často vyskytují v chronických ranách. Konkrétně byly testovány kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.* a *Micrococcus sp.* a analýza vícedruhových biofilmů prokázala převahu kmene *Pseudomonas aeruginosa*. Autoři uvádějí kombinaci PNA-FISH a CLSM jako spolehlivý nástroj ke studiu tvorby bakteriálních biofilmů tvořených jedním nebo více druhy bakterií.

Fazli *et al.* (2009) sledovali strukturu biofilmu tvořeného z kmenů *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*, které byly izolovány z chronických ran. Vzorky byly získány od pacientů s chronickými žilními vředy na nohou. Bakteriální biofilmy byly detekovány pomocí PNA-FISH a CLSM. Autoři studovali vzdálenost bakteriálních shluků od povrchu rány. Bylo zjištěno, že kolonie kmene *Pseudomonas aeruginosa* byly detekovány více v lůžku rány, zatímco kolonie kmene *Staphylococcus aureus* se vyskytovaly spíše na povrchu. To naznačuje na to, že distribuce bakterií v chronických ranách není náhodná. Techniky stěru ran mohou tak podhodnotit přítomnost kmene *Pseudomonas aeruginosa*, který se vyskytuje v hlubších vrstvách chronických ran a může mít vliv na pomalé hojení ran.

Bjarnholt (2013) ve své studii vyšetřoval 22 vzorků získaných z chronických ran od různých pacientů za použití standardních kultivačních metod a PNA-FISH. Pomocí kultivačních technik byly ve většině ran detekovány kmeny *Staphylococcus aureus*, zatímco

kmeny *Pseudomonas aeruginosa* byly pozorovány méně často. Naproti tomu PNA-FISH ukázala, že velká část ran skrývá biofilmy kmenů *Pseudomonas aeruginosa* (viz Obrázek 7).



Obrázek 7 - Biofilm kmene *Pseudomonas aeruginosa* v chronické ráně - vizualizace pomocí PNA-FISH s konfokální laserovou skenovací mikroskopií (Bjarnsholt, 2013)

Fazli *et al.* (2014) popisují ve své práci postup použití PNA-FISH a navrhují její použití pro identifikaci bakterií izolovaných z chronických ran, od pacientů trpících cystickou fibrózou a infekcí výplní měkkých tkání. U všech těchto případů byl pozorován růst bakterií v biofilmu, který vysvětluje jejich zvýšenou odolnost vůči antibiotikům. Autoři také zdůrazňují vhodnost peptidové nukleové kyseliny, která díky své chemické struktuře může snadno procházet buněčnou stěnou bakterií a poskytuje tak vysokou specifitu, díky tepelné stabilitě komplexů s RNA.

1.4.5 Polymerázová řetězová reakce

Detekce biofilmu založená na kultivaci je časově náročná a může vést k podhodnocení počtu buněk kvůli přítomnosti životaschopných, ale nekultivovatelných bakterií (Li *et al.*, 2014). Slibnou alternativou může být kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR). Největší nevýhodou kvantifikace založené na qPCR je však nadhodnocení počtu buněk v důsledku přítomnosti extracelulární DNA a DNA pocházející z mrtvých buněk. K vyloučení detekce extracelulární DNA a DNA z mrtvých buněk byla navržena úprava bakteriálních vzorků pomocí ethidium monoazidu (EMA) a propidium monoazidu (PMA) (Tavernier a Coenye, 2015).

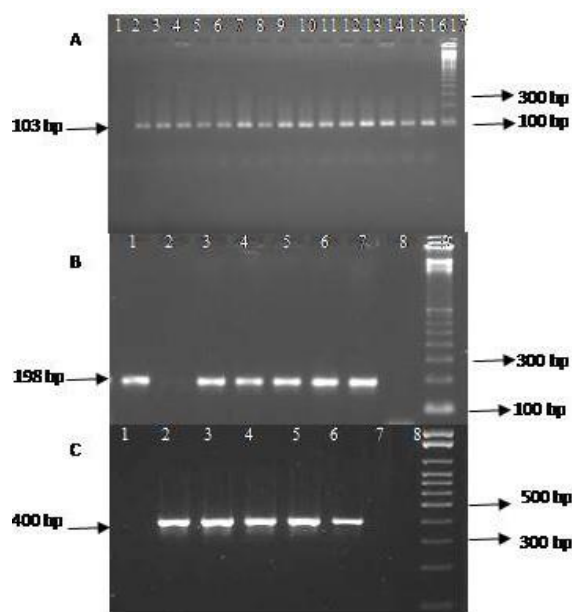
Molekula PMA vstupuje pouze do buněk s porušenou membránou, tedy do mrtvých buněk. Živé mikroorganismy s PMA nereagují, protože mají neporušenou buněčnou membránu. Na DNA z mrtvých bakterií se váže PMA a tato DNA pak není během qPCR amplifikována (Nocker *et al.*, 2006). Nicméně i tato technika má své nevýhody. Rozlišování

mezi mrtvými a živými buňkami je založeno pouze na integritě membrány, takže nelze sledovat účinek antimikrobiálních látek, které ovlivňují integritu membrány (Tavernier a Coeney, 2015). Dále nejsou zohledněny živé buňky s nepatrně poškozenou membránou a přítomnost velkého procenta mrtvých buněk může ovlivnit kvantifikaci buněk životaschopných (Sträuber a Müller, 2010). Ve vzorku se mohou nacházet sloučeniny, které se vážou s molekulou PMA, a můžou tak zabránit vazbě PMA a DNA (Taylor *et al.*, 2014).

Syntéza EPS je zprostředkována pomocí *ica* operonu. Tento operon obsahuje geny *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* a *icaR*. Po aktivaci tohoto operonu jsou během transkripce přepsány příslušné proteiny IcaA, IcaB, IcaC a IcaD, které jsou nezbytné pro syntézu EPS. Gen *icaR* má regulační funkci (Oliveira a Cunha, 2010). Operon *ica* je u bakterií rodu *Staphylococcus* považován za indikátor schopnosti tvorby biofilmu (Frebourg *et al.*, 2000).

Oliveira a Cunha (2010) testovali schopnost tvorby biofilmu u koaguláza negativních bakterií rodu *Staphylococcus*. Test byl založen na detekci *icaA*, *icaD* a *icaC* genů pomocí PCR (viz Obrázek 8). Ze 100 klinických izolátů bylo 82 % pozitivních na tvorbu biofilmu. Autoři této studie uvedli, že detekce biofilmu pomocí *ica* operonů je technika jednoduchá, rychlá a spolehlivá a vyžaduje pouze minimální množství DNA.

Thomsen *et al.* (2010) porovnávali výskyt bakterií izolovaných od 14 pacientů s chronickými žilními vředy, pomocí kultivačních technik a metod molekulární biologie. Bakteriální rozmanitost stanovená kultivačními metodami a molekulárními metodami byla odlišná. Pomocí kultivačních technik bylo zjištěno, že všechny rány obsahovaly kmeny *Staphylococcus aureus*, zatímco kmeny *Pseudomonas aeruginosa* byly identifikovány v šesti ranách. Pomocí qPCR byly kmeny *Staphylococcus aureus* detekovány jen ve čtyřech ranách a kmeny *Pseudomonas aeruginosa* ve třech. Rozdíly mezi výsledky získanými z kultivačních a molekulárních metod ukazují, že použití jen jedné metody pro identifikaci bakterií v ranách není vhodné.



Obrázek 8 - Gelová elektroforéza PCR produktů (Oliveira a Cunha, 2010)

A → *icaA* (103 bp), 1: negativní kontrola, 2-15: pozitivní vzorky, 16: pozitivní kontrola, 17: molekulární marker

B → *icaD* (198 bp), 1: pozitivní vzorek, 2: negativní vzorek, 3-6: pozitivní vzorky, 7: pozitivní kontrola, 8: negativní kontrola, 9: molekulární marker

C → *icaC* (400 bp), 1: negativní vzorek, 2-5: pozitivní vzorky, 6: pozitivní kontrola, 7: negativní vzorek, 8: negativní kontrola, 9: molekulární marker

Atshan *et al.* (2012) sledovali 60 různých klinických izolátů *Staphylococcus aureus*, které obsahovaly i kmeny MRSA. Geny *icaA*, *icaD*, *icaB* a *icaC* byly nalezeny u všech testovaných kmenů.

El-Amin *et al.* (2015) sledovali metodou PCR přítomnost genů *icaA* a *icaD* u 50 klinických izolátů *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*. K detekci přítomnosti *icaA* a *icaD* genů použili metodu PCR. Geny *icaA* a *icaD* byly detekovány u 56 % kmenů.

Ke sledování tvorby biofilmu lze dále z molekulárně-biologických metod využít DNA fingerprinting, analýzu genů pro 16S rDNA pyrosekvenování a metagenomické metody (Thomsen *et al.*, 2010; Wolcott *et al.*, 2016).

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo otestovat tvorbu biofilmu u klinických izolátů, získaných ze stěrů chronických ran. Pro sledování tvorby biofilmu byla použita Christensenova metoda a výsledky byly porovnány se sbírkovými kulturami. Na základě získaných výsledků byly kmeny rozděleny do čtyř skupin a výsledky byly zhodnoceny a porovnány s dostupnou literaturou.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie, přístroje, pomůcky a živná média

3.1.1 Chemikálie

| | |
|------------------------|-----------------------------|
| Chlorid sodný p.a. | (Lach-Ner, Česká republika) |
| D-glukosa bezvodá p.a. | (Lach-Ner, Česká republika) |
| Sacharosa p.a. | (Lachema, Česká republika) |

3.1.2 Přístroje

| | |
|---|------------------------|
| Analytické váhy BBC32 | (BOECO, Německo) |
| Autokláv Sterilab | (BMT, Česká republika) |
| Denzitometr DEN-1 McFarland | (Biosan, Litva) |
| Horkovzdušný sterilizátor Sterimat 5104 | (BMT, Česká republika) |
| Chladnička K4220 | (Liebherr, Německo) |
| Laboratorní váhy KB 1000-2 | (KERN & SOHN, Německo) |
| Počítačka bakterií LKB 2002 | (POL-EKO, Polsko) |
| Spektrofotometr PowerWave 340 | (Biotek, USA) |
| Spektrofotometr Infinite M200 | (Tecan, Švýcarsko) |
| Termostat ST 1/B/40 Basic | (POL-EKO, Polsko) |
| Třepačka Reax Top Test Tube | (Heidolph, Německo) |

3.1.3 Pomůcky

| | |
|---|--|
| Automatické pipety | (Discovery, Německo; Thermo Scientific, Finsko) |
| Běžné laboratorní sklo | |
| Kahan | |
| Plastové a pryžové pomůcky | |
| Polyethylenové mikrotitrační destičky, 96 jamek | (SPL, Korea) |

3.1.4 Živná média a pracovní roztoky

BHI bujón (Brain Heart Infusion Broth)

- *výrobce:* Himedia, Indie
- *složení:*

| | |
|--------------------------------|----------|
| telecí mozková infuze (sušina) | 12,5 g/l |
| hovězí srdcová infuze (sušina) | 5 g/l |
| masový pepton | 10 g/l |
| dextróza | 2 g/l |
| NaCl | 5 g/l |
| difosforečnan sodný | 2,5 g/l |
- *příprava:* navážka 37 g dehydratovaného média byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody a autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut

BHI bujón s 2 % glukózy a 2 % sacharózy

- *složení:*

| | |
|--------------------------|---------|
| dehydratované médium BHI | 37 g |
| glukóza | 0,74 g |
| sacharóza | 0,74 g |
| destilovaná voda | 1000 ml |
- *příprava:* navážka 37 g dehydratované média BHI byla smíchána s 0,74 g glukózy a 0,74 g sacharózy a rozpuštěna v 1000 ml destilované vody a autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut

Fyziologický roztok

- *složení:*

| | |
|------------------|---------|
| NaCl | 8,5 g |
| destilovaná voda | 1000 ml |
- *příprava:* navážka 8,5 g NaCl byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody a autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut

Krystalová violet'

- *složení:*

| | |
|-----------------------|--------|
| A. krystalová violet' | 5 g |
| 96 % ethanol | 200 ml |
| B. 1 % oxalátu amonný | 80 ml |

- *příprava:* 20 ml roztoku A bylo smíseno s 80 ml roztoku B a vzniklá směs byla přefiltrována

McFarlandova zákalová stupnice

- *složení:* 1 % vodný roztok BaCl₂ (1 g ve 100 ml destilované vody)
1 % vodný roztok H₂SO₄ (1 ml 96% H₂SO₄ v 95 ml destilované vody)
- *příprava:* množství roztoků a stupeň získaného zákalu jsou uvedeny v Tabulce 3

Tabulka 3 - Mc Farlandova zákalová stupnice

| Stupeň zákalu | 1 % BaCl ₂ [ml] | 1 % H ₂ SO ₄ [ml] | cfu/ml |
|---------------|----------------------------|---|---------------------|
| 0,5 | 0,05 | 9,95 | 1,5.10 ⁸ |
| 1 | 0,1 | 9,9 | 3.10 ⁸ |
| 2 | 0,2 | 9,8 | 6.10 ⁸ |
| 3 | 0,3 | 9,7 | 9.10 ⁸ |
| 4 | 0,4 | 9,6 | 1,2.10 ⁹ |

MPA agar (Nutrient Agar No. 2)

- *výrobce:* Himedia, Indie
- *složení:*

| | |
|----------------|--------|
| masový pepton | 10 g/l |
| hovězí extrakt | 10 g/l |
| chlorid sodný | 5 g/l |
| agar | 15 g/l |
- *příprava:* navážka 40 g dehydratovaného média byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody a autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut

TSB bujón (Soyabean Casein Digest Medium w/o Dextrose)

- *výrobce:* Himedia, Indie
- *složení:*

| | |
|------------------------------|---------|
| enzymový hydrolyzát kaseinu | 17 g/l |
| pepton ze sójové moučky | 3 g/l |
| chlorid sodný | 5 g/l |
| hydrogenfosforečnan draselný | 2,5 g/l |
- *příprava:* navážka 27,5 g dehydratovaného média byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody a autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut

TSB bujón s 1 % glukózy

- *složení:*

| | |
|--------------------------|---------|
| dehydratované médium TSB | 27,5 g |
| glukóza | 0,275 g |
| destilovaná voda | 1000 ml |

- *příprava:* navážka 27,5 g dehydratovaného média TSB byla smíchána s 0,275 g glukózy a rozpuštěna v 1000 ml destilované vody a autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut

3.2 Použité mikrobiální kmeny

K práci byly použity následující sbírkové kmeny z České sbírky mikroorganismů Masarykovy Univerzity v Brně (CCM) a sbírky mikroorganismů Univerzity Pardubice (UPa):

Proteus species CCM 1799

Pseudomonas aeruginosa CCM 3955

Pseudomonas putida CCM 3423

Serratia marcescens CCM 303

Staphylococcus aureus CCM 2022

Staphylococcus aureus CCM 4223

Staphylococcus epidermidis CCM 4418

Staphylococcus intermedius UPa

Streptococcus agalactiae CCM 6187

Dále byly použity klinické izoláty získané z chronických ran, které byly získané ve spolupráci s Fakultní nemocnicí Hradec Králové. Všechny použité kmeny včetně lokalizace infekce, data odběru a aplikovaných přípravků jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4 - Použité kmeny izolované z chronických ran

| Kmen | Lokalizace | Datum odběru | Léčba |
|--------------------------------------|------------|--------------|-------------------------|
| <i>Proteus species 56</i> | LDK | 23.10.2017 | Hcel (krytí) |
| <i>Proteus species 68</i> | PDK | 15.01.2018 | Protosan gel, Bactigras |
| <i>Pseudomonas aeruginosa 52</i> | PDK | 16.10.2017 | Actiwon |
| <i>Pseudomonas aeruginosa 63</i> | PDK | 06.11.2017 | Prontosan |
| <i>Pseudomonas aeruginosa 65</i> | PDK | 06.11.2017 | Mepilex Ag |
| <i>Pseudomonas aeruginosa 66</i> | LDK | 06.11.2017 | Prontosan W. gel |
| <i>Pseudomonas aeruginosa 70</i> | LDK | 20.11.2017 | Silvercel |
| <i>Pseudomonas aeruginosa 72</i> | PDK | 20.11.2017 | Betadin obklad |
| <i>Pseudomonas putida 65</i> | PDK | 06.11.2017 | Mepilex Ag |
| <i>Serratia marcescens 64</i> | LDK | 06.11.2017 | Prontosan |
| <i>Serratia marcescens 67</i> | PDK | 13.11.2017 | Hcel |
| <i>Staphylococcus aureus 51</i> | LDK | 16.10.2017 | Wound gel, Hcel HT |
| <i>Staphylococcus aureus 94</i> | palec PDK | 22.01.2018 | |
| <i>Staphylococcus epidermidis 54</i> | PDK | 16.10.2017 | Allewyn life |
| <i>Staphylococcus intermedius 77</i> | PDK | 27.11.2017 | Braunovidon |
| <i>Staphylococcus intermedius 71</i> | břicho | 20.11.2017 | Bactigras |
| <i>Streptococcus agalactiae 73</i> | LDK | 20.11.2017 | Betadin obklad |

Pozn.: PDK – pravá dolní končetina, LDK – levá dolní končetina

3.3 Uchovávání kmenů a příprava suspenze

Pro přípravu suspenzí byly použity kultury kultivované po dobu 24 hodin při 37 °C aerobně na MPA agar. Z těchto kultur byly připraveny suspenze dle 0,5 stupně Mc Farlandovy zákalové stupnice ve fyziologickém roztoku. Denzita buněk byla proměřena pomocí denzitometru.

Pro ověření výchozí denzity připravených bakteriálních suspenzí bylo 100 µl příslušného desítkového ředění suspenze vyočkováno roztěrem L-hokejkou na MPA agar. Po aerobní kultivaci při 37 °C po dobu 24 hodin byl stanoven počet kolonií.

3.4 Detekce biofilmu pomocí Christensenovy metody v mikrotitračních destičkách

Christensenovou metodou byla sledována tvorba biofilmu u všech výše uvedených sbírkový kmenů a klinických izolátů. Pro stanovení byla vybrána následující živná média: BHI bujón, BHI bujón s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, TSB bujón a TSB s 1 % glukózy.

Plastová mikrotitrační destička o 96 jamkách byla před použitím promyta 96% etanolem a ponechána na vzduchu volně vyschnout. Ve zvoleném živném médiu byla z 24 hodinové kultury připravena bakteriální suspenze o denzitě 10^8 cfu/ml (0,5 stupeň Mc Farlanda). Z této suspenze bylo napipetováno 20 μ l do každé jamky mikrotitrační destičky a bylo přidáno 180 μ l živného média. Současně byla provedena i negativní kontrola (nezaočkované živné médium). Před kultivací byla destička proměřena na spektrofotometru Tecan při 595 nm. Současně byla ověřena denzita použité bakteriální suspenze desítkovým ředěním a roztěrem L-hokejkou na MPA. Kultivace probíhala při 37 °C, aerobně, po dobu 1-2 dny v plastovém sáčku, který zabraňoval vysychání. Po uplynutí doby kultivace byla destička spektrofotometricky proměřena, její obsah vyklepnut a jamky byly 3x promyty sterilní destilovanou vodou. Po vyschnutí destičky bylo do každé jamky napipetováno 150 μ l 1% roztoku krystalové violeti a destička byla inkubována 45 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo barvivo vyklepnuto a destička byla 5x promyta sterilní destilovanou vodou. Po vyschnutí destičky bylo do každé jamky napipetováno 150 μ l 96% etanolu. Po dvacetiminutovém působení bylo z každé jamky odpipetováno 100 μ l do nové, 96% etanolem vymyté destičky. Tato nová destička byla opět spektrofotometricky proměřena při 595 nm.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Christensenova metoda

Christensenovou metodou v mikrotitračních destičkách (96 jamek) byl sledován růst a tvorba biofilmu u vybraných sbírkových kmenů a kmenů izolovaných z chronických ran. Detekce byla provedena po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C ve vybraných médiích. Vzniklý biofilm byl obarven 1% roztokem krystalové violeti a absorbance byla spektrofotometricky proměřena při 595 nm.

Postup práce vycházel z modifikované Christensenovy metody, kterou ve své práci popsali Stepanović *et al.* (2007). Každý kmen byl měřen v oktetu, ve třech opakováních. Odlehlé hodnoty byly vyloučeny. Veškeré výsledky pak byly zprůměrovány a vyhodnoceny.

4.1.1 Optimalizace jednotlivých kroků Christensenovy metody

Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách je nejčastěji používanou metodou k detekci tvorby biofilmu. Existuje ale celá řada faktorů, které mohou ovlivňovat stanovení. K těmto faktorům patří kultivační teplota, doba kultivace, dostupnost živin, koncentrace krystalové violeti, doba barvení, velikost inokula, způsob promývání destičky a další.

Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím schopnost bakterií produkovat biofilm *in vitro* je složení média. K nejčastěji používaným médiím patří BHI bujón a TSB bujón, často s přidavkem glukózy a sacharózy. Přídavek glukózy a sacharózy do BHI bujónu se v našich výsledcích projevil hlavně u kmenů *Staphylococcus intermedius* a *Staphylococcus aureus*. Přídavek glukózy do TSB bujónu neměl tak velký vliv na tvorbu biofilmu, nicméně nepatrné zvýšení tvorby biofilmu bylo pozorováno u kmenů *Pseudomonas aeruginosa*.

Dalším faktorem je použití vhodného druhu mikrotitrační destičky. V naší práci byly použity 96-ti jamkové polystyrenové destičky s plochým dnem pro tkáňovou kultivaci, které mají speciálně ošetřený povrch, aby umožnily adhezi buněk a jejich proliferaci. Kromě toho ošetření zabraňuje odlupování svrchních vrstev biofilmu během procesu promývání. Několik studií uvedlo, že některé kmeny produkují biofilmy pouze na mikrotitračních destičkách pro tkáňové kultury (Christensen *et al.*, 1985; Stepanović *et al.*, 2007)

Hustota biofilmu závisí na inkubační době a množství inokula. Většina studií doporučuje 1 denní kultivaci, protože po delší době může docházet k odtrhávání svrchních vrstev biofilmu. Tato skutečnost byla u některých námi testovaných kmenů po 2 denní kultivaci potvrzena.

Prodlouženou 2 denní kultivaci lze z našich výsledků doporučit jen pro kmeny *Pseudomonas aeruginosa*. V této práci jsme vyzkoušeli i barvení biofilmu po 3 denní a 7 denní kultivaci. Prodloužení doby kultivace nedoporučujeme, protože docházelo k viditelnému odtrhávání biofilmu. Množství biofilmu také výrazně ovlivňuje velikost použitého inokula. V naší práci bylo zvoleno stejné množství inokula jako ve studii Stepanović *et al.* (2007). Autoři použili počáteční inokulum o denzitě 10^8 cfu/ml. Následným ředěním této suspenze v poměru 1:100 získáme konečné inokulum o denzitě 10^6 cfu/ml.

Důležitým krokem celé metody je promývání destiček, protože má odstranit planktonní buňky, ale současně by nemělo dojít k porušení integrity biofilmu. Nedostatečné promývání může vést k falešně pozitivním výsledkům, zatímco nadměrné promývání může vést k falešně negativním výsledkům. V této práci je použito třístupňové promývání, které doporučují Stepanović *et al.* (2007).

Stepanović *et al.* (2007) měřili tvorbu biofilmu při 570 nm. Purkrtová a kol. (2009) použili vlnovou délku 620 nm nebo Deighton a Balkau (1990) použili 600 nm. V této práci jsme vyzkoušeli měření při třech vlnových délkách, a to 570 nm, 595 nm a 620 nm. Nakonec jsme pro všechna měření použili vlnovou délku 595 nm, která se nejvíce blíží absorpčnímu maximu krystalové violeti. Stejnou vlnovou délku použili ve své studii i Djordjevic *et al.* (2002).

4.1.2 Interpretace výsledků Christensenovy metody

K interpretaci výsledků jsme použili rozdělení bakterií dle optické denzity negativní kontroly dle Stepanović *et al.* (2007). V některých studiích byly použity předdefinované mezní hodnoty (Møretrø *et al.*, 2003) nebo jako „cutt-off value“ byla použita hodnota absorbance biofilm-pozitivního kontrolního kmene (Allignet *et al.*, 1999). Nicméně použití předdefinovaných mezních hodnot a pozitivních kontrolních kmenů může vést k méně přesným výsledkům.

K hodnocení výsledků tvorby biofilmu pro jednotlivá média byla stanovena tzv. „cut-off value“, která byla vypočítána na základě optické denzity negativní kontroly (ODc). Optická denzita každého kmene (OD) se pak porovnávala s ODc a testované kmeny byly rozřazeny do 4 kategorií, podle jejich schopnosti tvořit biofilm:

| | | |
|---------------------------|-----|---------------------------|
| $OD \leq ODc$ | 0 | biofilm-negativní |
| $ODc < OD \leq 2x ODc$ | + | slabě biofilm-pozitivní |
| $2x ODc < OD \leq 4x ODc$ | ++ | středně biofilm-pozitivní |
| $4x ODc < OD$ | +++ | silně biofilm-pozitivní |

Jak znázorňuje **Tabulka 5**, tvorba biofilmu bylo zjištěna u všech testovaných kmenů ve všech čtyřech testovaných médiích kromě klinického izolátu *Streptococcus agalactiae* 73, který byl po 1 denní kultivaci v BHI bujónu zařazen mezi biofilm-negativní kmeny. V ostatních médiích byl tento kmen zařazen mezi kmeny slabě biofilm-pozitivní, ačkoliv hodnoty absorpance byly velmi hraniční.

U většiny bakterií byla zjištěna změna v tvorbě biofilmu vlivem doby kultivace. Například klinický izolát *P. aeruginosa* 52 byl po 1 denní kultivaci v BHI bujónu zařazen mezi slabě biofilm-pozitivní kmeny, ale po 2 denní kultivaci byl zařazen mezi kmeny středně biofilm-pozitivní. Naopak klinický izolát *S. aureus* 94 byl po 1 denní kultivaci v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy zaražen mezi silně biofilm-pozitivní kmeny, ale po 2 denní kultivaci byl zařazen mezi kmeny slabě biofilm-pozitivní. U kmenů *Proteus* sp. 56, *Proteus* sp. 68, *P. aeruginosa* CCM 3955, *Ps. putida* CCM 3423, *Ps. putida* 65, *S. aureus* 51 a *S. aureus* CCM 2022 zůstávala tvorba biofilmu ve všech médiích, po jednodenní i dvoudenní kultivaci na stejné úrovni.

Porovnáním tvorby biofilmu klinických izolátů a sbírkových kmenů, můžeme říci, že u většiny druhů jsou silnějšími producenty biofilmu klinické izoláty, kromě bakterií druhu *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus agalactiae*, u kterých sbírkové kmeny prokázaly vyšší schopnost tvořit biofilm.

Tabulka 5 - Rozdělení testovaných kmenů do kategorií podle jejich schopnosti tvořit biofilm

| | BHI | | BHI + 2 % glukózy a 2 % sacharózy | | TSB | | TSB + 1 % glukózy | |
|---|-------|-------|---|-------|-------|-------|----------------------|-------|
| | 1 den | 2 dny | 1 den | 2 dny | 1 den | 2 dny | 1 den | 2 dny |
| <i>Proteus species</i> CCM 1799 | + | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| <i>Proteus species</i> 56 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>Proteus species</i> 68 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 52 | + | ++ | + | ++ | ++ | ++ | + | ++ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 63 | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | ++ | +++ | +++ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 65 | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 66 | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 70 | ++ | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 72 | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>Pseudomonas putida</i> CCM 3423 | + | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| <i>Pseudomonas putida</i> 65 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>Serratia marcescens</i> CCM 303 | + | + | + | + | + | ++ | ++ | ++ |
| <i>Serratia marcescens</i> 64 | + | + | + | + | ++ | + | ++ | ++ |
| <i>Serratia marcescens</i> 67 | + | ++ | + | ++ | + | +++ | ++ | ++ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 51 | + | + | +++ | +++ | + | + | + | + |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 94 | ++ | + | +++ | + | + | + | + | + |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418 | ++ | + | ++ | ++ | + | ++ | + | + |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> 54 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| <i>Staphylococcus intermedius</i> UPa | + | + | + | + | + | + | + | ++ |
| <i>Staphylococcus intermedius</i> 71 | + | + | +++ | ++ | + | + | + | + |
| <i>Staphylococcus intermedius</i> 77 | ++ | ++ | +++ | ++ | + | + | ++ | + |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> CCM 6187 | + | + | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> 73 | 0 | + | + | + | + | + | + | + |

Pozn.: 0 biofilm-negativní, + slabě biofilm-pozitivní, ++ středně biofilm-pozitivní, +++ silně biofilm-pozitivní, BHI – bujón z mozosrdcové infúze, TSB – trypton-sojový bujón
Hodnoty negativní kontroly byly naměřeny pro každý testovaný kmen zvlášť. Tedy mezní hodnoty pro rozřazení do kategorií byly pro každý kmen jiné.

Přílohy 1 – 8 znázorňují porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných kmenů na jednotlivých médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci.

Jak ukazuje **Příloha 1 a 2**, největší tvorba biofilmu po 1 denní kultivaci v BHI bujónu byla zaznamenána u sbírkového kmene *S. aureus* CCM 4223 ($A_{595} = 1,6313$), naopak nejmenší tvorba biofilmu byla zjištěna u sbírkových kmenů *Str. agalactiae* CCM 6187 ($A_{595} = 0,1518$) a *S. intermedius* UPa ($A_{595} = 0,1670$). Klinický izolát *Str. agalactiae* 73 byl vyhodnocen jako biofilm-negativní kmen. Po 2 denní kultivaci byla největší tvorba biofilmu pozorována u klinického izolátu *S. epidermidis* 54 ($A_{595} = 1,8376$), naopak nejnižší tvorba biofilmu u sbírkových kmenů *Str. agalactiae* CCM 6187 ($A_{595} = 0,1263$) a *Ps. putida* CCM 3423 ($A_{595} = 0,1313$).

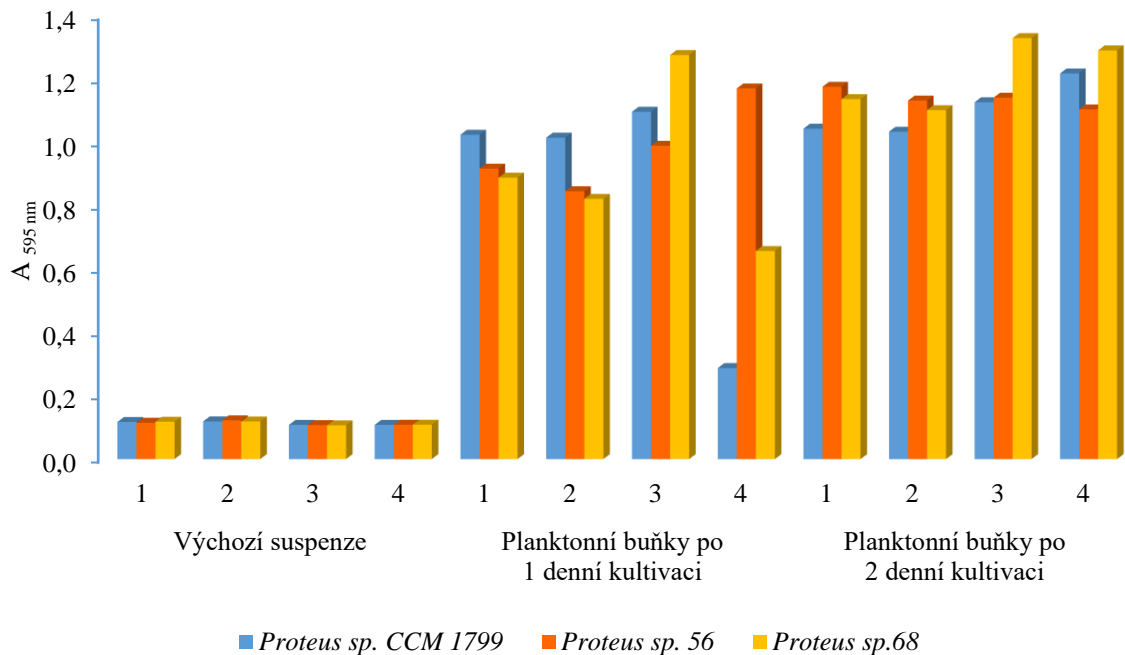
Z **Přílohy 3 a 4** je patrné, že největší tvorba biofilmu po 1 denní kultivaci v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy byla u sbírkového kmene *S. aureus* CCM 4223 ($A_{595} = 2,5522$), zatímco nejmenší tvorba biofilmu byla u kmenů *Ser. marcescens* CCM 303 ($A_{595} = 0,1797$), *S. intermedius* UPa. ($A_{595} = 0,1842$) a *Str. agalactiae* 73 ($A_{595} = 0,1951$). Po 2 denní kultivaci byla největší tvorba biofilmu pozorována u sbírkového kmene *S. aureus* CCM 4223 ($A_{595} = 2,4314$) a naopak nejmenší tvorba biofilmu u klinického izolátu *Proteus* sp. 68 ($A_{595} = 0,1233$).

Jak znázorňuje **Příloha 5 a 6**, největší tvorba biofilmu po 1 denní kultivaci v TSB bujónu byla zaznamenána u sbírkového kmene *S. aureus* CCM 4223 ($A_{595} = 1,5071$). Naopak nejmenší tvorba biofilmu byla u klinických izolátů *S. aureus* 51 ($A_{595} = 0,1516$) a *S. aureus* 94 ($A_{595} = 0,1529$). Po 2 denní kultivaci byla největší tvorba biofilmu pozorována u klinických izolátů *Proteus* sp. 56 ($A_{595} = 1,1205$) a *P. aeruginosa* 70 ($A_{595} = 1,0748$). Naopak nejmenší tvorba biofilmu byla zaznamenána u klinických izolátů *S. aureus* 51 ($A_{595} = 0,1434$) a *S. aureus* 94 ($A_{595} = 0,1445$).

V **Přílohách 7 a 8** je zaznamenána tvorba biofilmu po 1 denní a 2 denní kultivaci v TSB bujónu s 1 % glukózy. Stejně jako v TSB bujónu byla největší tvorba biofilmu vyhodnocena u kmene *S. aureus* CCM 4223 ($A_{595} = 1,4594$), naopak nejmenší tvorba biofilmu byla zaznamenána u klinických izolátů *S. aureus* 51 ($A_{595} = 0,1480$) a *S. aureus* 94 ($A_{595} = 0,1537$). Po 2 denní kultivaci byla největší tvorba biofilmu pozorována u klinických izolátů *P. aeruginosa* 70 ($A_{595} = 1,1310$) a *Proteus* sp. 56 ($A_{595} = 1,0739$). Naopak nejmenší tvorba byla zaznamenána u klinických izolátů *S. aureus* 51 ($A_{595} = 0,1560$) a *S. aureus* 94 ($A_{595} = 0,1548$).

4.1.3 Růst planktonních buněk v testovaných médiích

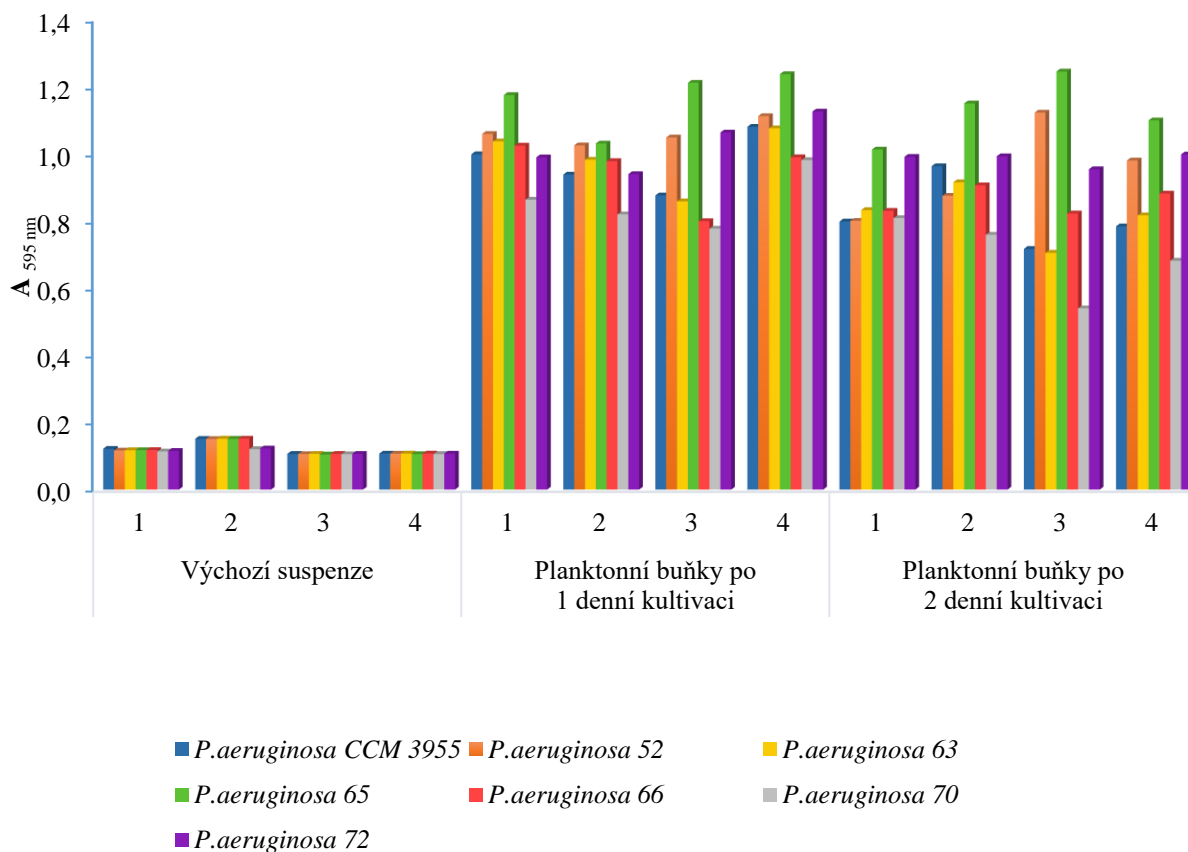
Grafy 1 – 8 znázorňují růst testovaných kmenů ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C.



Graf 1 - Porovnání růstu *Proteus species* ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C

1 - BHI bujón, 2 - BHI bujón s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, 3 - TSB bujón, 4 - TSB bujón s 1 % glukózy

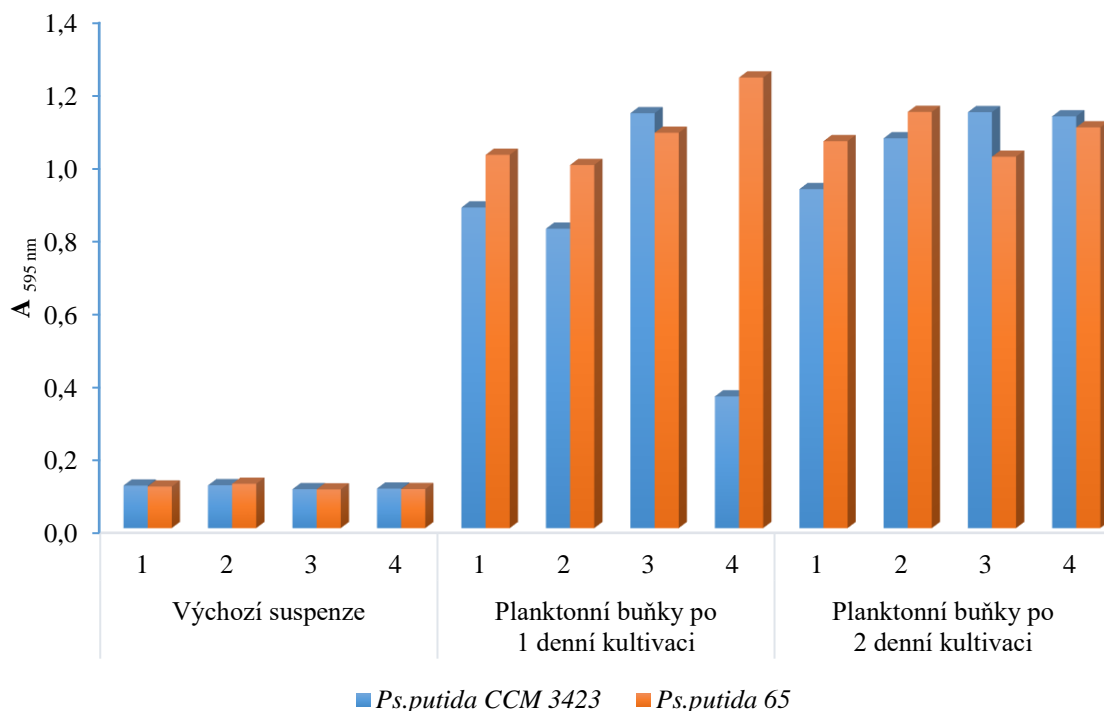
Z Grafu 1 je patrné, že všechny testované kmeny *Proteus species* jsou schopny růstu ve všech testovaných médiích. Intenzita růstu se liší v jednotlivých médiích. Po 1 denní kultivaci, byl u většiny testovaných kmenů největší růst v TSB bujónu, těsně následovaný čistým BHI bujónem a BHI bujónem s 2 % glukózy a 2 % sacharózy. Intenzita růstu se lišila v TSB médiu s 1 % glukózy po 1 denní kultivaci, kde kmeny *Proteus sp. CCM 1799* a *Proteus sp. 68* prokázaly nejnižší schopnost růstu, naopak klinický izolát *Proteus sp. 56* v tomto médiu rostl nejlépe. Po 2 denní kultivaci byl růst u všech kmenů ve všech médiích vyšší, kromě klinického izolátu *Proteus sp. 56*, u kterého byl pozorován nepatrný pokles růstu v TSB bujónu s 1 % glukózy v porovnání s 1 denní kultivací. Dokonce i růst kmenů *Proteus sp. CCM 1799* a *Proteus sp. 68* v TSB bujónu s 1 % glukózy byl srovnatelný s ostatními médii.



Graf 2 - Porovnání růstu *Pseudomonas aeruginosa* ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C

1 - BHI bujón, 2 - BHI bujón s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, 3 - TSB bujón, 4 – TSB bujón s 1 % glukózy

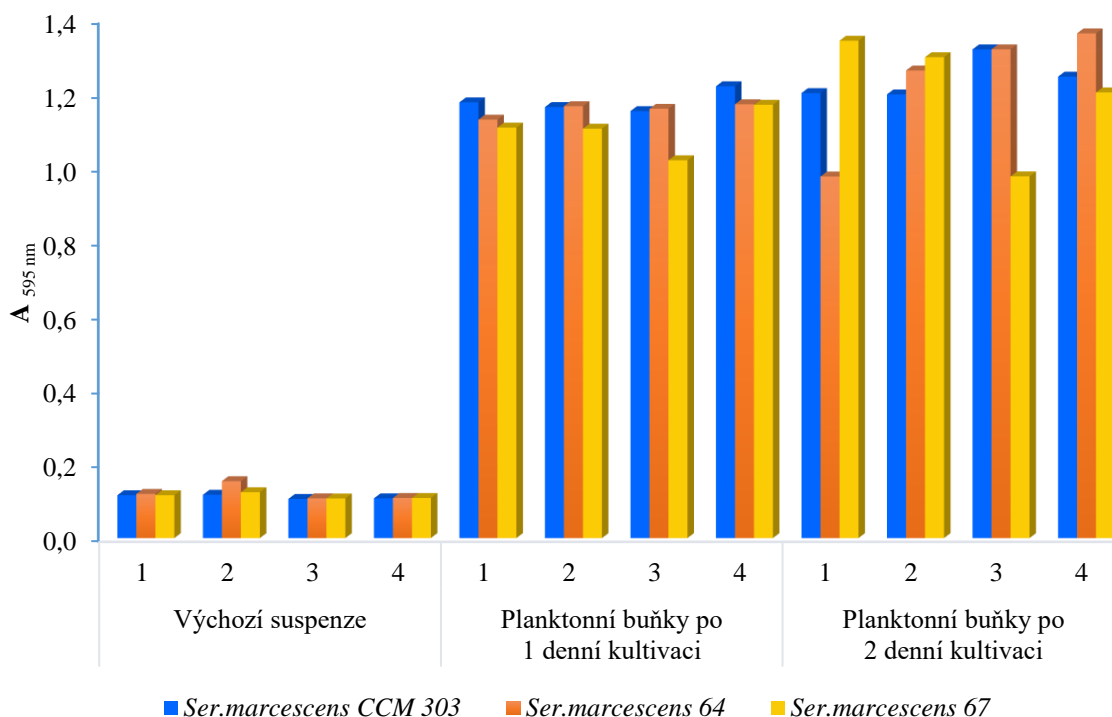
Z **Grafu 2** vyplývá, že všechny testované kmeny druhu *Pseudomonas aeruginosa* jsou schopny růst ve všech testovaných médiích. Po 1 denní kultivaci byl nejvyšší růst pozorován v TSB bujónu s 1 % glukózy. V ostatních médiích se růst testovaných kmenů lišil. Po 2 denní kultivaci byla pozorována u některých kmenů menší intenzita růstu. Můžeme se domnívat, že tento pokles by mohl být způsoben přechodem některých planktonních buněk do biofilmu.



Graf 3 - Porovnání růstu *Pseudomonas putida* ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C

1 - BHI bujón, 2 - BHI bujón s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, 3 - TSB bujón, 4 - TSB bujón s 1 % glukózy

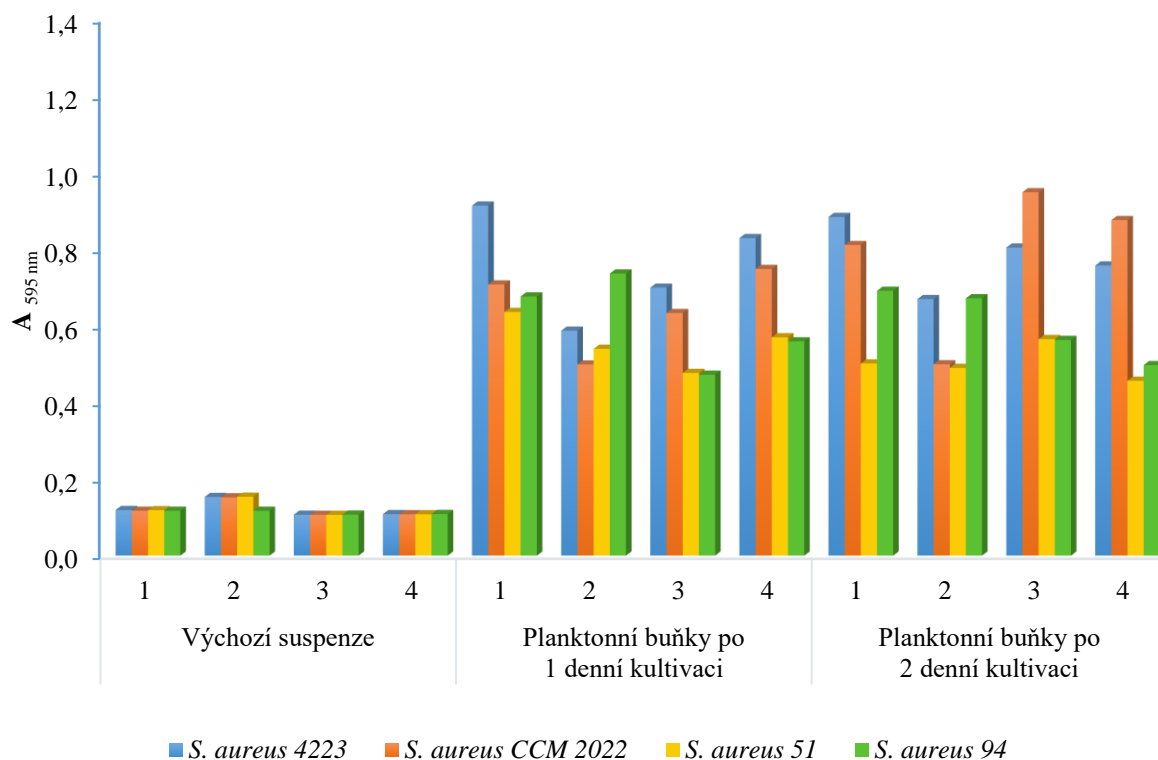
Graf 3 zobrazuje růst planktonních buněk sledovaných kmenů *Pseudomonas putida* ve všech testovaných médiích. Sbírkový kmen *Ps. putida* CCM 3423 roste nejlépe v TSB bujónu, zatímco v TSB bujónu s 1 % glukózy byl po 1 denní kultivaci pozorován 4x nižší růst než v čistém TSB bujónu. Po 2 denní kultivaci byl růst nepatrně vyšší ve všech médiích a dokonce růst v TSB s 1 % glukózy byl srovnatelný s růstem v ostatních médiích. Po 1 denní kultivaci klinický izolát *Ps. putida* 65 rostl nejlépe v TSB bujónu s 1 % glukózy. Po 2 denní kultivaci byla intenzita nárůstu nepatrně nižší v TSB bujónu a TSB bujónu s 1 % glukózy, v BHI bujónu a BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy byla pozorována vyšší intenzita nárůstu.



Graf 4 - Porovnání růstu *Serratia marcescens* ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C

1 - BHI bujón, 2 - BHI bujón s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, 3 - TSB bujón, 4 - TSB bujón s 1 % glukózy

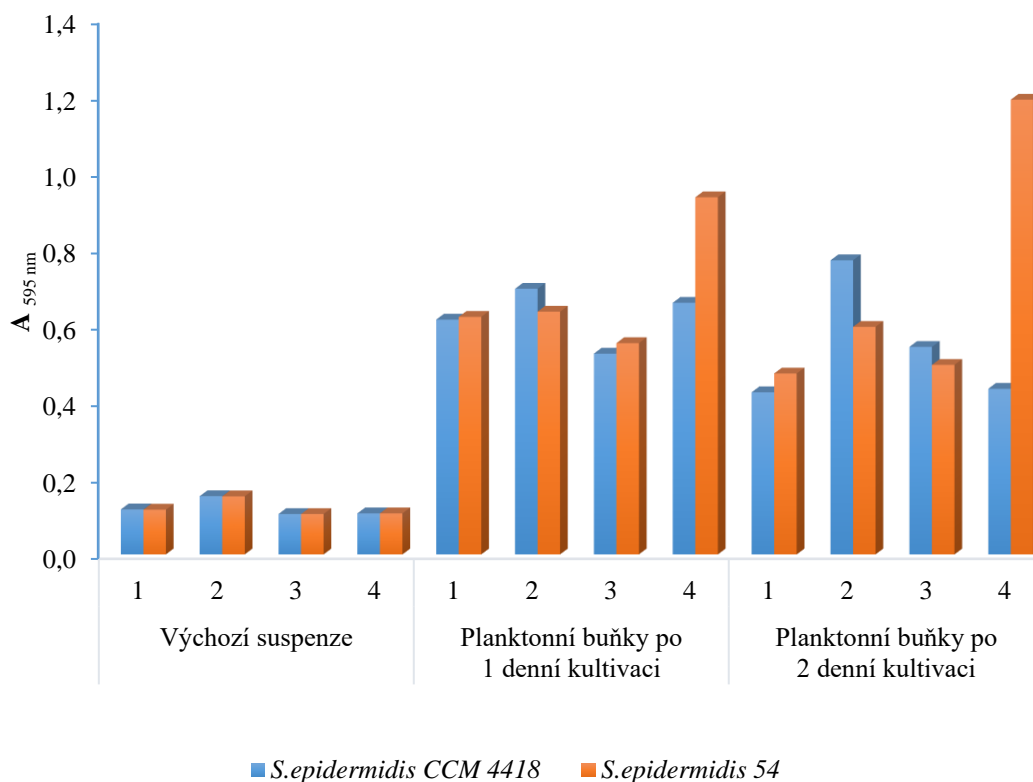
Růst planktonních buněk sledovaných kmenů *Serratia marcescens* ve všech testovaných médiích znázorňuje **Graf 4**. Po 1 denní kultivaci všechny testované kmeny *Ser. marcescens* rostly srovnatelně stejně ve všech médiích. Po 2 denní kultivaci lze pozorovat u sbírkového kmene *Ser. marcescens* CCM 303 nepatrně vyšší intenzitu růstu ve všech médiích. U klinického izolátu *Ser. marcescens* 64 poklesl růst v BHI bujónu po 2 denní kultivaci, zatímco v ostatních médiích byl pozorován větší růst. Po 2 denní kultivaci u klinického izolátu *Ser. marcescens* 67 byl pozorován větší růst ve všech médiích kromě TSB bujónu, kde byl růst nižší než po 1 denní kultivaci.



Graf 5 - Porovnání růstu *Staphylococcus aureus* ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C

1 - BHI bujón, 2 - BHI bujón s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, 3 - TSB bujón, 4 - TSB bujón s 1 % glukózy

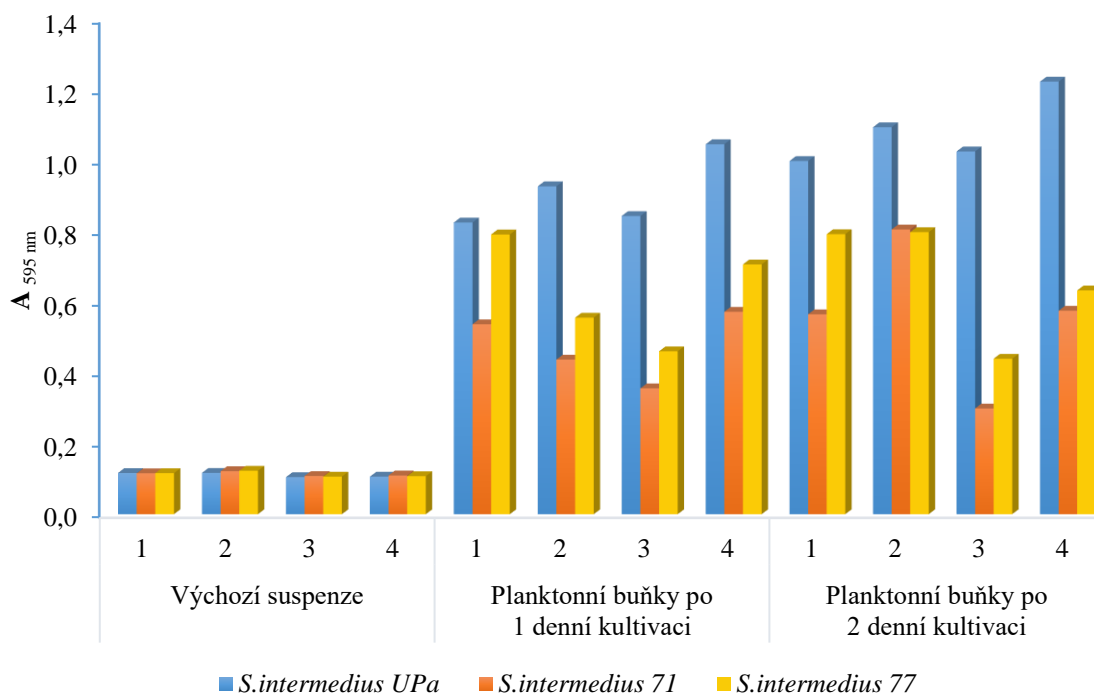
Staphylococcus aureus je schopen růst ve všech testovaných médiích, jak je patrné z **Grafu 5**. Po 1 denní kultivaci byl u sbírkového kmene *S. aureus* CCM 4223 pozorován největší růst v BHI médiu. Sbírkový kmen *S. aureus* CCM 2022 rostl nejlépe v TSB bujónu s 1 % glukózy. Nejmenší růst byl zaznamenán u obou sbírkových kmenů v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy. Kmen *S. aureus* 51 rostl nejlépe v BHI bujónu a kmen *S. aureus* 94 v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy. Nejmenší růst byl pozorován u obou klinických izolátů v TSB bujónu. Po 2 denní kultivaci se intenzita růstu u některých kmenů zvýšila a u některých snížila.



Graf 6 - Porovnání růstu *Staphylococcus epidermidis* ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C

1 - BHI bujón, 2 - BHI bujón s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, 3 - TSB bujón, 4 - TSB bujón s 1 % glukózy

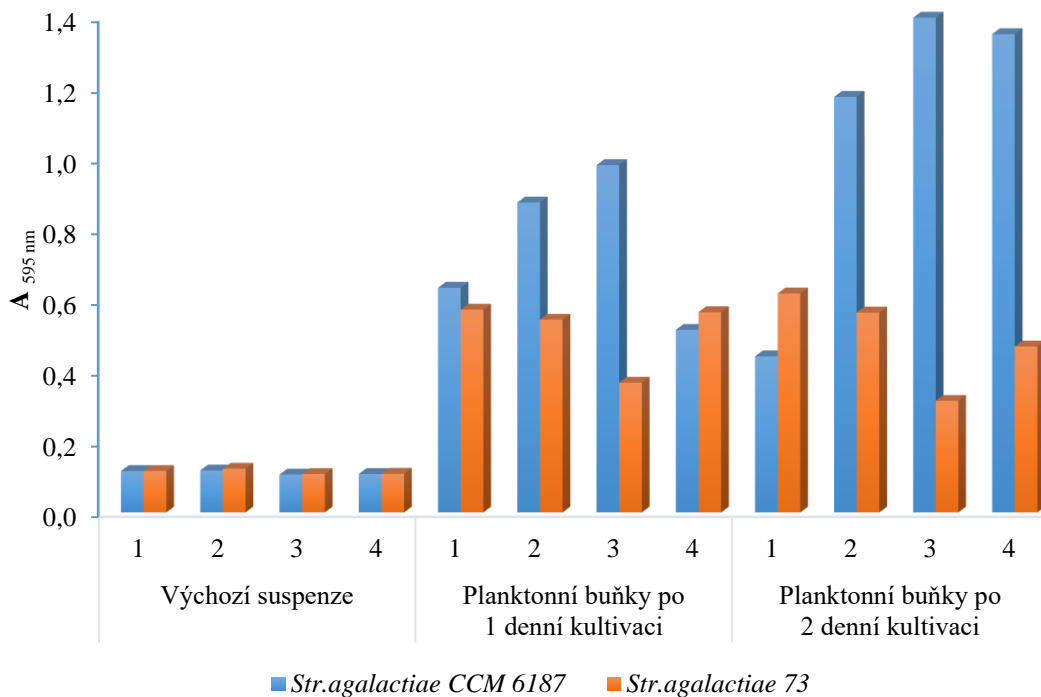
Graf 6 znázorňuje růst buněk *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 a klinického izolátu *Staphylococcus epidermidis* 54. U sbírkového kmene *S. epidermidis* CCM 4418 byla po 1 denní kultivaci pozorována největší intenzita růstu v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, naopak klinický izolát *S. epidermidis* 54 rostl nejlépe v TSB bujónu s 1 % glukózy. Po 2 denní kultivaci je pozorován pokles intenzity růstu u sbírkového kmene *S. epidermidis* CCM 4418 ve všech médiích, kromě BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, kde byl zaznamenán větší nárůst. Po 2 denní kultivaci klinický izolát *S. epidermidis* 54 rostl v TSB bujónu s 1 % glukózy ještě více, zatímco u ostatních médií byl pozorován pokles intenzity růstu.



Graf 7 - Porovnání růstu *Staphylococcus intermedius* ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C

1 - BHI bujón, 2 - BHI bujón s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, 3 - TSB bujón, 4 - TSB bujón s 1 % glukózy

Z **Grafu 7** lze říci, že *Staphylococcus intermedius* je schopen růst ve všech vybraných médiích. Po 1 denní kultivaci byla nejvyšší intenzita růstu zaznamenána u sbírkového kmene *S. intermedius* UPa a u klinického izolátu *S. intermedius* 71 v TSB bujónu s 1 % glukózy, zatímco u klinického izolátu *S. intermedius* 77 v BHI bujónu. Po 2 denní kultivaci byla pozorována snížená intenzita růstu u klinického izolátu *S. intermedius* 71 v TSB médiu a klinického izolátu *S. intermedius* 77 v BHI bujónu, TSB bujónu a TSB médiu s 1 % glukózy. To může být způsobeno přechodem některých planktonních buněk do biofilmu.



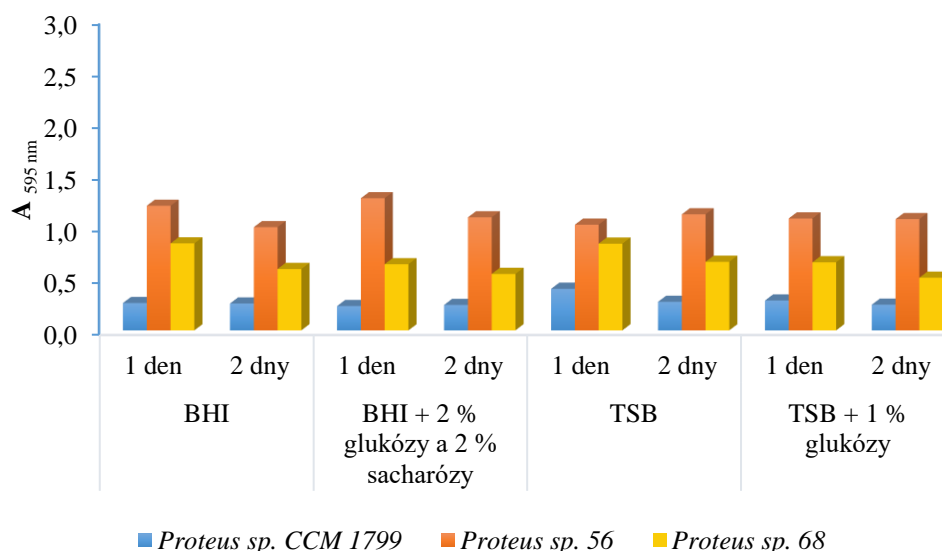
Graf 8 - Porovnání růstu *Streptococcus agalactiae* ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C

1 - BHI bujón, 2 - BHI bujón s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, 3 - TSB bujón, 4 – TSB bujón s 1 % glukózy

Z **Grafu 8** vyplývá, že všechny testované kmeny druhu *Streptococcus agalactiae* rostou ve všech testovaných médiích. Po 1 denní kultivaci byl největší růst pozorován u sbírkového kmene *Str. agalactiae* CCM 6187 v TSB médiu a u klinického izolátu *Str. agalactiae* 73 v TSB médiu s 1 % glukózy. Po 2 denní kultivaci došlo u sbírkového kmene *Str. agalactiae* CCM 6187 ke zvýšení intenzity růstu ve všech médiích, kromě BHI bujónu. U klinického izolátu *Str. agalactiae* 73 došlo ke snížení nárůstu v TSB bujónu a TSB bujónu s 1 % glukózy.

4.1.4 Tvorba biofilmu u testovaných mikroorganismů

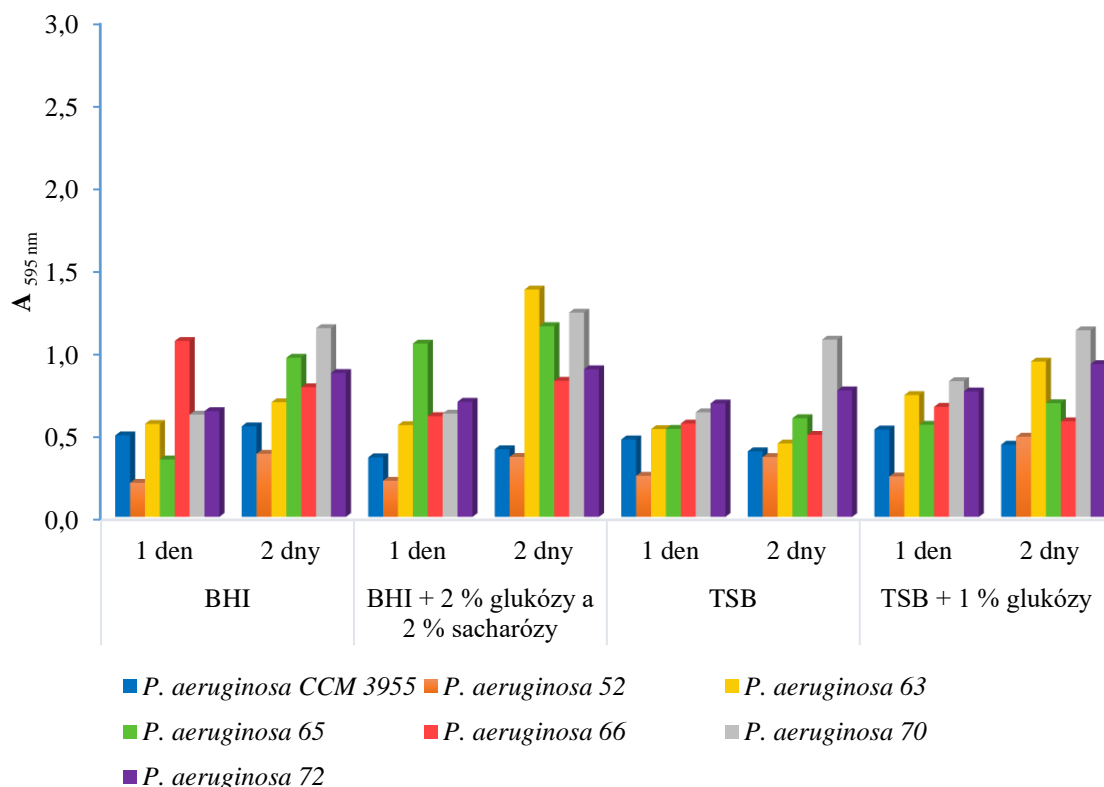
Grafy 1 – 8 znázorňují tvorbu biofilmu testovaných kmenů na vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C



Graf 9 - Porovnání tvorby biofilmu *Proteus species* ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C

Jak znázorňuje **Graf 9**, u všech sledovaných kmenů *Proteus species* došlo k tvorbě biofilmu. U sbírkového kmene *Proteus sp. CCM 1799* byla zjištěna nižší tvorba biofilmu na rozdíl od klinických izolátů. U sbírkového kmene byla nejvyšší hodnota absorbance naměřena v TSB bujónu. Nejvyšší tvorbu biofilmu můžeme ve všech médiích pozorovat u klinického izolátu *Proteus sp. 56*, kdy nejvyšší hodnota absorbance byla pozorována v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy. Klinický izolát *Proteus sp. 68* nedosahoval tak vysokých hodnot, nejlépe ale biofilm tvořil v BHI bujónu. Po 2 denní kultivaci můžeme pozorovat malý pokles v množství biofilmu, který může být způsoben uvolňováním bakteriálních buněk z biofilmu během procesu promývání.

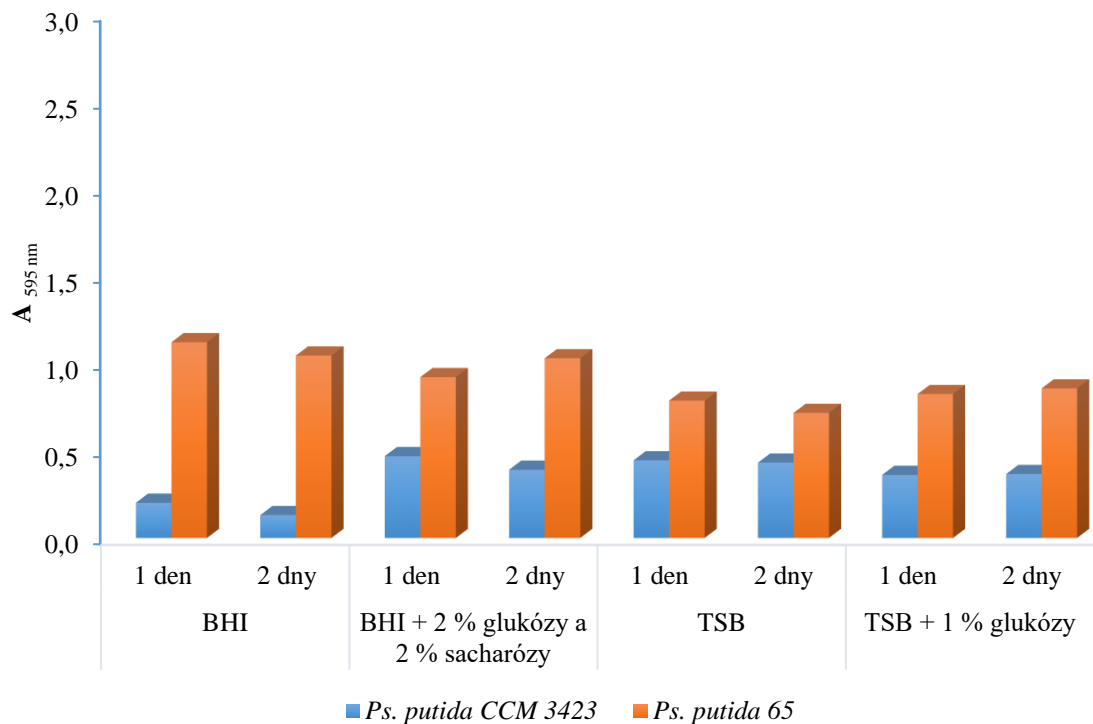
Vatan *et al.* (2017) sledovali tvorbu biofilmu u bakterií izolovaných od pacientů se syndromem diabetické nohy. V této studii použili k 1 denní kultivaci TSB bujón s 0,25 % glukózy. Tvorba biofilmu byla prokázána u 25 % kmenů *Proteus species*.



Graf 10 - Porovnání tvorby biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C

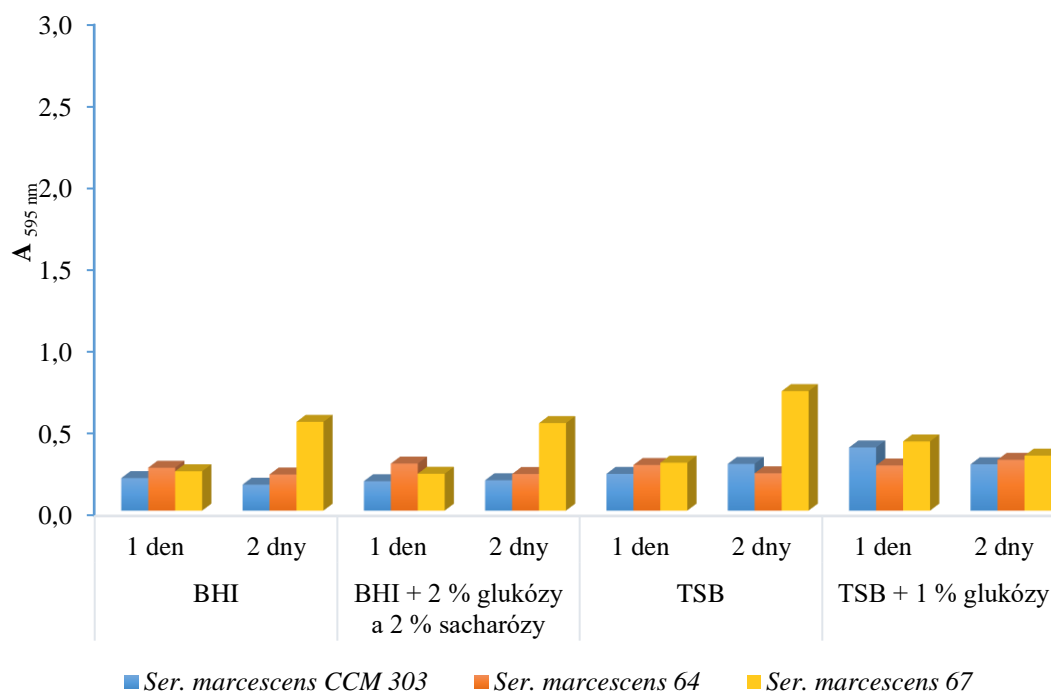
Tvorba biofilmu u testovaných kmenů *Pseudomonas aeruginosa* je zaznamenána v **Grafu 10**. Tvorba biofilmu se u jednotlivých kmenů lišila. Nejmenší tvorba biofilmu byla pozorována u klinického izolátu *P. aeruginosa* 52 a sbírkové kultury *P. aeruginosa* CCM 3955. Po 1 denní kultivaci se většině kmenů nejlépe dařilo tvořit biofilm v TSB bujónu s 1 % glukózy, u klinického izolátu *P. aeruginosa* 65 byla největší tvorba biofilmu zaznamenána v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy a u klinického izolátu *P. aeruginosa* 66 v čistém BHI bujónu. Po 2 denní kultivaci lze pozorovat u většiny kmenů zvýšení hodnot absorbance. Největší nárůst můžeme vidět u klinického izolátu *P. aeruginosa* 63 v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy a u kmene *P. aeruginosa* 65 v BHI médiu.

Sanchez *et al.* (2013) sledovali tvorbu biofilmu u klinických izolátů *P. aeruginosa*. Po 2 denní kultivaci na TSB bujónu byla tvorba biofilmu zaznamenána u 83 % testovaných kmenů.



Graf 11 - Porovnání tvorby biofilmu *Pseudomonas putida* ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C

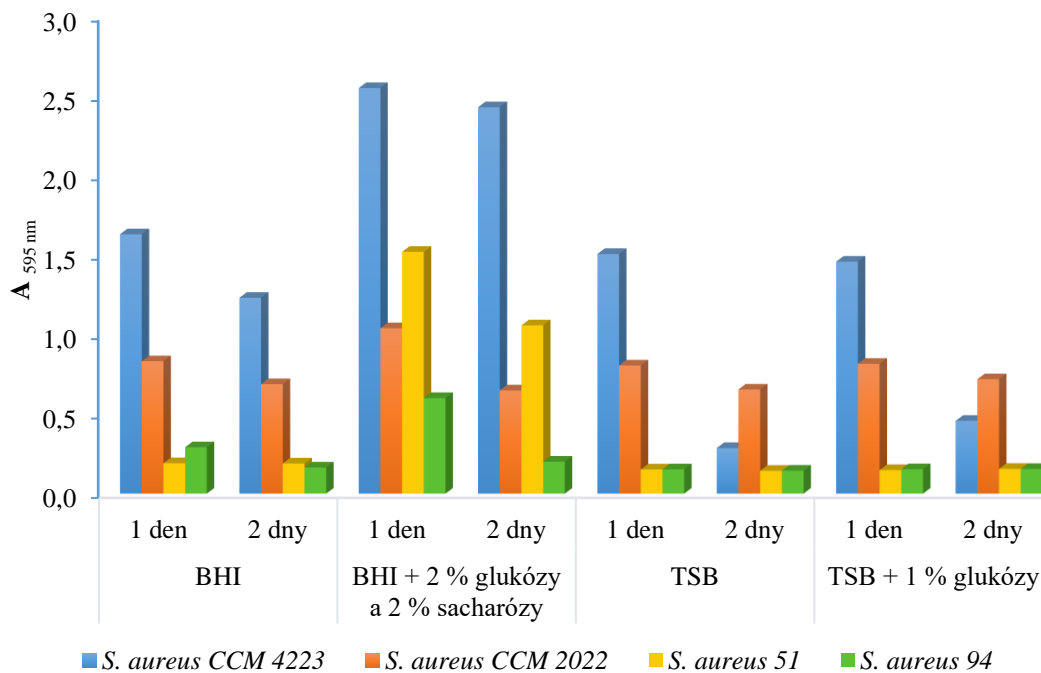
Z **Grafu 11** je zřejmé, že testované kmeny *Pseudomonas putida* jsou schopné tvořit biofilm ve všech testovaných médiích. U klinického izolátu *Ps. putida* 65 byla zjištěna vyšší tvorba biofilmu ve všech médiích, na rozdíl od sbírkového kmene *Ps. putida* CCM 3423. Největší tvorba biofilmu u sbírkového kmene *Ps. putida* CCM 3423 byla pozorována v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, u klinického izolátu *Ps. putida* 65 v čistém BHI bujónu. Po 2 denní kultivaci nebyl zaznamenán velký nárůst hodnot absorbance, naopak ve většině případů jejich mírný pokles.



Graf 12 - Porovnání tvorby biofilmu *Serratia marcescens* ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C

Graf 12 zobrazuje tvorbu biofilmu u kmenů *Serratia marcescens*. Po 1 denní kultivaci nebyly mezi jednotlivými kmeny pozorovány velké rozdíly v hodnotách absorbance. Klinické izoláty *Serratia marcescens* tvořily biofilm ve větší míře než použitý sbírkový kmen. Nicméně nejmenší tvorba biofilmu byla pozorována u sbírkového kmene *Ser. marcescens* CCM 303, a to ve všech médiích kromě TSB bujónu s 1 % glukózy. Největší hodnota absorbance byla u tohoto sbírkového kmene a klinického izolátu *Ser. marcescens* 67 sledována v TSB bujónu s 1 % glukózy, u klinického izolátu *Ser. marcescens* 64 v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy. Po 2 denní kultivaci byl sledován nárůst množství biofilmu u klinického izolátu *Ser. marcescens* 67 ve všech médiích kromě TSB bujónu s 1 % glukózy.

Vatan *et al.* (2017) sledovali tvorbu biofilmu u 339 bakterií izolovaných od pacientů se syndromem diabetické nohy. V této studii použili k 1 denní kultivaci TSB bujón s 0,25 % glukózy a tvorbu biofilmu prokázali u 18 % testovaných kmenů *Serratia marcescens*.



Graf 13 - Porovnání tvorby biofilmu *Staphylococcus aureus* ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C

Z **Grafu 13** je patrné, že všechny sledované kmeny *Staphylococcus aureus* jsou schopny růst v biofilmu ve všech testovaných médiích. Lze také dobře vidět rozdíly mezi sbírkovými kmeny a klinickými izoláty, a to především u sbírkového kmene *S. aureus* CCM 4223, u kterého byly hodnoty absorbance nejvyšší po 1 denní kultivaci ve všech médiích, v porovnání s ostatními kmeny. Všechny testované kmeny prokázaly největší schopnost tvorby biofilmu v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, naopak nejmenší v čistém TSB bujónu. Po 2 denní kultivaci došlo u všech kmenů ke snížení hodnot absorbance ve všech médiích. To může být způsobeno tím, že po 2 dnech mohlo dojít k vyčerpání živin a odlučování jednotlivých bakterií z biofilmu během procesu promývání.

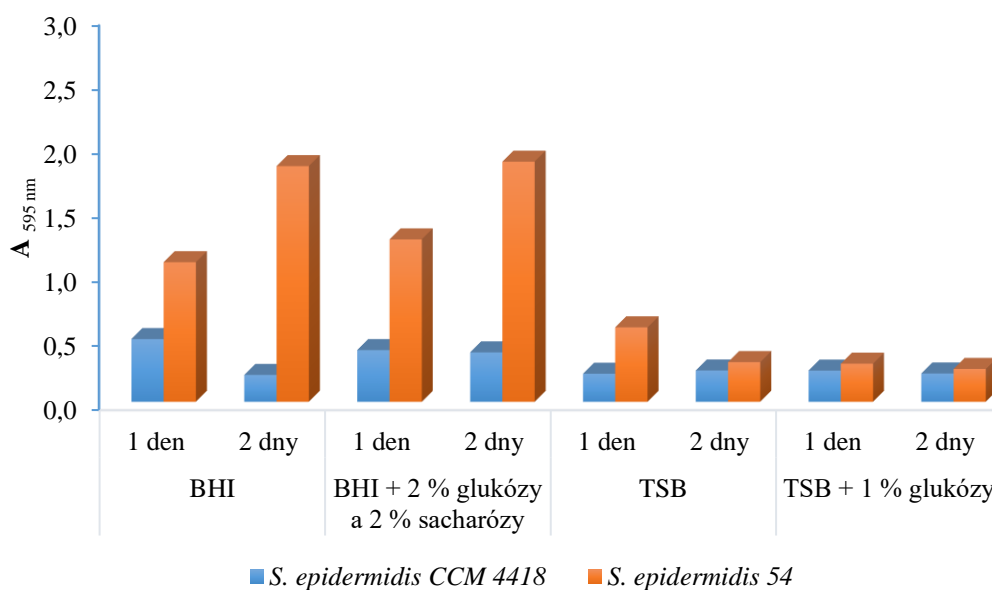
Stepanović *et al.* (2000) ve své studii testovali tvorbu biofilmu u 24 kmenů *S. aureus* v TSB bujónu s 0,25 % glukózy. Po 1 denní kultivaci byly 2 kmeny určeny jako slabě biofilm-pozitivní, 8 kmenů jako středně biofilm-pozitivní a 4 kmeny jako silně biofilm-pozitivní. V naší práci jsme testovali dva klinické izoláty *S. aureus*, které byly v TSB bujónu s 1 % glukózy slabě biofilm-pozitivní a dva sbírkové kmeny, které byly vyhodnoceny jako silně biofilm-pozitivní. Na základě těchto výsledků lze konstatovat,

že všechny testované kmeny jsou schopny tvořit biofilm v TSB bujónu s přidavkem glukózy a tvorba biofilmu se liší kmen od kmene.

Knobloch *et al.* (2002) sledovali tvorbu biofilmu u 128 izolátů kmene *S. aureus*. Produkce biofilmu byla sledována v TSB bujónu, TSB bujónu s 1 % glukózy a BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy. Pro sledování tvorby biofilmu kmene *S. aureus* byla vyhodnocena jako lepší 2 denní kultivace v porovnání s 1 denní kultivací. Z testovaných kmenů bylo jako biofilm-pozitivní vyhodnoceny jen 4 kmeny v TSB bujónu, 49 kmenů v TSB bujónu s 1 % glukózy a 37 kmenů v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy. V naší práci byly všechny sledované kmeny *S. aureus* vyhodnoceny jako biofilm-pozitivní ve všech testovaných médiích a pro jejich kultivaci byla vyhodnocena jako lepší 1 denní kultivace.

Atshan *et al.* (2012) testovali schopnost produkovat biofilmu u kmenů *S. aureus*. Produkci biofilmu sledovali po 2 denní kultivaci v TSB bujónu s 1 % glukózy. Z 60 testovaných kmenů byly všechny vyhodnoceny jako biofilm-pozitivní, z to 2 kmeny jako slabě, 18 jako středně, 25 jako silně a 15 jako velmi silně biofilm-pozitivní. Z našich výsledků byly 2 kmeny vyhodnoceny jako slabě, 1 kmen jako středně a 1 kmen jako silně biofilm-pozitivní.

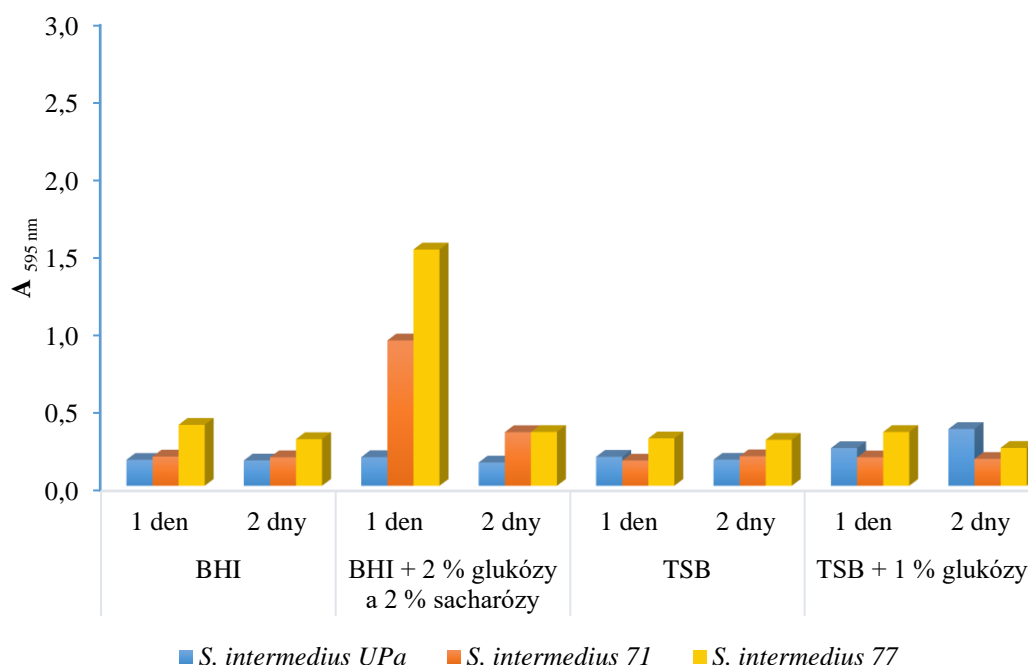
Vatan *et al.* (2017) sledovali tvorbu biofilmu u 339 bakterií izolovaných od pacientů se syndromem diabetické nohy. V této studii použili k 1 denní kultivaci TSB bujón s 0,25 % glukózy. Tvorba biofilmu byla prokázána u 16 % kmenů *Staphylococcus aureus*.



Graf 14 - Porovnání tvorby biofilmu *Staphylococcus epidermidis* ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C

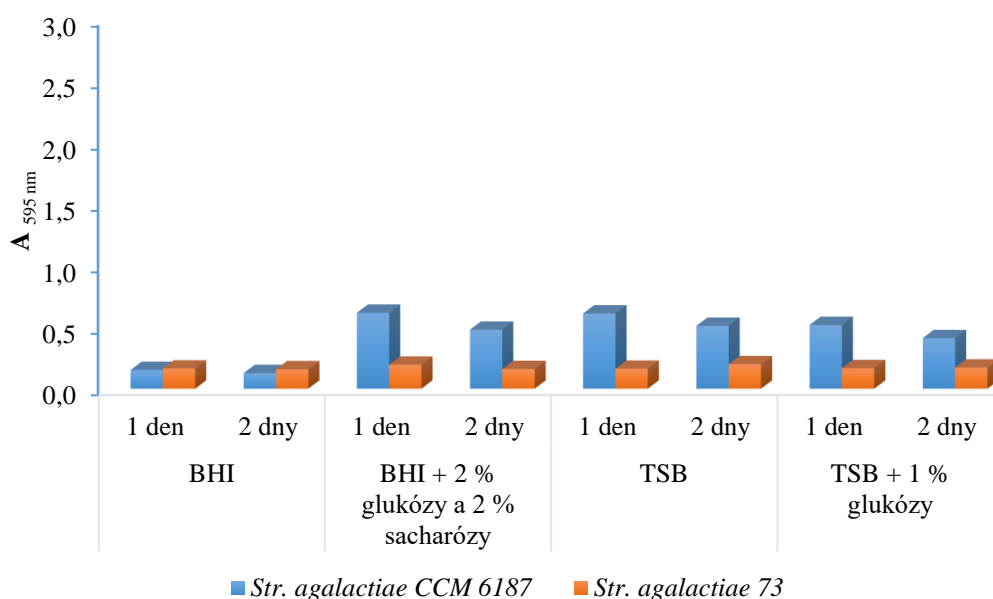
Jak znázorňuje **Graf 14**, *Staphylococcus epidermidis* je schopen růst v biofilmu. U sbírkového kmene *S. epidermidis* CCM 4418 byla prokázána nižší schopnost tvorby biofilmu v porovnání s klinickým kmenem *S. epidermidis* 54. Nejvyšší hodnoty absorbance byly sledovány u sbírkového kmene *S. epidermidis* CCM 4418 v BHI bujónu a u kmene *S. epidermidis* 54 v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy. Po 2 denní kultivaci došlo u klinického izolátu *S. epidermidis* 54 k nárůstu množství biofilmu v BHI bujónu a BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, naopak u sbírkového kmene *S. epidermidis* CCM 4418 došlo k poklesu hodnot. V TSB bujónu a TSB bujónu s 1 % glukózy bylo u obou kmenů pozorováno snížení hodnot absorbance.

Deighton a Balkau (1990) sledovali tvorbu biofilmu u kmenů *S. epidermidis* v TSB bujónu a TSB bujónu s přídavkem glukózy. Ze 100 kmenů v TSB bujónu s přídavkem glukózy (kultivace 18h) bylo 54 kmenů klasifikováno jako biofilm-negativní, 23 kmenů jako slabě biofilm-pozitivní a 23 kmenů jako silně biofilm-pozitivní. V čistém TSB bujónu bylo mnohem více kmenů klasifikováno jako biofilm-negativní. V této práci jsme testovali dva kmeny *S. epidermidis* a u obou byla prokázána tvorba biofilmu. Sbírkový kmen byl zařazen do slabě biofilm-pozitivních kmenů a klinický izolát do silně biofilm-pozitivních kmenů.



Graf 15 - Porovnání tvorby biofilmu *Staphylococcus intermedius* ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C

Z **Grafu 15** je zřejmé, že *Staphylococcus intermedius* je schopen tvořit biofilm, po 1 denní kultivaci byly největší hodnoty absorbance sledovány u kmene *S. intermedius* 77, nižší pak u kmene *S. intermedius* 71 a sbírkového kmene *S. intermedius* UPa. Největších hodnot absorbance dosahovaly klinické kmeny v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy, sbírkový kmen v TSB bujónu s 1 % glukózy. Po 2 denní kultivaci došlo většinou k poklesu hodnot absorbance, dokonce u klinického izolátu *S. intermedius* 77 v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy byly hodnoty 4x menší v porovnání s 1 denní kultivací. Zvýšení hodnot po 2 denní kultivaci bylo pozorováno jen u sbírkového kmene v TSB bujónu s 1 % glukózy.



Graf 16 - Porovnání tvorby biofilmu *Streptococcus agalactiae* ve vybraných médiích po 1 denní a 2 denní kultivaci při 37 °C

Jak bylo uvedeno v **Tabulce 5**, klinický izolát *Str. agalactiae* 73 byl vyhodnocen jako biofilm-negativní kmen v BHI bujónu. Ačkoliv hodnoty v ostatních médiích byly hraniční, byl v nich vyhodnocen jako biofilm-pozitivní. U sbírkového kmene *Str. agalactiae* CCM 6187 byly hodnoty v BHI bujónu také hraniční, nicméně jak můžeme vidět v **Grafu 16**, v ostatních médiích byl schopen větší tvorby biofilmu. Po 2 denní kultivaci došlo k mírnému snížení hodnot absorbance.

Pozn.: Hodnoty negativní kontroly byly naměřeny pro každý testovaný kmen zvlášť. Tedy mezní hodnoty pro rozřazení do kategorií byly pro každý kmen jiné. Takže ačkoliv v grafu 16 můžeme vidět vyšší hodnotu absorbance v BHI bujónu u klinického izolátu než u sbírkového kmene, tak byl klinický izolát vyhodnocen jako biofilm-negativní a naopak sbírkový kmen jako biofilm-pozitivní.

5 ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce shrnuje dosavadní poznatky o tvorbě biofilmu, jeho funkci a vlivu na hojení ran. Dále se zabývá detekcí biofilmu, a to především sledováním tvorby biofilmu u bakterií, které se vyskytují v chronických ranách.

V práci byla pomocí Christensenovy metody v mikrotitračních destičkách ověřena tvorba biofilmu u bakterií izolovaných z chronických ran, a to konkrétně u kmenů *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius*, *Proteus species*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens* a *Streptococcus agalactiae*.

Kromě klinického izolátu *Streptococcus agalactiae*, byla tvorba biofilmu prokázána u všech sledovaných kmenů ve všech testovaných médiích. Ke sledování tvorby biofilmu doporučujeme barvení destičky po 1 denní kultivaci. Při prodloužení kultivační doby může docházet k odlupování svrchních vrstev biofilmu. Po 2 denní kultivaci byla vyšší tvorba biofilmu pozorována jen u některých kmenů *Pseudomonas aeruginosa*. Dále bylo zjištěno, že většina klinických izolátů jsou lepšími producenty biofilmu v porovnání se sbírkovými kmeny téhož druhu. Výjimku tvořily bakterie druhu *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus agalactiae*, u kterých byla pozorována vyšší tvorba biofilmu u sbírkových kmenů. Co se týče složení kultivačního média, nelze jednoznačně pro tvorbu biofilmu doporučit jen jedno médium, jelikož každý kmen se choval odlišně.

Sledování tvorby biofilmu bakterií je velmi důležité, protože růst bakterií v biofilmu představuje významný faktor patogenity bakterií a znalost přítomnosti biofilmu by měla mít vliv na postup při léčbě pacienta. Nejlepších výsledků detekce tvorby biofilmu lze dosáhnout vzájemnou kombinací několika metod. Bylo zjištěno, že biofilmy bakterií izolovaných z chronických ran se formují již v relativně krátkém čase. Odstranění biofilmů z chronických ran je velmi náročné, a je proto žádoucí cílit terapii přímo na bakterie žijící v biofilmu.

Závěrem lze konstatovat, že Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách je vhodná ke sledování tvorby biofilmu u bakterií izolovaných z chronických ran. Tato metoda je současně nejčastěji používanou metodou k detekci tvorby biofilmu, neboť je rychlá, jednoduchá a reprodukovatelná. Umožňuje kultivaci bakteriální suspenze paralelně ve více jamkách najednou, což zpřesňuje hodnocení. Dále také umožňuje sledování několika druhů bakterií v několika médiích najednou. Jedinou nevýhodou této metody je nemožnost simulace reálného prostředí.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALLIGNET, J., GALDBART, J. O., MORVAN, A., *et al.* Tracking adhesion factors in *Staphylococcus caprae* strains responsible for human bone infections following implantation of orthopaedic material. *Microbiology*, 1999, 145 (1), 2033-2042.

ARCIOLA, C. R., CAMPOCCIA, D., BALDASSARRI, L., *et al.* Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2006, 76 (2), 425-430.

ATSHAN, S. S., SHAMSUDIN, M. N., SEKAWI, Z. *et al.* Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 2012 (1), 1-10.

AZEREDO, J., AZEVEDO, N. F., BRIANDET, R., *et al.* Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, 2017, 43 (3), 313-351.

BERTESTEANU, S., TRIARIDIS, S., STANKOVIC, M., *et al.* Polymicrobial wound infections: Pathophysiology and current therapeutic approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 463 (2), 119-126.

BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 2013, 121 (136), 1-51.

BRIDIER, A., DUBOIS-BRISONNET, F., BOUBETRA, A., *et al.* The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 82 (1), 64-70.

CERQUEIRA, L., AZEVEDO, N., ALMEIDA, C., *et al.* DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *International Journal of Molecular Sciences*, 2008, 9 (10), 1944-1960.

CHANDKI, R., BANTHIA, P. a BANTHIA, R. Biofilms: A microbial home. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 2011, 15 (2), 111-114.

CHRISTENSEN, G. D., SIMPSON, A. W., YOUNGER, J. J., *et al.* Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Applied Microbiology*, 1985, 22 (6), 996-1006.

- CHRISTENSEN, B. B., HAAGENSEN, J. A. J., HEYDORN, A., *et al.* Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (5), 2495-2502.
- CLINTON, A. a CARTER, T. Chronic wound biofilms: Pathogenesis and potential therapies. *Laboratory Medicine*, 2015, 46 (4), 277-284.
- COSTERTON, J. W. *The Biofilm Primer*. New York: Springer, 2007, ISBN 978-3-540-68022-2.
- DARWISH, S. F. a ASFOUR, H. A. E. Investigation of biofilm forming ability in staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *The Scientific World Journal*, 2013. [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2013/378492> [cit.2018-02-05]
- DAVIS, S. C., RICOTTI, C., CAZZANIGA, A., *et al.* Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization *in vivo*. *Wound Repair and Regeneration*, 2008, 16 (1), 23-29.
- DEIGHTON, M. A. a BALKAU, B. Adherence measured by microtiter assay as a virulence marker for *Staphylococcus epidermidis* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990, 28 (11), 2442-2447.
- DJORDJEVIC, D., WIEDMANN, M. a MCLANDBOROUGH, L. A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (6), 2950-2958.
- EL-AMIN, M. M., MOHAMED, H. E. ABD-ELRAZEK G. *et al.* Comparison of different methods for detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and *epidermidis* isolates from central venous catheters. *International Journal of Advanced Research*, 2015, 3 (7), 93-101.
- FAZLI, M., BJARNSHOLT, T., KIRKETERP-MØLLER, K., *et al.* Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *Journal of Clinical and Microbiology*, 2009, 47 (12), 4084-4089.
- FAZLI, M., BJARNSHOLT, T., HØIBY, N., *et al.* PNA-based fluorescence *in situ* hybridization for identification of bacteria in clinical samples. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1211 (1), 261-271.

- FREBOURG, N. B., LEFEBVRE, S., BAERT, S., *et al.* PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38 (2), 877-880.
- FREEMAN, D. J., FALKINER, F. R. a KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 1989, 42 (8), 872-874.
- FRYKBERG, R. G. a BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*, 2015, 4 (9), 560-582.
- HENDRICKS, K. J., BURD, T. A., ANGLIN, J. O., *et al.* Synergy between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model of complex orthopaedic wounds. *The Journal of bone and joint surgery*, 2001, 83 (6), 855-861.
- HOFFMAN, L. R., DÉZIEL, E., D'ARGENIO, D. A., *et al.* Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103 (52), 19890-19895.
- HOJENÍ RAN. [online]. 2017. Dostupné z: <http://www.hojeniran.cz/teorie/chronicke-rany.aspx> [cit.2017-11-11]
- HOLÁ, V. Mikrobiální biofilmy - biofilmová společenstva lidského těla a biofilmové infekce. *Živa*, 2012, 6, 271-275.
- JAMES, G. A., SWOGER, E., WOLCOTT, R., *et al.* Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 2008, 16 (1), 37-44.
- JOHANI, K., MALONE, M., JENSEN, S., *et al.* Microscopy visualisation confirms multi-species biofilms are ubiquitous in diabetic foot ulcers. *International Wound Journal*, 2017, 14 (6), 1160-1169.
- KAISER, T. D. L., PEREIRA, E. M., DOS SANTOS, K. R. N., *et al.* Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2013, 75 (3), 235-239.
- KIRKETERP-MØLLER, K., JENSEN, P. Ø., FAZLI, M., *et al.* Distribution, organization and ecology of bacteria in chronic wounds. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46 (8), 2717-2722.

- KLAUSEN, M., AAES-JØRGENSEN, A., MOLIN, S. *et al.* Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular Microbiology*, 2003, 50 (1), 61-68.
- KNEZEVIC, P. a PETROVIC, O. A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 74 (2), 114-118.
- KNOBLOCH, J., HORSTKOTTE, M., ROHDE, H. *et al.* Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*, 2002, 191 (2), 101-106.
- KVASNIČKOVÁ, E., PALDRYCHOVÁ, M., MAŤÁTKOVÁ, O., a kol. Medicinální aspekty mikrobiálních biofilmů. *Chemické Listy*, 2016, 110 (1), 485-490.
- LEAPER, D., ASSADIAN, O. a EDMISTON, C. E. Approach to chronic wound infections. *British Journal of Dermatology*, 2015, 173 (2), 351-358.
- LEE, J. S., BAE, Y. M. a LEE, S. Y. Development of Congo red broth method for the detection of biofilm-forming or slime-producing *Staphylococcus* sp. *Food Science and Technology*, 2016. [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.023> [cit.2018-03-26]
- LHOTSKÝ, J. *Úvod do studia symbiotických interakcí mikroorganismů: Nový pohled na viry a bakterie*. Praha: Academia, 2015, ISBN 978-80-200-2480-0.
- LI, L., MENDIS, N., TRIGUI, H., *et al.* The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 2014. [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258> [cit.2018-01-22]
- LINDSAY, D. a VON HOLY, A. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiology*, 1997, 14 (4), 383-390.
- LÓPEZ, D., VLAMAKIS, H. a KOLTER, R. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010. [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398> [cit.2018-03-07]
- MALIC, S., HILL, K. E., HAYES, A., *et al.* Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent *in situ* hybridization (PNA FISH). *Microbiology*, 2009, 155 (8), 2603-2611.

- MALONE, M., BJARNSHOLT, T., MCBAIN, A. J., *et al.* The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *Journal of Wound Care*, 2017, 26 (1), 20-25.
- MARIANA, N. S., SALMAN, S. A., NEELA, V., *et al.* Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin–resistance *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research*, 2009, 3 (6), 330-338.
- MIKAMO, H., KAWAZOE, K., IZUMI, K., *et al.* Studies on the pathogenicity of anaerobes, especially *Prevotella bivia*, in a rat pyometra model. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 1998, 6 (2), 61-65.
- MILLER, M. B. a BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55 (1), 165-199.
- MOGHADAM, S. O., POURMAND, M. R. a AMINHARATI, F. Biofilm formation and antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from burn patients. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 2014, 8 (1), 1511-1517.
- MOTTOLA, C., MENDES, J. J., CRISTINO, J. M., *et al.* Polymicrobial biofilms by diabetic foot clinical isolates. *Folia Microbiologica*, 2016, 61 (1), 35-43.
- MØRETRØ, T., HERMANSEN, L., HOLCK, A. L., *et al.* Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (9), 5648-5655.
- MRÁZOVÁ, R., POKORNÁ, A. a KREJCAR, M. Možnosti v hojení ran. *Medicína pro praxi*, 2012, 9 (2), 83-86.
- MULDER, J. G. a DEGENER, J. E. Slime-producing properties of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *Clinical Microbiology and Infection*, 1998, 4 (12), 689-694.
- MÜSKEN, M., DI FIORE, S., RÖMLING, U. *et al.* 96-well-plate–based optical method for the quantitative and qualitative evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its application to susceptibility testing. *Nature Protocols*, 2010, 5 (8), 1460-1469.
- NEUT, D., TIJDENS-CREUSEN, E. J. A., BULSTRA, S. K., *et al.* Biofilms in chronic diabetic foot ulcers - a study of 2 cases. *Acta Orthopaedica*, 2011, 82 (3), 383-385.

- NIVEDITHA, S., PRAMODHINI, S., UMADEVI, S., *et al.* The isolation and the biofilm formation of uropathogens in the patients with catheter associated urinary tract infections. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2012, 6 (9), 1478-1482.
- NOCKER, A., CHING-YING, C. a CAMPER, A. K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 67 (2), 310-320.
- OATES, A., BOWLING, F. L., BOULTON, A. J. M., *et al.* The visualization of biofilms in chronic diabetic foot wounds using routine diagnostic microscopy methods. *Journal of Diabetes Research*, 2014, 2014 (1), 1-8.
- OLIVEIRA, A. a CUNHA, R. S. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BioMed Central Research Notes*, 2010, 3 (1), 1-8.
- OMAR, A., WRIGHT, J., SCHULTZ, G., *et al.* Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms*, 2017. [online]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/153586> [cit.2018-03-07]
- PEETERS, E., NELIS, H. J. a COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 72 (2), 157-165.
- PERCIVAL, S. L., THOMAS, J. G. a WILLIAMS, D. W. Biofilms and bacterial imbalances in chronic wounds: anti-Koch. *International Wound Journal*, 2010, 7 (3), 169-175.
- PERCIVAL, S. L., HILL, K. E., WILLIAMS, D. W., *et al.* A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 2012, 20 (5), 647-657.
- PERDREAU-REMYNGTON, F., SANDE, M. A., PETERS, G., *et al.* The abilities of a *Staphylococcus epidermidis* wild-type strain and its slime-negative mutant to induce endocarditis in rabbits are comparable. *Infection and Immunity*, 1998, 66 (6), 2778-2781.
- POKORNÁ, A. a MRÁZOVÁ, R. *Kompendium hojení ran pro sestry*. Praha: Grada Publishing, 2012, ISBN 978-80-247-3371-5.
- POSPÍŠILOVÁ, A. Přístupy k léčbě chronických ran. *Medicína pro praxi*, 2010, 7 (A), 12-24.

- PURKRTOVÁ, S., PILCHOVÁ, T., ĎURIŠOVÁ, J., a kol. Podmínky tvorby biofilmu u *Listeria monocytogenes*. *Mlékařské listy*, 2009, 128 (1), 12-15.
- RŮŽIČKA, F., HOLÁ, V., VOTAVA, M., *et al.* Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiologica*, 2004, 49 (5), 596-600.
- SABAEIFARD, P., ABDI-ALI, A., SOUDI, M. R. *et al.* Optimization of tetrazolium salt assay for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using microtiter plate method. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 105 (1), 134-140.
- SANCHEZ, C. J., MENDE, K., BECKIUS, M. L., *et al.* Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infectious Diseases*, 2013, 13 (1), 1-12.
- SCALI, C. a KUNIMOTO, B. An update on chronic wounds and the role of biofilms. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 2013, 17 (6), 371-376.
- SCHULTZ, G. S., SIBBALD, R. G., FALANGA, V., *et al.* Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair and Regeneration*, 2003, 11 (1), 1-28.
- SCHULTZ, G., BJARNSHOLT, T., JAMES, G. A., *et al.* Consensus guidelines for the identification and treatment of biofilms in chronic non-healing wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 2017, 25 (5), 744-757.
- SOUMYA, E. A., KORAICHI, I. S., MADANI, K., *et al.* Scanning electron microscopy (SEM) and environmental SEM: Suitable tools for study of adhesion stage and biofilm formation. *Intech Open*, 2012. [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/34990> [cit.2018-03-21]
- STEELE, D. J., FRANKLIN, D. J. a UNDERWOOD, G. J. C. Protection of cells from salinity stress by extracellular polymeric substances in diatom biofilms. *Biofouling*, 2014, 30 (8), 987-998.
- STEPANOVIĆ, S., VUKOVIĆ, D., DAKIĆ, I., *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 40 (2), 175-179.
- STEPANOVIĆ, S., VUKOVIC, D., HOLA, V., *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 2007, 115 (8), 891-9.

- STRÄUBER, H. a MÜLLER, S. Viability states of bacteria - specific mechanisms of selected probes. *Cytometry Part A*, 2010, 77A (7), 623-634.
- SUN, Y., DOWD, S., SMITH, E., *et al.* *In vitro* multispecies Lubbock chronic wound biofilm model. *Wound Repair and Regeneration*, 2008, 16 (6), 805-813.
- SWANSON, T., KEAST, D., COOPER, R., *et al.* Ten top tips: identification of wound infection in a chronic wound. *Wound International*, 2015, 2 (1), 20-25.
- ŠPAČEK, J., BUCHTA, V., JÍLEK, P., a kol. *Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí*. Praha: Grada Publishing, 2013, ISBN 978-80-247-4554-1.
- TAN, C. H., LEE, K. W. K., BURMØLLE, M., *et al.* All together now: experimental multispecies biofilm model systems. *Environmental Microbiology*, 2017. [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13594> [cit.2018-02-07]
- TAVERNIER, S. a COENYE, T. Quantification of *Pseudomonas aeruginosa* in multispecies biofilms using PMA-qPCR. *PeerJ*, 2015. [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.7717/peerj.787> [cit.2018-02-07]
- TAYLOR, M. J., BENTHAM, R. H. a ROSS, K. E. Limitations of using propidium monoazide with qPCR to discriminate between live and dead *Legionella* in biofilm samples. *Microbiology Insights*, 2014. [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.4137/MBI.S17723> [cit.2018-03-07]
- THEBAULT, P., LEQUEUX, I. a JOUENNE, T. Antibiofilm strategies. *Journal of Wound Technology*, 2013. [online]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/286831398_Antibiofilm_strategies [cit.2018-03-20]
- THOMSEN, T. R., AASHOLM, M. S., RUDKJØBING, V. B., *et al.* The bacteriology of chronic venous leg ulcer examined by culture-independent molecular methods. *Wound Repair and Regeneration*, 2010, 18 (1), 38-49.
- TRØSTRUP, H., THOMSEN, K., CALUM, H., *et al.* Animal models of chronic wound care: the application of biofilms in clinical research. *Chronic Wound Care Management and Research*, 2016. [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/CWC.MR.S84361> [cit.2018-03-20]
- VATAN, A., SALTOGLU, N., YEMISEN, M., *et al.* Association between biofilm and multi/extensive drug resistance in diabetic foot infection. *International Journal of Clinical Practice*, 2017. [online]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ijcp.13060> [cit.2018-03-28]

WEST, S. A., DIGGLE, S. P., BUCKLING, A., *et al.* The social lives of microbes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2007, 38 (1), 53-77.

WIMPENNY, J., MANZ, W. a SZEWZYK, U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24, 661-671.

WOLCOTT, R. D., RUMBAUGH, K. P., JAMES, G., *et al.* Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time-dependent therapeutic window. *Journal of Wound Care*, 2010, 19 (8), 320-328.

WOLCOTT, R. D., HANSON, J. D., REES, E. J., *et al.* Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. *Wound Repair and Regeneration*, 2016, 24 (1), 163-174.

7 PŘÍLOHY

Příloha 1 - Porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií v BHI bujónu po 1 denní kultivaci při 37 °C

Příloha 2 - Porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií v BHI bujónu po 2 denní kultivaci při 37 °C

Příloha 3 - Porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy po 1 denní kultivaci při 37 °C

Příloha 4 - Porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy po 2 denní kultivaci při 37 °C

Příloha 5 - Porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií TSB bujónu po 1 denní kultivaci při 37 °C

Příloha 6 - Porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií v TSB bujónu po 2 denní kultivaci při 37 °C

Příloha 7 - Porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií v TSB bujónu s 1 % glukózy po 1 denní kultivaci při 37 °C

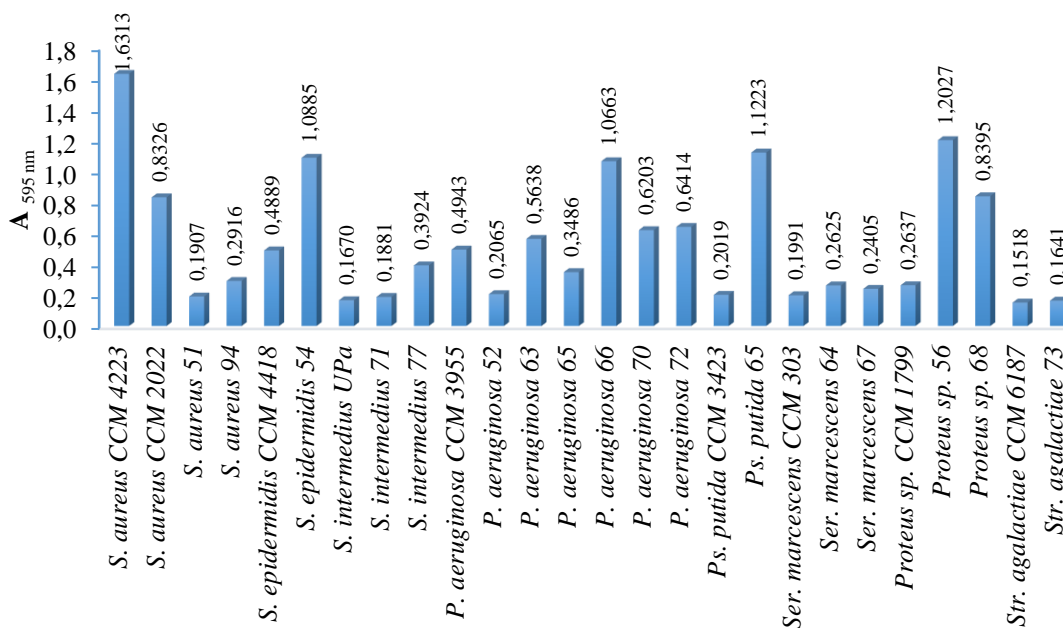
Příloha 8 - Porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií v TSB bujónu s 1 % glukózy po 2 denní kultivaci při 37 °C

Příloha 9 - Polystyrenová mikrotitrační destička

Příloha 10 - Destičky s vybranými kmeny po 2 denní kultivaci v BHI bujónu (nahore) a v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2% sacharózy (dole)

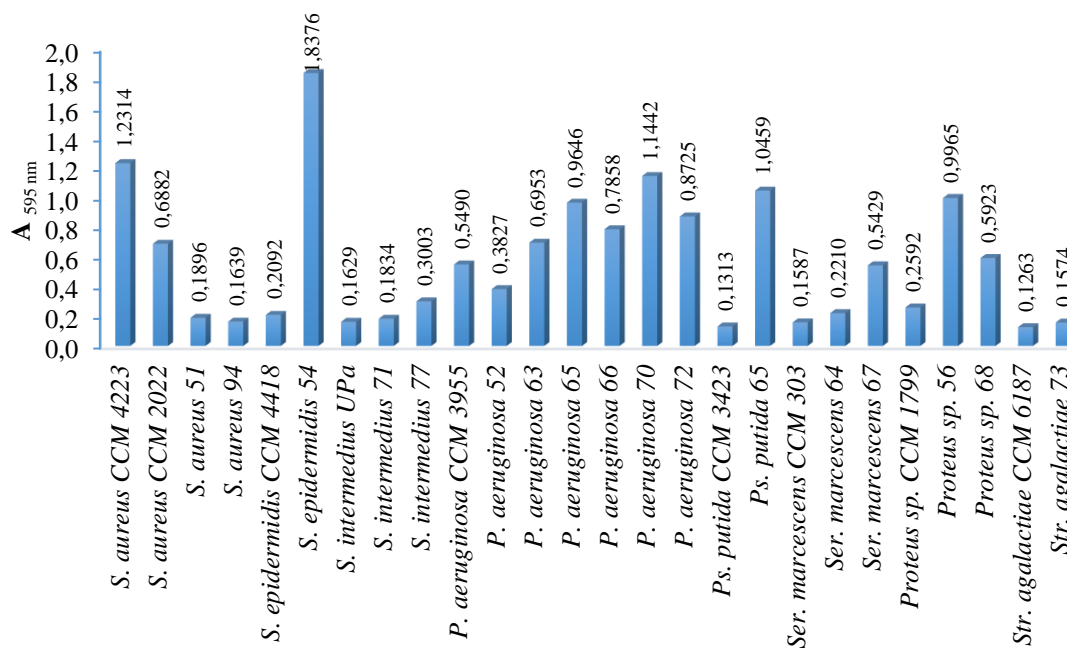
Příloha 11 - Destičky s obarveným biofilmem vybraných kmenů, které byly kultivovány 2 dny v BHI bujónu (dole) a v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy (nahore)

Příloha 12 - Biofilm na dně jamek, destička po promytí a vyschnutí

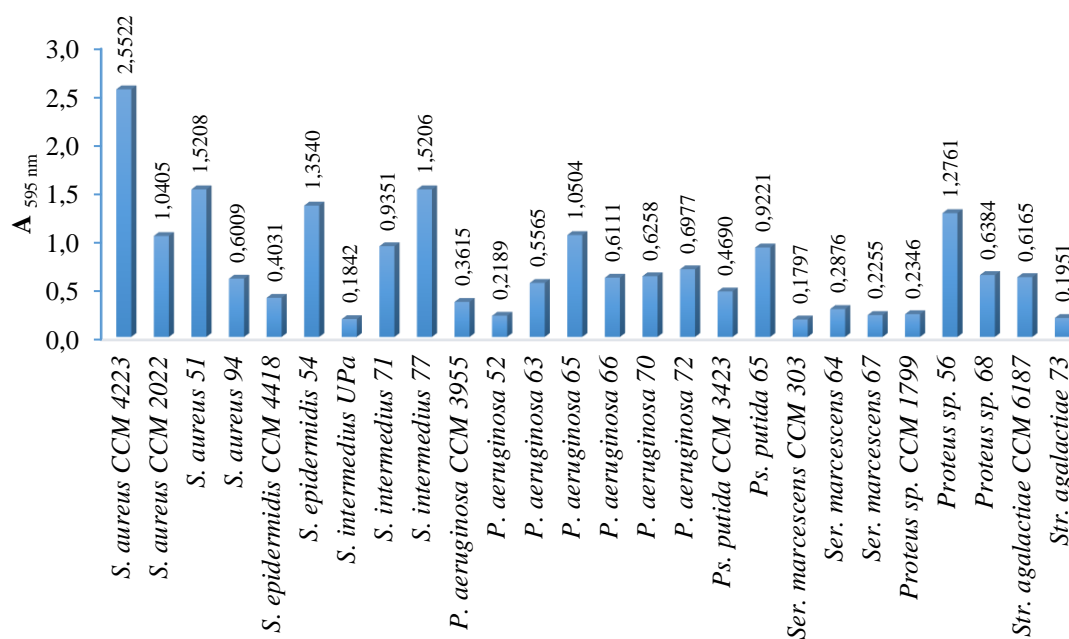


Příloha 1 - Porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií v BHI bujónu po 1 denní kultivaci při 37 °C

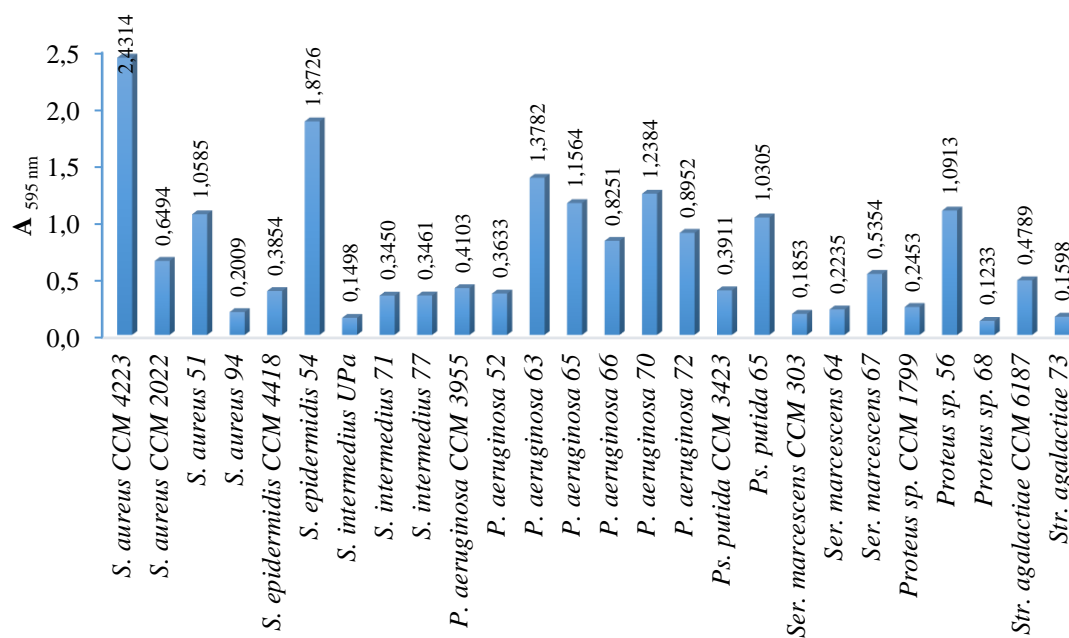
Pozn.: Hodnoty negativní kontroly byly naměřeny pro každý testovaný kmen zvlášť. Tedy mezní hodnoty pro rozřazení do kategorií byly pro každý kmen jiné. Např. můžeme vidět vyšší hodnotu absorbance v BHI bujónu u klinického izolátu *Str. agalactiae* než u sbírkového kmene, ale klinický izolát byl vyhodnocen jako biofilm-negativní a naopak sbírkový kmen jako biofilm-pozitivní.



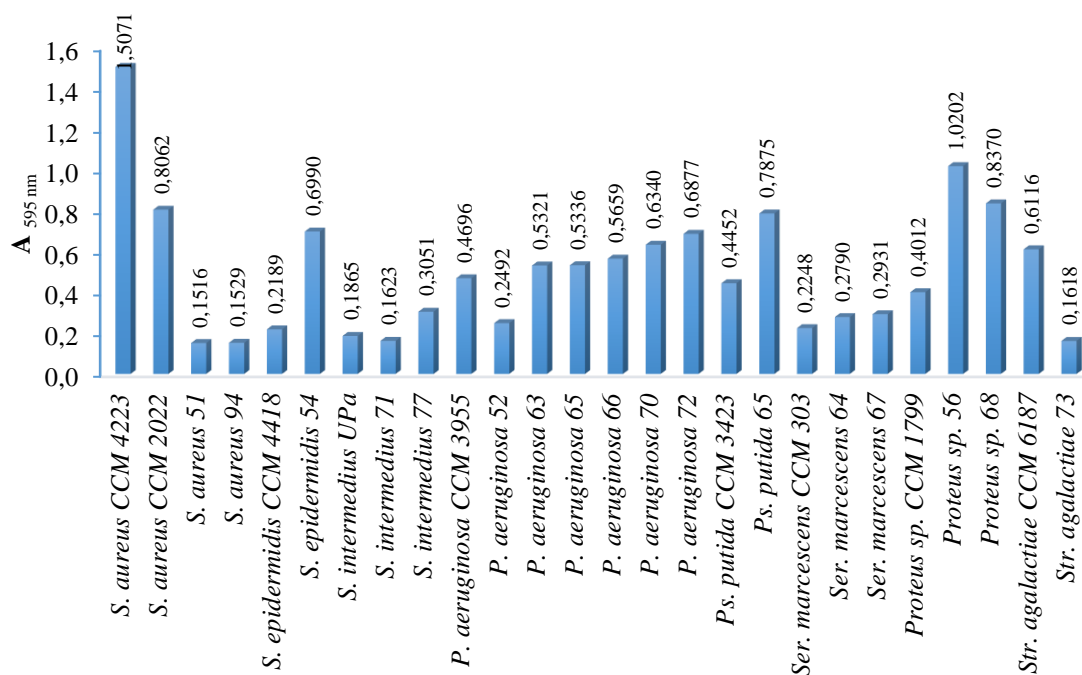
Příloha 2 - Porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií v BHI bujónu po 2 denní kultivaci při 37 °C



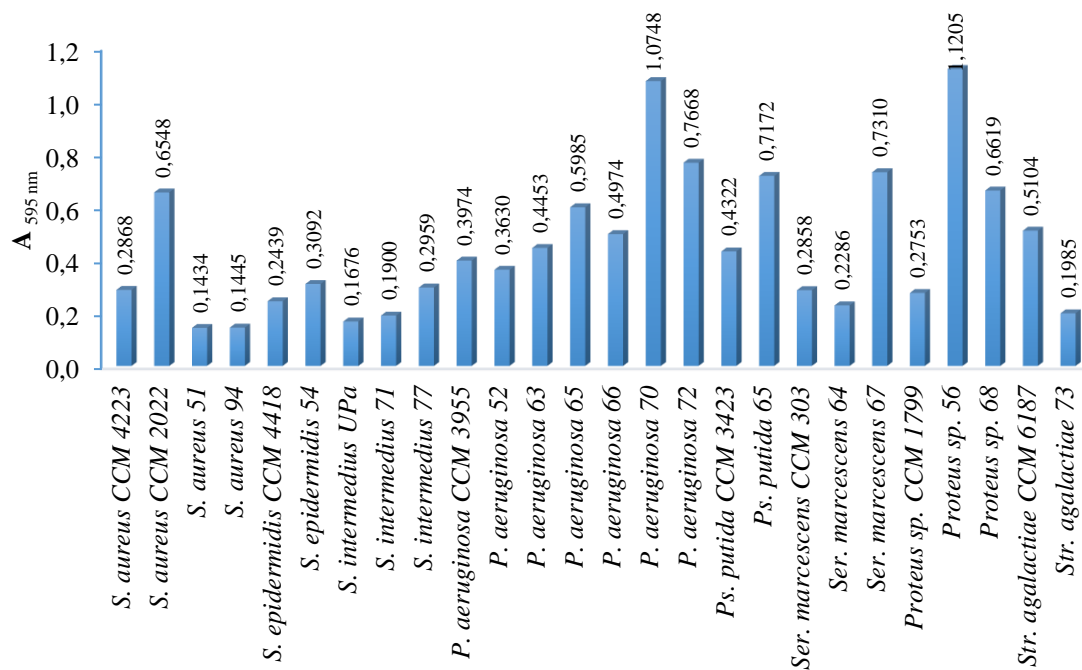
Příloha 3 - Porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy po 1 denní kultivaci při 37 °C



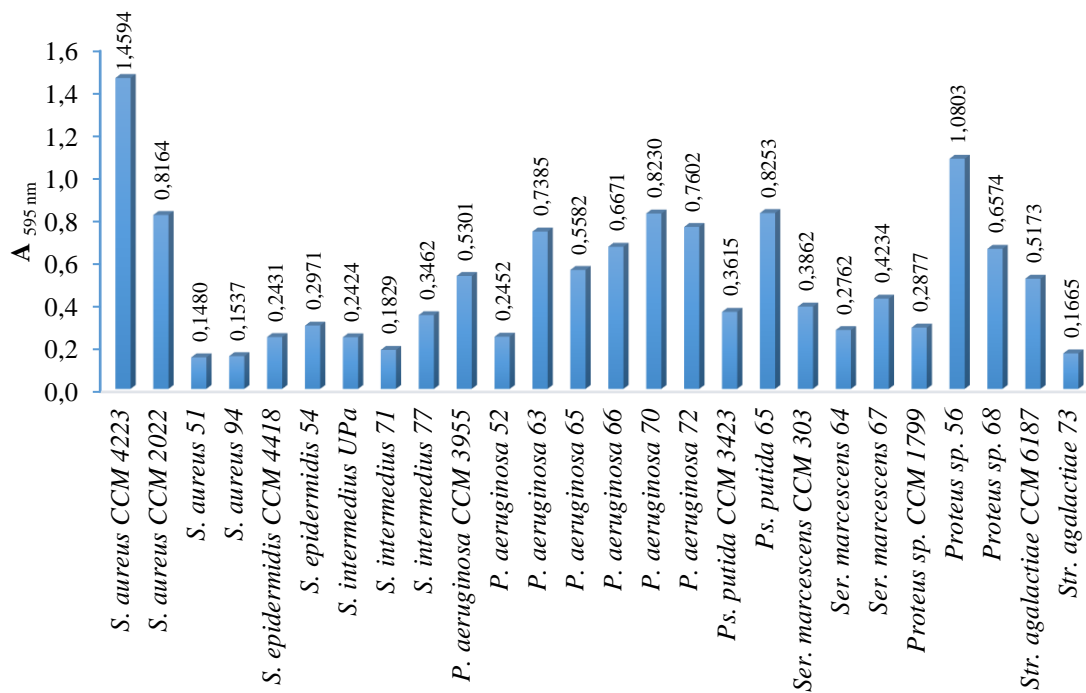
Příloha 4 - Porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií v BHI bujónu s 2 % glukózy a 2 % sacharózy po 2 denní kultivaci při 37 °C



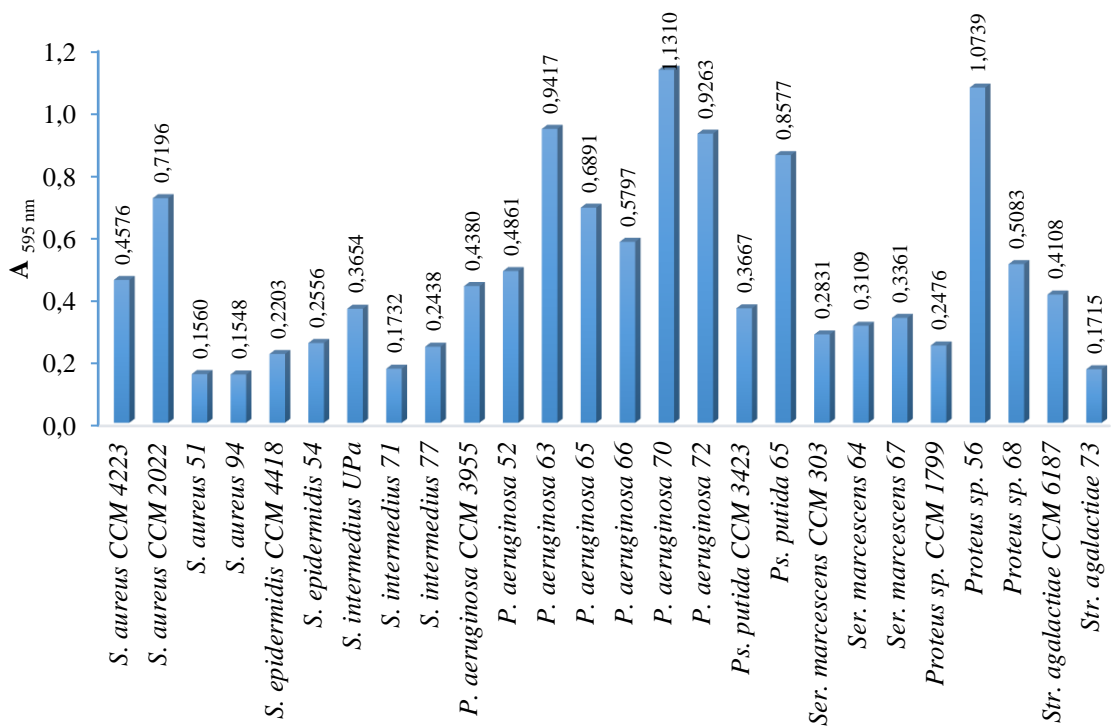
Příloha 5 - Porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií v TSB bujónu po 1 denní kultivaci při 37 °C



Příloha 6 - Porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií v TSB bujónu po 2 denní kultivaci při 37 °C



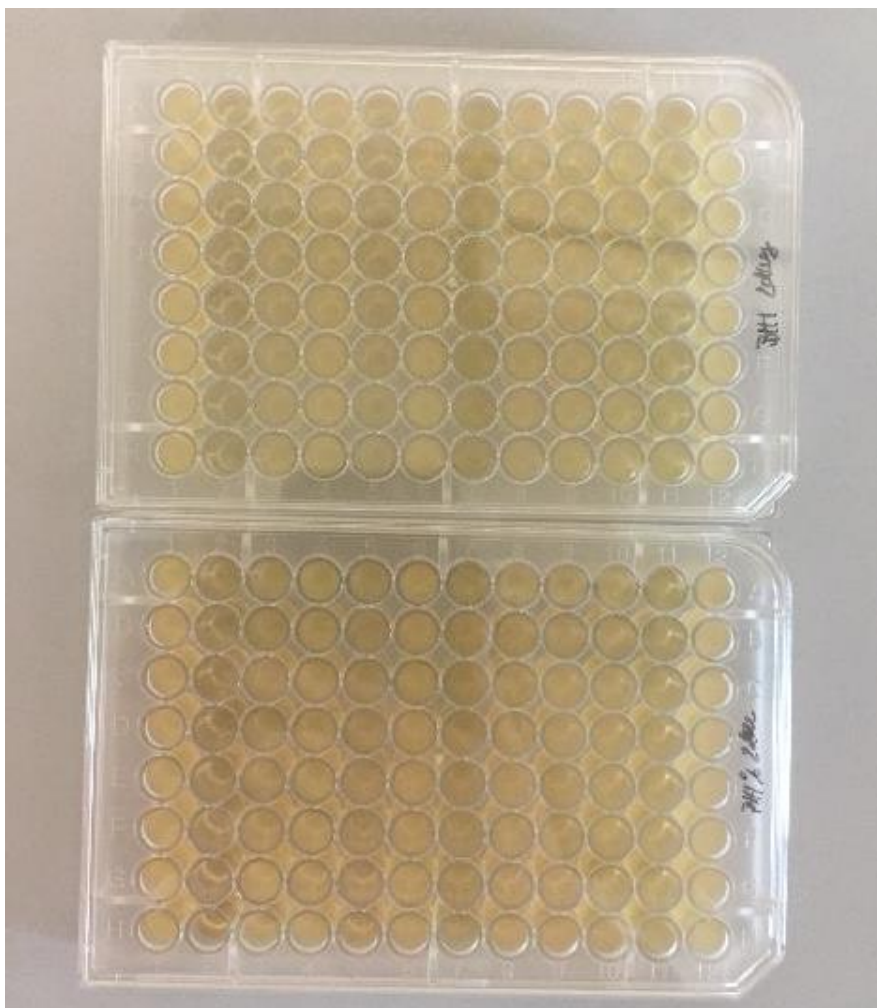
Příloha 7 - Porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií v TSB bujónu s 1 % glukózy po 1 denní kultivaci při 37 °C



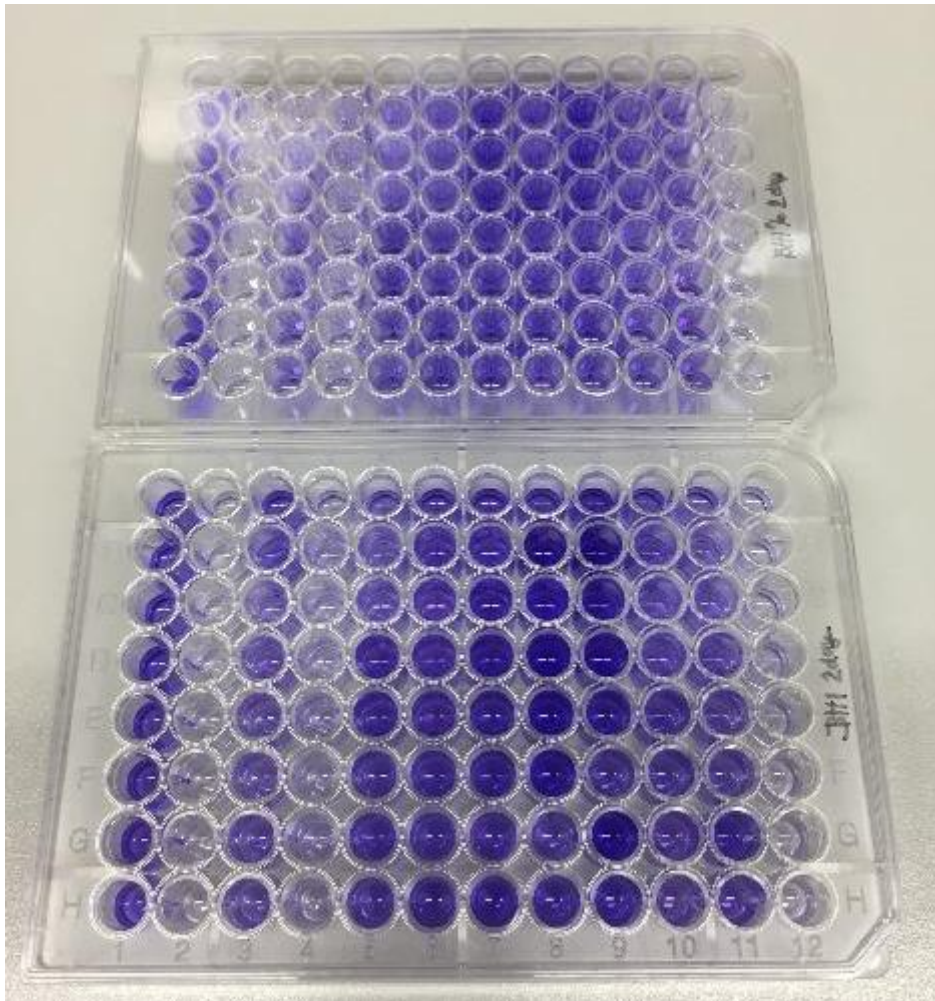
Příloha 8 - Porovnání tvorby biofilmu u všech testovaných bakterií v TSB bujónu s 1 % glukózy po 2 denní kultivaci při 37 °C



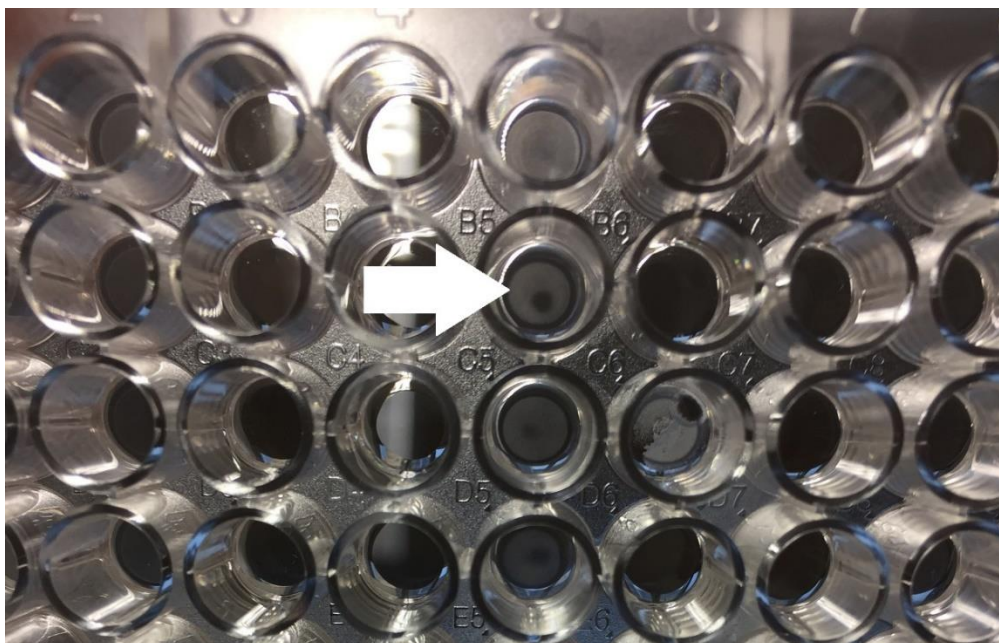
Příloha 9 - Polystyrenová mikrotitrační destička



Příloha 10 - Destičky s vybranými kmeny po 2 denní kultivaci v BHI bujónu (nahore) a v BHI bujónu s 2 % glukosy a 2% sacharózy (dole)



Příloha 11 - Destičky s obarveným biofilmem vybraných kmenů, které byly kultivovány 2 dny v BHI bujónu (dole) a v BHI bujónu s 2 % glukosy a 2 % sacharózy (nahore)



Příloha 12 - Biofilm na dně jamek, destička po promytí a vyschnutí