

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Planktonická a biofilmová forma patogenních
mikroorganismů – účinnost dezinfekčních látek**

Bc. Hana Straková

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Jan Marek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala doktoru Miroslavu Kovaříkovi, za pomoc se strukturou a formátem mé diplomové práce.

Velké poděkování patří panu doktoru Janu Markovi a Mgr. Michaelle Hympanové z Centra biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové za vstřícné přijetí a trpělivost při vysvětlování všech laboratorních postupů a pomoci se psáním práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 14.5.2021

Podpis studenta

1. OBSAH

2.	ABSTRAKT.....	6
3.	ABSTRACT.....	7
4.	ÚVOD.....	8
5.	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	9
6.	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
6.1	Kvarterní amoniové soli.....	10
6.1.1	Struktura.....	10
6.1.2	Mechanismus účinku.....	11
6.1.3	Použití v praxi.....	13
6.2	Bakteriální biofilmy.....	14
6.2.1	Struktura a vznik.....	14
6.2.2	Výskyt biofilmu.....	16
6.2.3	Biofilmová onemocnění.....	16
6.2.4	Metody testování biofilmu.....	17
7.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	22
7.1	VYBAVENÍ.....	22
7.1.1	Pomůcky.....	22
7.1.2	Chemikálie.....	23
7.1.3	Testované látky.....	23
7.1.4	Bakteriální kmeny.....	25
7.2	Metodika.....	25
7.2.1	Mikrodiluční bujonová metoda.....	25
7.2.2	Biofilmová metodika s využitím krystalové violeti.....	27
7.2.3	Biofilmová metoda s využitím TTC.....	27
7.2.4	Vyhodnocení biofilmové metodiky.....	28
8.	VÝSLEDKY.....	29
8.1	Stanovení antimikrobní aktivity pomocí mikrodiluční bujonové metody.....	29
8.2	Stanovení antibiofilmové aktivity pomocí krystalové violeti.....	36
8.3	Stanovení antibiofilmové aktivity pomocí TTC.....	36

9. DISKUSE	39
9.1 Závíslost účinku na struktuře	39
9.2 Závíslost účinku na lipofilitě.....	41
10. ZÁVĚR.....	43
11. POUŽITÉ ZKRATKY	44
12. SEZNAM TABULEK.....	46
13. SEZNAM OBRÁZKŮ	47
14. SEZNAM GRAFŮ	48
15. POUŽITÁ LETERATURA.....	49

2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Autor: Bc. Hana Straková

Školitel: PharmDr. Miroslav Kovařík, PhD.

Konzultant: PharmDr. Jan Marek, PhD.

Diplomová práce

Název: Planktonická a biofilmová forma patogenních mikroorganismů – účinnost dezinfekčních látek

Studijní obor: Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Úvod: Kvartérní amonné soli jsou široce používány v oblasti dezinfekce a antiseptiky. Mezi běžně používané látky na této bázi patří např.: Benzoxonium chlorid (Orofar), Didecyldimethylamonium chlorid (Sanytol), Karbethodecinium bromid (Septonex) a mnoho dalších látek.

Cíl práce: Cílem této diplomové práce bylo otestovat 10 látek typu kvartérních amoniových solí, rozdělených do dvou skupin pomocí mikrodiluční bujónové metody na vybraných bakteriálních kmenech a porovnat ji s používanými standardy. Dále bylo cílem porovnat schopnost vybraných látek inhibovat růst planktonní a biofilmové formy kmene *Staphylococcus aureus*.

Metody: Mikrodiluční bujónovou metodou byla měřena antimikrobní aktivita 10 nových látek rozdělených do dvou skupin dle struktury na osmi bakteriálních kmenech: *Staphylococcus aureus*, methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, Vankomycin-rezistentní *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* Extended spectrum β -lactamases (ESBL) pozitivní a multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*. Dále byla hodnocena účinnost vůči bakteriálnímu biofilmu za pomoci dvou metod – stanovení za pomoci krystalové violeti a trifenyl tetrazolium-chloridu.

Výsledky: Grampozitivní kmeny byly vůči testovaným látkám obecně citlivější než gramnegativní. Při celkovém hodnocení žádná z látek nepřekročila účinnost standardních látek. Při porovnání u jednotlivých kmenů byly některé testované látky i lepší oproti standardům. Při stanovení minimální biofilm inhibující koncentrace, dokázaly testované látky potlačit růst biofilmu.

Závěr: Byla potvrzena účinnost nově syntetizovaných látek, zejména na grampozitivní bakterie a schopnost inhibovat růst biofilmu.

Klíčová slova: Biofilm, kvartérní amoniové soli, testování antimikrobní účinnosti, mikrodiluční bujónová metoda, minimální inhibiční koncentrace, minimální baktericidní koncentrace, minimální biofilm inhibující koncentrace

3. ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Biological and Medical Sciences

Author: Bc. Hana Straková

Supervisor: PharmDr. Miroslav Kovařík, PhD.

Consultant: PharmDr. Jan Marek, PhD.

Title: Planktonic and biofilm form of pathogenic microorganisms - effectiveness of disinfectants

Diploma thesis

Study program: Bioanalytical laboratory diagnostics in healthcare

Introduction: Quaternary ammonium salts are widely used in the field of disinfection and antiseptics. Commonly used compounds on this basis include, for example: Benzoxonium chloride (Orofar), Didecyldimethylammonium chloride (Sanytol), Carbetopendecinium bromide (Septonex) and many other substances.

Objectives: The aim of this diploma thesis was to test 10 substances of the quaternary ammonium salt type, divided into two groups using the microdilution broth method on selected bacterial strains and compare it with the standards used in practice. Furthermore, the selected compounds were evaluated for the ability to inhibit the growth of planktonic and biofilm form of the *Staphylococcus aureus* strain.

Methods: The antimicrobial activity of 10 novel compounds divided into two groups according to the structure on eight bacterial strains was measured by the microdilution broth method: *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, Vancomycin-resistant *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* Extended spectrum β -lactamases (ESBL) positive and multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Furthermore, the efficacy against bacterial biofilm was evaluated using crystal violet and triphenyl tetrazolium chloride.

Results: Gram-positive strains were generally more sensitive to evaluated compounds than gram-negative ones. In the overall evaluation, none of the substances exceeded the efficacy of the standard substances. When compared for individual strains, some tested substances were even better than the standards. By determining the minimum biofilm inhibitory concentration, the test substances were able to suppress biofilm growth.

Conclusion: The efficacy of newly synthesized compounds, especially on gram-positive bacteria, was observed. Furthermore, the comparison to inhibit the growth of planktonic and biofilm form of the *Staphylococcus aureus* strain were established.

Key words: Biofilm, quaternary ammonium salts, antimicrobial efficacy testing, microdilution broth method, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration, minimum biofilm inhibitory concentration

4. ÚVOD

Bakteriální, biofilmová onemocnění a biofilm obecně tvoří obrovské riziko, zejména v nemocničních zařízeních. To je důvod, proč jsou vyvíjeny a testovány nové antimikrobní látky a také metody pro testování jejich citlivosti na nozokomiální mikroorganismy. V této práci jsou hodnoceny látky na bázi kvarterních amoniových solí, ty jsou často využívány na poli dezinfekce a antiseptiky. Častým používáním stejných dezinfekčních látek dochází ke vzniku bakteriální rezistence a šíření takto vzniklých odolných kmenů. Obecné rozšiřování portfolia dezinfekčních látek tak vede k výraznějšímu omezení vzniku rezistencí a nahrazování často zastaralých látek s negativními vlastnostmi na živé i neživé povrchy.

5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo otestovat 10 látek typu kvartérních amoniových solí, rozdělených do dvou skupin pomocí mikrodiluční bujonové metody na vybraných bakteriálních kmenech a porovnat ji s používanými standardy. Dále bylo cílem porovnat schopnost inhibovat růst planktonní a biofilmové formy kmene *Staphylococcus aureus* u vybraných látek.

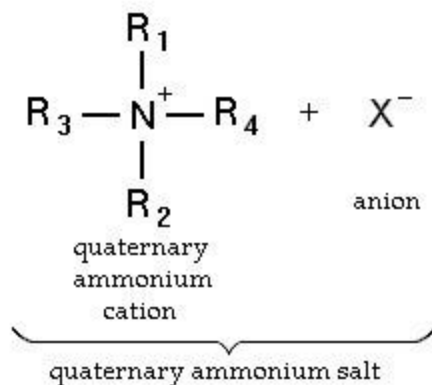
6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 *Kvarterní amoniové soli*

Kvarterní amoniové soli (QAS) jsou skupina látek s velkým polem působnosti, od farmacie po průmysl [1]. Patří do rodiny kationtových povrchově nabitých aktivních látek. Jejich struktura, především kladný náboj a délka alkylového řetězce, hraje významnou roli v účinnosti na mikroorganismy. Je tak jedním z důležitých faktorů pro inhibici růstu bakterií (grampozitivních a gramnegativních) dále pak plísní, kvasinek a obalených virů. Tyto membránově aktivní látky interagující s cytoplazmatickou membránou bakterií a lipidy obalených virů, kde způsobují poškození ochranných bariér mikroorganismů [1, 2, 3].

6.1.1 Struktura

Jedná se o iontové sloučeniny typu solí, složené ze dvou základních částí, které tak propůjčují molekule její povrchově aktivní vlastnosti. Její hydrofilní část tvoří kvarterní dusíkatá část se schopností interakce s polárním prostředím. Hydrofobní složku tvoří alkylový řetězec R , který má schopnost proniknout do nepolárních molekulárních aglomerátů. Kvarterní dusíkatá část je složená z pozitivně nabitého dusíku, který je začleněn buď do aromatického kruhu, např. v QAS odvozených od pyridinu, imidazolu, chinolinu a isochinolinu. Častěji se vyskytuje jako acyklická struktura se čtyřmi substituenty na atomu dusíku, z nichž minimálně jeden je dlouhý alkylový řetězec. Protiiontem je nejčastěji Br^- nebo Cl^- . To je například v benzalkonium chloridu nebo centrimonium bromidu. Názorně je struktura základní kvarterní amoniové soli uvedena v obrázku 1. V praxi jsou nejčastěji využívány deriváty pyridinia, cetrionia, benzalkonia a benzoxonia pro jejich silné antimikrobiální vlastnosti. Výjimečnou schopností kvarterních kationtů, oproti primárním, sekundárním a terciálním je, že zůstávají trvale nabitě, nezávisle na pH roztoku [3-5].



Obrázek 1 – Struktura kvarterních amoniových solí [6]

Vysvětlivky: N^+ značí kladně nabitý dusík se čtyřmi kovalentně vázanými substituenty R_{1-4} ;
 X^- značí aniont (nejčastěji Cl^- nebo Br^-)

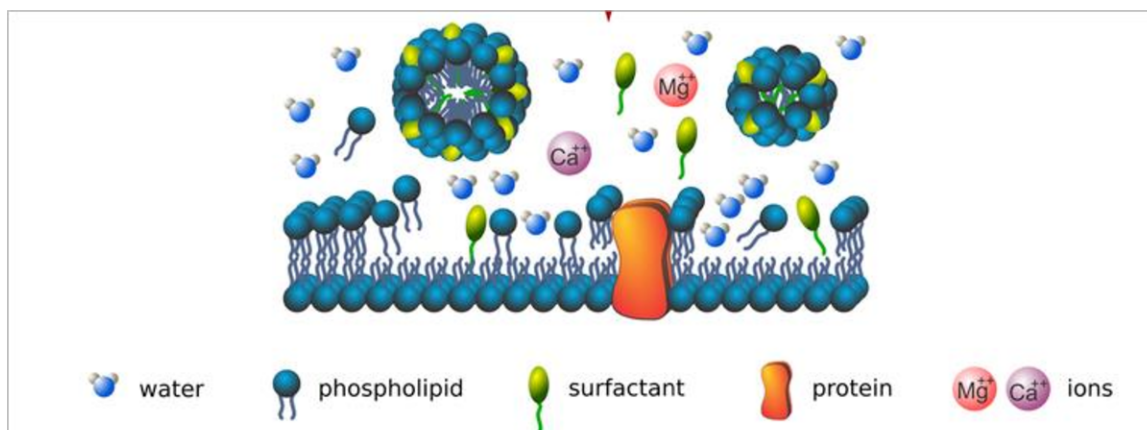
Další důležitou vlastností těchto sloučenin, je jejich schopnost tvořit termodynamicky stabilní micely. Takovéto útvary se vytváří především ve vodném prostředí, při překročení kritické micelární koncentrace. Některé micelární povrchově aktivní látky jsou využívány jako katalyzátory urychlující chemický rozklad. Takovéto látky se následně využívají jako dekontaminanty [8].

6.1.2 Mechanismus účinku

QAS patří do rodiny biocidních látek, které negativně zasahují do chodu buňky a následně způsobují buněčnou smrt. Základním principem je účinek na cytoplazmatickou membránu, který vede k narušení fosfolipidové dvojvrstvy, což může dále ovlivnit funkci jaderné kyseliny, enzymů nebo receptorů. Následně dochází k úniku organel z buňky a řízené buněčné smrti lytickými enzymy [4, 5].

Existuje mnoho hypotéz o mechanismu účinku QAS, avšak není stále zcela objasněn. Jedním z prvních popisovaných mechanismů je, že všechny kladně nabitě povrchově aktivní látky silně interagují se zápornými náboji, které se nacházejí na buněčných stěnách a membránách, čímž dochází ke shlukování, praskání a netěsnosti těchto částí. Záporně nabitá většina povrchu bakteriální membrány je stabilizována

dvojmocnými kationty jako jsou Mg^{2+} a Ca^{2+} . Proto má kladný náboj kationtového surfaktantu možnost se přichytit na polární povrch, výměnou za Mg^{2+} nebo Ca^{2+} a vložit hydrofobní alkylový řetězec do fosfolipidové dvojvrstvy. Tímto porušením dojde ke ztrátě tekutosti membrány a úniku K^+ a dalších segmentů cytoplazmatického prostředí. Ty poté unikají do vnějšího prostředí a následuje apoptóza. Takovýmto způsobem dojde k rozpadu membrány a porušení struktury vytvořením kulovitých struktur, viz obrázek 2 [3, 5, 9].



Obrázek 2 – Mechanismus účinku QAS [3]

V mnoha publikacích je prezentováno, že gramnegativní bakterie jsou na QAS méně citlivé než grampozitivní. Rozdíl mezi gramnegativními a grampozitivními bakteriemi je ve složení buněčné stěny. Buněčná stěna grampozitivních bakterií obsahuje silnou vrstvu peptidoglykanů, kyselinu teichoovou a menší množství lipidů. Zato buněčná stěna gramnegativních bakterií je tenčí, s malým množstvím peptidoglykanů, neobsahují kyselinu teichoovou a na povrchu je kryta vrstvou, zvanou vnější, s obsahem antigenů. Zvýšená odolnost gramnegativních bakterií je pravděpodobně způsobena přítomností právě vnější vrstvy membrány, která poskytuje buňkám silnější fyzikálně-chemickou ochranu. Dochází k selhání sloučeniny proniknout skrze tuto vnější vrstvu a dostat se k cytoplazmatické membráně. Grampozitivní bakterie nesou záporný náboj, čímž snadno reagují s kationty v QAS a podobně působí i na mikroskopické houby [2, 9].

Kladný náboj je zde považován za důležitý faktor v baktericidní aktivitě QAS. Předpokládá se, že v souvislosti se strukturální variabilitou vede ke snížení elektronové

hustoty na kationtu a vyvolá silnější interakci na polarizovaných částech, především na fosfolipdové membráně. Tento předpoklad vede k silnějšímu baktericidnímu účinku [2].

6.1.3 Použití v praxi

Rodina QAS poskytuje své vlastní antimikrobiální spektrum. Bakteriostatické, tuberkulostatické, sporistatické a algistatické, i u nižších koncentrací. Daleko větší důraz je kladen na baktericidní, fungicidní a algicidní účinek, který látky z této rodiny vykazují. Díky těmto vlastnostem jsou základem pro chemické dezinfekce a antiseptika. S ohledem na sporicidní účinek nejsou QAS obecně považovány za sporicidní s tím, že některé tuto účinnost vykazují při vyšších koncentracích a teplotách. QAS dále prokázaly významnou kapacitu i proti virům, zejména obaleným. V literatuře lze ale dohledat i některé látky typu QAS účinné rovněž na neobalené viry [1, 3, 5].

Nejpoužívanější složkou dezinfekčních prostředků jsou N-alkylpyridiniové a benzalkoniové soli s různými délkami alkylových řetězců, vykazující silný účinek na široké spektrum mikroorganismů. Proto se QAS často využívají k prevenci nozokomiálních infekcí [8, 10].

Benzalkonium chlorid je složkou očních kapek, zvlhčovačů, nebo čistících prostředků na obličej. Dále je obsažen v různých krémech proti slunci a pleťových vodách. QAS jsou velice často používány pro čištění vody a při zpracování potravin, a to především kvůli jejich nízké toxicitě a vyšší antimikrobiální účinnosti [10].

Některé pyridiniové soli se v mnoha případech používají jako dezinfekční látky, které jsou složkou očních kapek a dezinfekčních pěn, dále jako germicidy, změkčovadla nebo biologické iontové kapaliny. Díky jejich toxickému účinku vůči řasám, se využívají na čištění povrchů bazénů, fontán či člunů [9].

Využití našly QAS i v organické a analytické chemii jako katalyzátory. Byly experimentálně použity jako kompetitivní inhibitory acetylcholinesterázy a antagonisté nikotinových receptorů [9].

Micely bývají využívány především pro vojenské účely jako dekontaminanty na bojové biologické nebo chemické látky (např. Tabun, Sarin) [8].

6.2 Bakteriální biofilmy

Bakteriální biofilm na sebe přitáhl pozornost už v 70. letech minulého století. J.W. Costerton napsal na toto téma vědeckou práci, kde popsal schopnosti bakterií přichytit se na pevný povrch a vytvořit povlak. Díky tomu, že takovou studii publikoval jako první, vysloužil si označení otec biofilmu. Costertonova teorie byla nezávisle potvrzena na konci téhož roku panem R. J. Gibbonssem, který zkoumal uskupení na zubní sklovině [11-14].

Biofilm nemá doposud jednotnou definici. Ve své podstatě se jedná o společenství většího počtu mikrobiálních buněk, přichycených k pevnému podkladu nebo k sobě navzájem. Tyto mikroorganismy jsou obaleny polymerní extracelulární maticí (EPS), kterou samy produkují. Extracelulární matrice tvoří kluzký a slizký povrch a chrání bakterie před vnějšími vlivy. Uvnitř společenstva dochází mezi jednotlivými mikroorganismy k vzájemné interakci mezi buňkami, a přitom se mění ty vlastnosti, kterými disponuje o samotě žijící buňka [12].

6.2.1 Struktura a vznik

Studie prokázaly, že biofilm není jen slizká vrstva, ale jedná se o strukturovaný a koordinovaný systém s velkou mírou organizace [11].

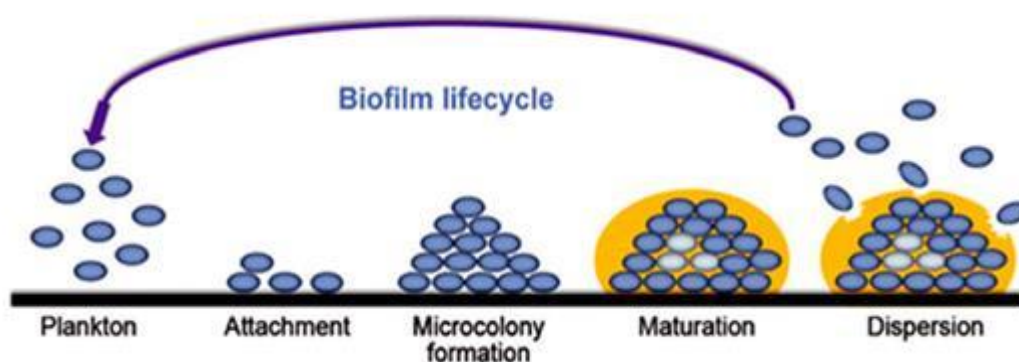
Dříve byly biofilmy brány jen jako amorfnní agregace mikroorganismů. Tento názor byl podpořen nálezy v biofilmech z různých prostředí, kde byla nalezena podobná struktura. Další podobnost byla nalezena v genetice (př. buněčná signalizace), morfologii a struktuře. Dnes už je známo, že biofilmy jsou mnohem organizovanější, díky nálezu nanodráťů a voštin. Struktura biofilmů je heterogenní v prostoru a čase. Takováto společenství se mohou vyskytovat jako více nebo méně splývajících agregátů. Jednovrstevné nebo trojrozměrné struktury jsou propleteny vodními kanálky. Ty umožňují transport živin, kyslíku a odpadních látek po celém společenství buněk. Tyto kanálky mají tendenci fungovat jako filtry, které ve své struktuře zachytávají různé částice. Dostupnost živin a diverzita bakteriálních kmenů jsou rozhodující činitelé pro konečnou tloušťku biofilmu [13, 15].

Tvorba biofilmu je pro mikroby velmi účinným prostředkem k ukotvení v příznivém prostředí, naopak od živých volných buněk. Volně plovoucí planktonická

buňka, bakterie, kvasinka, plíseň, se přichytí na pevný povrch za pomoci adhezínů. Po přilnutí začnou buňky tvořit velké množství lepivého polysacharidu [15-16].

EPS představují většinu celkového organického zastoupení v biofilmu. Liší se u jednotlivých kmenů či druhů mikroorganismů v chemických a fyzikálních vlastnostech. Nejpočetnější složkou EPS jsou neutrální nebo polyanionické polysacharidy, které mají vlastnost shromažďovat dvojmocné ionty např. vápník, hořčík. Zásadou toho dochází k propojení polymerních vláken a zvýšení vazebné schopnosti biofilmu. Další složkou jsou proteiny a enzymy. Nacházejí se zde převážně strukturální proteiny. Enzymy, které jsou v EPS přítomny, mají ve většině případů funkci degradace biopolymerů, ve vodě rozpustných (polysacharidy, nukleové kyseliny) tak i nerozpustných (celulosa, lipidy) a dalších organických sloučenin. Dále se enzymy podílejí na ochraně biofilmu před nepříznivými vlivy [15, 17].

Takto vytvořená matrice drží buňky pohromadě a funguje jako voštinové lešení, kde se mohou dále množit, a vytvářet mikrokolonie. Jakmile kolonie dosáhne určité velikosti, dochází k maturaci biofilmu, vzápětí přijde impulz a dojde k disperzi. Uvolněné buňky přecházejí do planktonického stavu, odplouvají a následně kolonizují nový povrch, znázorněno na obrázku 3. Schopnost tvořit biofilm souvisí s mutacemi, buď získání nového genového materiálu, nebo regulací exprese toho stávajícího [15].



Obrázek 3 – Životní cyklus biofilmu [18]

Současným tématem u biofilmu se stala extracelulární DNA (eDNA). Funkce a původ této DNA v obalových vrstvách není dodnes úplně vysvětlena. Předpokládá se, že

může jít o přenašeče elektronů, pomocnou strukturu pro pohyb po biofilmu, komunikační prostředek, nebo zvýšení strukturální integrity [12, 15].

6.2.2 Výskyt biofilmu

Ve volné přírodě je život v biofilmu velice výhodný. Vytvořené společenství poskytuje lepší podmínky pro lehčí průběh života [12].

Biofilmy mohou mít pozitivní i negativní účinek. V přírodě má biofilm kladný vliv na růst rostlin, například proteobakterie *Azospirillum brasilense*, vytváří na kořenech obilovin biofilm, a tím podporuje jejich růst. Dalším pozitivním vlivem je schopnost bioremediace, hlavně rostlinných olejů, tuků a dalších látek, které tvoří kontaminanty odpadních vod. Některé mikroorganismy tvořící biofilm, mohou kumulovat radionuklidy a těžké kovy [12, 15].

Nežádoucích vlivů je poněkud více. Biofilmy mohou vznikat v potravinářském průmyslu, kde je spousta živin a vlhko, což činí pro bakterie příznivé prostředí. Příkladem jsou provozy na zpracování masa, mléka nebo piva. Mezi nejčastěji kontaminující mikroorganismy patří rod *Salmonella* nebo *Listeria monocytogenes* [15].

V medicíně má biofilm i pozitivní stránku, a to kolonizaci gastrointestinálního traktu, zde mikroby vytvářejí přirozený biofilm chránící sliznici před infekčními patogeny. Ovšem převažují negativní vlivy, které mají pro patogenezi některých infekčních nemocí obrovský význam. Biofilmy infekčních patogenů se usazují na tkáních nebo sliznici. Dalším místem typickým pro tvorbu biofilmu jsou cizí tělesa, jako jsou cévky a katetry, zavedené do tělních dutin či tkání. Pokud není biofilm na cizích tělesech řádně ošetřen, může pronikat do okolních tkání. Například u močových katetrů se následně biofilm usazuje ve spodní části močové trubice [15].

6.2.3 Biofilmová onemocnění

Infekce související s biofilmem jsou těžko odstranitelné a předmětem zájmu mnoha výzkumů. Mezi nejčastější infekce spojované s tímto společenstvím jsou: chronické plicní infekce, především u pacientů s cystickou fibrózou, chronické záněty středního ucha, endokarditida, infekce různých implantátů a obtížně hojící se rány [14-16].

První pozorovaný a nejdéle známý biofilm v lidském těle je zubní plak. Sliznice mohou kolonizovat patogenní i nepatogenní mikroorganismy. V ústí dutině jsou takovato

onemocnění častá. Při zánětech dásní jako je například periodontitida, která vzniká v tzv. kapsách pod dásní, kam úplně neproniká kyslík. V kapse se nahromadí bakteriální biofilm a k zánětu se přidávají hnisavé a odumřelé buňky. K původcům zánětu ozubice patří *Porphyromonas gingivalis* a *Fusobacterium nucleatum*. Dalším častým biofilmovým onemocněním jsou kožní infekce. Ve špatně vyživované kůži se biofilmu velmi daří, zejména na popálených plochách nebo bércových vředech [15].

Zánět středního ucha (otitis media) je onemocnění s velice častým výskytem u dětí. Existuje jak akutní, tak chronická forma. Chronická forma je spjata s výskytem velmi viskózní tekutiny v ohnisku infekce, která brání prostupu antibiotik. Nejčastějším původcem tohoto zánětu je *Streptococcus pneumoniae*, který vytváří kolonii biofilmu [15].

Bakterie tvořící biofilm mají tendenci osidlovat pomůcky zavedené do tělních dutin a tkání. Jako jsou katetry, dýchací trubice, nitroděložní tělíška či kontaktní čočky. Pokud nejsou dostatečně ošetřované, biofilm se rozšíří do okolních tkání a orgánů. Nejčastěji infikované jsou centrální žilní katetry, které slouží k podávání léčiv, živin a tekutin. Další jsou močové katetry, ve kterých se rychle usazují bakterie z dolních močových cest. Vážný problém mohou způsobit biofilmy bakterií a kvasinek na nekontrolovaném nitroděložním tělísku, kde způsobují záněty pánve až sepse [14-15].

Nejčastěji je biofilm tvořen na místech, kde je cizí těleso zcela odděleno od zevního okolí například kovové kloubní náhrady. Vznikají působením širokého spektra mikroorganismů ve stejný čas. Kolonizace těchto cizích těles je spojena se sekundárními infekcemi okolních tkání, což velmi komplikuje léčbu. Implantáty jsou nejčastěji osidlovány stafylokoky, *Escherichia coli*, pseudomonádami, kvasinkami rodu *Candida*, streptokoky a některými gram negativními bakteriemi [15-16].

6.2.4 Metody testování biofilmu

Existuje řada způsobů, jak lze pozorovat a stanovit přítomnost a aktivitu biofilmu. Mezi dva hlavní způsoby pozorování biofilmu řadíme přímé a nepřímé pozorování.

Mezi přímé patří sledování světelným mikroskopem. Tato metoda je nejjednodušší, nejlevnější a nejrychlejší metodou kvantitativního pozorování stavby pozorovaných povrchů mikroorganismů. Tímto způsobem lze semikvantitativně odhadnout množství

mikrobů na sledovaném povrchu. Světelná mikroskopie umožňuje pozorování morfologie jak přisedlé biofilmové formy, tak planktonické formy mikroorganismů [17].

Transmisní elektronový mikroskop (TEM) je metoda pro pozorování buněčné struktury a snímkování buněk. Mezi pozorované struktury patří proteiny nebo nukleové kyseliny. Části buněčné struktury jsou zobrazovány pomocí elektronového záření ve svazku urychlených elektronů ve vakuu. Ve vakuu jsou emitovány elektrony žhavenou wolframovou katodou. Elektrony jsou urychleny v elektrickém poli mezi katodou a anodou a upřeny kondenzovanou čočkou na preparát. Průchodem elektronů dochází k dějům pro tvorbu obrazu v TEM. Dále se zde nachází objektiv, který vytváří zvětšený obraz preparátu. Další zvětšení je docíleno v projekтиву. Po dopadu na fluorescenční stínítko je finální obraz transformován do obrazu viditelným okem. Obraz je zachycován fotografiemi [17].

Kvůli nedostatečné stabilizaci polysacharidů se provádí fixace konvenčními prostředky, například aldehydy či paraformaldehydy. Obsah vody v biofilmu se eliminuje postupnou dehydratací alkoholem. Po infiltraci pryskyřice do vzorku, je vzorek vložen do želatinové tobolky, po čemž následuje polymerace. Z tobolky jsou připraveny tenké řezy, které jsou následně potřísněny uranyl-acetátem nebo citrátem olovnatým.

Podobnou metodou je skenovací elektronový mikroskop (SEM). Princip metody je stejný jako u TEM, i co se týče přípravy vzorků. Výjimku tvoří chemikálie. Zde je používáno např. zlato, není zde zalití do pryskyřic, řezy nejsou barveny citrátem olovnatým a uranyl-acetátem. Metoda dehydratace a postfixace zůstává stejná jako u TEM. Po dehydrataci je vzorek potažen zlatem. Po přípravě vzorku je pozorován v SEM [17].

Další možností pozorování biofilmu je fluorescenční značení. Jednou z metod je konfokální laserová skenovací mikroskopie (CLSM). Strukturu a fyziologii biofilmů lze prověřit právě touto metodou. Pro pozorování musí být biofilm fluorescenční, kvůli fluorescenčním molekulám jako je zelený fluorescenční protein (GFP). To je protein exprimovaný mikroorganismy v biofilmu. Gen je označen genovou kazetou kódující GFP. Nebo jsou využívány barvicí složky heterogenní hmoty biofilmu, které jsou značeny fluorescenčními barvivy. Některé fluorofory jsou soustředěny na eDNA. Takto je vizualizován obsah eDNA v matrici biofilmu. Skenování probíhá hlubokým pronikáním excitované energie, která je dodávána laserem. 3D digitální obraz je vytvořen díky fluorescenci biomolekul (vnitřní fluorofory, jako GFP nebo chlorofyl; molekuly

označené exogenními sondami, jako jsou fluorescenčně značené protilátky detekované fotonásobičem) [17].

Další metoda využívající fluorescenci je fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Specifické mikroorganismy, které jsou přítomny v biofilmu, mohou být detekovány FISH. Při této metodě jsou navrženy sondy DNA pro hybridizaci 16S rRNA mikroorganismu, které interagují s fluorescenčním barvivem nebo s rhodaminem. Touto metodou je možné určovat rychlost růstu organismů přítomných v biofilmu [17, 19].

Mezi nepřímé metody pozorování patří metoda konžského červeného agar (CRA), trubicová metoda a testy na mikrotitrační destičce. První metodou je metoda CRA. Je to kvalitativní metoda pro detekci biofilmu. U této metody je pozorována změna zabarvení kolonií naočkovaných na CRA mediu. Toto médium vzniká smícháním 0,8 g Kongo červeně a 36 g sacharózy na 37 g/l agaru Brain Heart Infusion (BHI). Po inkubační době, což je 24 hodin při 37 °C, byla pozorována morfologie kolonií. Černá barva kolonie se suchou konzistencí značí produkci biofilmu. Kdežto růžové kolonie naopak [17, 20].

Další kvalitativní metodou stanovení biofilmu, je Trubicová metoda (TM). Izolované mikroorganismy byly naočkovány do polystyrenové zkumavky s obsahem tryptofan – sójového bujónu (TSB) a inkubovaly se po 24 hodin při 37 °C. Přisednuté izoláty, které tvořily biofilm na stěnách zkumavky se po hodině obarvily safraninem. Zkumavka je dvakrát propláchnuta fosfátovým pufrem, aby se odplavily planktonové buňky. Po vysušení na vzduchu byl biofilm na stěnách viditelně ohraničen [17, 20].

Nejčastěji využívaná kvantitativní metoda je detekce produkce biofilmu testem na mikrotitrační destičce Bakteriální suspenze je připravena v Mueller-Hinton bujónu (MHB) a doplněna o 1 % glukózy. Připravená suspenze o zákalu 0,5 McFarland odpovídá koncentraci $1 \cdot 10^8$ cfu/ml, (Colony Forming Units), tedy počet kolonií vztažený na mililitr vzorku. Bakteriální suspenze je tak 20x naředěna, aby dosáhla $5 \cdot 10^6$ cfu/ml. Následně je suspenze naočkována do 96 jamkové destičky s plochým dnem. Destičky jsou inkubovány 24 hodin při 37 °C. Izoláty přisedlé na stěnách jamek mikrotitrační destičky jsou obarveny safraninem, který se nechává působit 15 minut potom, co se byly planktonické buňky odstraněny promytím fosfátovým pufrem. Jamky jsou následně vysušeny. Před obarvením je nutné je zafixovat. To je provedeno methanolem. Poté jsou jamky obarveny safraninem a opět 2x promyty fosfátovým pufrem. Po druhém vysušení jsou destičky resolubilizovány ethanolem či ledovou kyselinou octovou. Následuje spektrofotometrické měření [17, 21-24].

Kromě přítomnosti biofilmu jsou měřeny antimikrobiální účinné látky mířené proti němu. Většina těchto metod je prováděna pomocí mikrotitračních destiček. Těmito metodami jsou testovány látky, které potlačují tvorbu biofilmu a látky pro eliminaci biofilmu (eradikující účinek) [22, 25-27].

Při detekci účinnosti látek proti tvorbě biofilmu se provádí příprava suspenze stejně, jak je uvedeno výše. Do každé jamky je dáno činidlo a do něj je přidáváno 10 – 20 μ l bakteriální suspenze. Destička je následně inkubována 24 hodin při 37 °C. Po uplynutí inkubace je destička spektrofotometricky změřena [21, 25-27].

Posledními dvěma níže zmíněnými metodami jsou principy použití barvení jednotlivých buněk zastoupených v biofilmu. Jednou z nich je test krystalovou violetí (CV test). Jedná se o metodu využívající barvení krystalovou violetí. Krystalová violet patří do rodiny trifenylmethanových barviv, které se váží na buněčné složky bakterií iontovými interakcemi. Bylo prokázáno, že se váže na DNA, proteiny a podle všeho i biofilmové polysacharidy. Když se krystalová violet opláchne vodou, narostlý biofilm, na který se violet navázala se projeví jako prstenec kolem vnitřku jamky [17, 28-29].

Pro fixaci biofilmu byl přidán 99% methanol, pak byly odstraněny supernatanty a destičky byly vysušeny na vzduchu. Po vysušení bylo do každé jamky přidáno určité množství roztoku krystalové violeti. Přebytek violeti byl odstraněn promytím destičky. Následně byla violet uvolněna 33% kyselinou octovou. Nakonec byla změřena absorbance [28].

Podobnou metodou je test XTT, neboli tetrazoliová sůl. Tetrazoliové soli jsou dlouhodobě používané indikátory intenzity buněčné respirace. Při jejich redukcí vzniká barevná sloučenina formazan, jejíž množství je možné stanovit spektrofotometricky. Nejstarší a nejjednodušší používanou látkou je tetrazolium chlorid (TTC). Použití této látky má dvě nevýhody. Především použití TTC není dostatečně citlivé a z této sloučeniny vznikající formazan není rozpustný ve vodě. Je tedy nutné následně rozpuštění například v ethanolu. Z tohoto důvodu bývá pro účely testování volena novější látka (např. XTT), jejíž stanovení je citlivější a zároveň je po redukcí na formazan ve vodě rozpustná [21, 30].

Roztok této soli byl přidán do všech jamek k bakteriální suspenzi a živnému médiu. Destičky byly inkubovány za tmy 5 hodin při 37 °C. Po inkubaci byly dvě sousední jamky smíchány a přeneseny do zkumavek eppendorf, které byly následně centrifugovány. Část supernatantu byla přenesena do nové destičky, které byla změřena

absorbance. Na základě absorbance lze pak určit enzymatickou aktivitu buněk na základě rozkladu příslušného barviva [21].

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální části byla stanovena antimikrobní účinnost nově syntetizovaných látek typu kvarterních amoniových solí. Pro porovnání byla zároveň stanovena i antimikrobní účinnost zástupců kvarterních amoniových solí běžně užívaných v praxi.

V první části byly stanoveny bakteriostatické a baktericidní koncentrace testovaných látek pomocí mikrodiluční bujonové metody [7]. V druhé části byla měřena účinnost vůči bakteriálnímu biofilmu. Při tomto měření byly použity dvě metody – stanovení za pomoci krystalové violeti a trifenyl tetrazolium-chloridu (TTC) [25, 28, 31]. Všechna měření byla prováděna v triplicátu.

Veškerá data pro diplomovou práci byla měřena na pracovišti Centra biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové (FNHK).

7.1 VYBAVENÍ

7.1.1 Pomůcky

Veškerý níže uvedený spotřební laboratorní materiál byl zakoupen od firmy P-lab (Praha, Česká republika).

Pro měření byly využity 12jamkové rezervoáry, jednorázové očkovací kličky, Petriho misky, sterilní mikrotitrační destičky, sterilní špičky, sterilní zkumavky, stojánky na zkumavky, ependorfky, parafilm.

V rámci experimentu byly využity následující přístroje: multikanálové a jednoduché pipety Research Plus (Eppendorf, Hamburk, Německo), Denzitometr Den-1B (Biosan ltd, Riga, Lotyšsko), laminární box Heal force (Shanghai Lisben scientific equipment, Šanghaj, Čína), CO₂ inkubátor (ESCO, Singapur), Vortex mixer Stuart (Bibby-scientific/Cole-Parner, Staffordshire, UK), ultrazvuková lázeň SONOREX DIGITEC (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Německo) a spektrofotometr The SynergyTM HT (Bio-Tek Instruments, Vermont, USA).

7.1.2 Chemikálie

Dimethylsulfoxid (DMSO) pro molekulární biologii $\geq 99,9\%$ (Sigma – Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), Mueller-Hintonův bujón, použitý jako kultivační médium (HiMedia, Bombaj, Indie), Mueller-Hintonův agar, použitá kultivační půda (HiMedia, Bombaj, Indie), Voda pro injekce (Braun, Malsugen, Německo), 1% roztok krystalové violeti (Sigma – Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), TTC (Sigma – Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), fyziologický roztok (Braun, Malsugen, Německo), kyselina octová (Sigma – Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

7.1.3 Testované látky

Pro testování byly vybrány 2 sady nově syntetizovaných látek typu kvartérních amoniových solí. Látky sady A jsou strukturní deriváty substituovaného pyrrolidinu a látky sady B strukturní deriváty substituovaného piperidinu. Každá sada obsahuje 5 látek, které se mezi sebou liší délkou dlouhého alkylového řetězce navázaného na kvartérní dusík. Protiiontem těchto kvartérních amoniových solí je bromidový aniont. Standardy k porovnání antibakteriální aktivity byly pyridinium bromidy (1-C₁₂₋₁₆) a benzalkonium bromidy (2-C₁₂₋₁₆) o délce alkylových řetězců 12, 14 a 16 uhlíků. Tabulka č.1 udává dále používané označení testovaných látek s odpovídajícím strukturním rysem a počtem uhlíků v alkylovém řetězci.

Tabulka 1 – Testované látky

Označení	Sumární vzorec	Délka alkylového řetězce	Clog P
A10	C ₁₅ H ₃₂ BrNO	10	-0.723
A12	C ₁₇ H ₃₆ BrNO	12	0.166
A14	C ₁₉ H ₄₀ BrNO	14	1.056
A16	C ₂₁ H ₄₄ BrNO	16	1.954
A18	C ₂₃ H ₄₈ BrNO	18	2.834
B10	C ₁₇ H ₃₆ BrNO	10	-0,202
B12	C ₁₉ H ₄₀ BrNO	12	0.687
B14	C ₂₁ H ₄₄ BrNO	14	1.576
B16	C ₂₃ H ₄₈ BrNO	16	2.466
B18	C ₂₅ H ₅₂ BrNO	18	3.354
1 – C12	C ₁₇ H ₃₀ NBr	12	1.693
1 – C14	C ₁₉ H ₃₄ NBr	14	2.582
1 – C16	C ₂₁ H ₃₈ NBr	16	3.471
2 – C12	C ₂₁ H ₃₈ NBr	12	2.633
2 – C14	C ₂₃ H ₄₂ NBr	14	3.522
2 – C16	C ₂₅ H ₄₆ NBr	16	4.411

A – alkylderiváty substituovaného pyrrolidinu; B – alkyderiváty substituovaného piperidinu; 1 – C12-16 – alkyipyridinium bromidy; 2 – C12-16 – benzalkonium bromidy; ClogP – kalkulovaný log P

7.1.3.1 Příprava testovaných látek

Každá z testovaných látek byla navážena a rozpuštěna v příslušném objemu DMSO, tak aby výsledná koncentrace byla 0,05 M, tedy 100x vyšší než nejvyšší testovaná koncentrace. Roztok byl následně důkladně promíchán na vortexu.

Pro výpočet objemu DMSO byla použita následující rovnice:

$$V_{DMSO} = \frac{m}{M \cdot c \cdot 100} = x \text{ l DMSO} \cdot 10^6 = x \text{ } \mu\text{l DMSO}$$

m navážka [g]

M molární hmotnost

c první testovaná koncentrace = 500 μmol/l = 0,0005 mol/l

Do sterilní zkumavky bylo napipetováno 3,96 ml růstového média a 40 μl testované látky rozpuštěné v DMSO. Takto došlo ke stonásobnému ředění původního roztoku a byla získána nejvyšší testovaná koncentrace látky, přičemž koncentrace DMSO ve finálním roztoku odpovídá 1 %. Obsah zkumavky byl pečlivě promíchán na vortexu,

roztok byl zkontrolován, zda se nevysrážel. Pokud ano, byl přidán další ekvivalent růstového média.

7.1.4 Bakteriální kmeny

V rámci testování byl využit set osmi bakteriálních kmenů. Jedná se o nozokominální patogeny izolované z pacientů FNHK. Čtyři z nich patří mezi G + a čtyři mezi G – bakterie. Všechny kmeny s příslušnými zkratkami jsou uvedené níže.

Gramnegativní bakterie (G -):

Escherichia coli (ESCO)

Klebsiella pneumoniae (KLPN -)

Klebsiella pneumoniae, produkující širokospektré β – laktamázy (KLPN +)

multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE MR)

Gram pozitivní bakterie (G+):

Staphylococcus aureus (STAU)

Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Staphylococcus epidermidis (STEP)

Vankomycin-rezistentní *Enterococcus* (VRE)

7.2 Metodika

7.2.1 Mikrodiluční bujonová metoda

7.2.1.1 Příprava bakteriálních suspenzí

Nejdříve byly připraveny sterilní zkumavky, které byly popsány názvy testovaných kmenů. Z narostlých kultur daných bakterií byla odebrána malá část kolonie a ta byla resuspendována ve 3 ml injekční vody. Výsledná suspenze byla promíchána na vortexu,

následně byla proměřena její optická denzita, bakteriální suspenze by měla odpovídat 0,5 stupně McFarlandovy stupnice.

7.2.1.2 Testování

Z připraveného zásobního roztoku bylo asepticky přeneseno 200 μ l do všech prvních jamek destičky. Do druhých a třetích jamek všech řádků bylo přeneseno 100 μ l. Dále bylo připraveno Mueller – Hintonovo médium s 1 % DMSO. 100 μ l média bylo asepticky napipetováno multikanálovou pipetou do 2.–11. jamky všech řádků mikrotitrační destičky. Do poslední 12. jamky bylo napipetováno 200 μ l, tyto jamky fungovaly jako kontroly růstu. Dále byl obsah druhého sloupce promíchán. Následně byl promíchán třetí sloupec, z tohoto sloupce bylo přeneseno 100 μ l do sloupce číslo 4. Zde byl obsah opět promíchán a opět bylo přeneseno 100 μ l do následujícího sloupce. Tímto způsobem se postupovalo až k 11. sloupci. Z tohoto sloupce bylo po promíchání 100 μ l odstraněno. Poté byly doplněny všechny jamky sloupců 3 – 11 100 μ l média s 1 % DMSO. Tím vznikla dvojková ředící řada testované látky.

Do připravené destičky bylo do každé jamky jednoho řádku napipetováno 10 μ l připravené bakteriální suspenze. Jeden řádek příslušel jednomu bakteriálnímu kmenu.

Takto připravená mikrotitrační destička byla překryta víčkem a inkubována v termostatu při 35 ± 1 °C.

Pro stanovení minimální baktericidní koncentrace (MBC) byla druhý den připravena nová destička, do které bylo napipetováno 200 μ l média a poté 10 μ l obsahu z první destičky do odpovídající jamky na nové destičce, která byla inkubována 24 hodin. Obě destičky jsou další 24 hodin inkubovány v termostatu při 35 ± 1 °C.

7.2.1.3 Vyhodnocení

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla odečtena po 24 hodinách a následně po 48 hodinách inkubace v termostatu. K odečtení hodnot byl využit spektrofotometr, kde bylo odečítáno při 600 nm. MIC odpovídá nejnižší koncentraci testované látky, která zamezila růstu bakterie. Obdobně byla stanovena i MBC z odpovídající mikrotitrační destičky po 24 hodinách inkubace.

7.2.2 Biofilmová metodika s využitím krystalové violeti

Pro tuto metodu byl využit pouze bakteriální kmen STAU. Do připravené mikrotitrační destičky bylo do prvního sloupečku napipetováno 200 μ l čistého média Müller-Hinton (M-H), tento sloupec slouží pro kontrolu sterility. Do sloupečku číslo 12 byla napipetováno 200 μ l média M-H s 1 % DMSO s bakteriálním kmenem, v našem případě STAU, podobně jako první slouží tento sloupec ke kontrole, tentokrát ale růstu. V sloupečcích 2. – 11. bylo provedeno sériové ředění antimikrobních látek. Do druhého sloupečku bylo napipetováno 200 μ l zásobního roztoku látky, to je 990 μ l média M-H s 10 μ l antimikrobní látky. Ve 3. a 4. sloupečku bylo napipetováno 100 μ l média M-H s látkou. Do 4. – 11. jamky bylo napipetováno 100 μ l média M-H s DMSO. Čtvrtá jamka byla promíchána a 100 μ l bylo přeneseno do vedlejšího sloupečku. Tímto způsobem se pokračovalo až k 11 sloupcům. Odtud bylo odebráno 100 μ l a přeneseno do odpadu. Sloupce 3–11 byly doplněny 100 μ l média M-H s 1 % DMSO.

Bakteriální suspenze STAU byla připravena stejným způsobem jako u stanovení MIC. Do každé jamky 2.–12. sloupce bylo přidáno 10 μ l této suspenze. Připravená destička byla inkubována 24 hodin v termostatu při 35 °C.

Následující den, po uplynutí doby inkubace, byl obsah destičky vylit do odpadní nádoby, následně byla destička ponořena do nádoby s oplachovým fyziologickým roztokem. Dále byla vyklepána do buničiny, a ještě jednou opláchnuta. Do všech jamek bylo přidáno 220 μ l 0,1% krystalové violeti. Ta byla připravena smícháním 2,5 ml 1% violeti do 22,5 ml vody. Destička byla inkubována při pokojové teplotě 15 minut. Poté byla opláchnuta 3 – 4x ve fyziologickém roztoku a vyklepána do buničiny a nechána uschnout. Následně bylo přidáno 220 μ l 30 % kyseliny octové. Následovala další inkubace 10–15 minut.

7.2.3 Biofilmová metoda s využitím TTC

Příprava destičky s bakteriální suspenzí je zde stejná jako u stanovení s krystalovou violetí.

Druhý den po inkubaci byl obsah destičky vylit do odpadní nádoby, destička byla následně ponořena do nádoby s oplachovým fyziologickým roztokem a voda z destičky byla vyklepána do buničiny, oplach byl ještě jednou zopakován. Dále bylo do všech jamek napipetováno 225 μ l média M-H. Destička byla zakryta a zalepena parafilmem,

aby nedošlo k vylití či ke kontaminaci a byla ultrazvukována 5 minut. Po ultrazvuku bylo přidána 25 μ l 1 % TTC. Poté proběhla 5–7hodinová inkubace při 37 °C ve tmě. Po inkubaci bylo 200 μ l přesunuto do nové destičky.

7.2.4 Vyhodnocení biofilmové metodiky

Vyhodnocení biofilmové metodiky s krystalovou violetí bylo provedeno spektrofotometricky při vlnové délce 550–570 nm.

U metodiky s TTC probíhalo vyhodnocení na spektrofotometru, kde byla destička proměřována při 405, 450, 490 a 540 nm. Jako blank zde bylo použito médium M-H bez bakterii s TTC.

8. VÝSLEDKY

8.1 Stanovení antimikrobní aktivity pomocí mikrodiluční bujonové metody

Mikrodiluční bujonovou metodou bylo dohromady testováno 16 látek, z toho 6 standardů, pro stanovení MIC a MBC. 10 látek bylo nově připravených a jejich účinnost byla srovnána se strukturně odpovídajícími standardy typu benzalkonia a pyridinia běžně používanými v praxi.

Látky byly rozděleny do dvou skupin dle struktury. Každý set obsahoval 5 derivátů s odlišnou délkou alkylového řetězce (deseti, dvanácti, čtrnácti, šestnácti a osmnácti uhlíky). První set látek (skupina A) je odvozena od struktury pyrrolidinu. Druhý set (skupina B) je odvozena od struktury piperidinu.

Tabulky 2 a 3 uvádí odečtené hodnoty či rozmezí hodnot MIC po 24 a 48 hodinách a MBC po 48 hodinách v $\mu\text{mol/l}$ u vybraných kmenů bakterií. Hodnoty >500 znamenají, že v daném rozmezí koncentrací nemá testovaná látka na bakterii inhibiční účinek. Tabulka 4 pak uvádí hodnoty MIC a MBC měřené stejnou metodikou pro standardní látky skupiny 1 (pyridiniové sole) a skupiny 2 (benzalkoniové sole).

Tabulka 2 – Výsledné hodnoty MIC a MBC u prvního setu látek (alkylderiváty substituovaného pyrrolidinu)

Set 1	[$\mu\text{mol/l}$]	A10	A12	A14	A16	A18
STAU	MIC 24	250	15,63	1,95-3,91	1,95-7,81	0,98
	MIC 48	250	62,5	3,91	1,95-7,81	0,98-1,95
	MBC	>500	62,5	15,63-31,25	31,25	3,91-7,81
MRSA	MIC 24	>500	62,5	7,81-15,63	0,98-1,95	3,91-7,81
	MIC 48	>500	62,5	7,81-15,63	1,95	3,91-7,81
	MBC	>500	125	15,63-31,25	15,63-31,25	15,63
STEP	MIC 24	500	31,25	7,81-15,63	0,49-1,95	1,95-3,91
	MIC 48	>500	62,5	7,81-15,63	1,95-3,91	1,95-3,91
	MBC	>500	125	31,25	15,63	7,81
VRE	MIC 24	7,81	0,98	0,49-7,81	>250	0,25
	MIC 48	>500	125	7,81-31,25	1,95-3,91	0,49
	MBC	>500	125	7,81-31,25	1,95-31,25	1,95-7,81
ESCO	MIC 24	>500	500	31,25	7,81	15,63
	MIC 48	>500	500	31,25	7,81	15,63-31,25
	MBC	>500	500	31,25-62,5	15,63	31,25
KLPN -	MIC 24	>500	250	31,25-62,5	7,81-31,25	15,63-62,5
	MIC 48	>500	500	31,25-62,5	7,81-31,25	15,63-62,5
	MBC	>500	500	62,5-125	31,25	15,63-62,5
KLPN +	MIC 24	>500	>500	31,25-62,5	15,63	15,63
	MIC 48	>500	>500	62,5	31,25	31,25
	MBC	>500	>500	62,5	31,25-62,5	31,25
PSAE	MIC 24	>500	500	250	250	>125
	MIC 48	>500	500	250	250	>125
	MBC	>500	500	250	250	>125

MIC – minimální inhibiční koncentrace; MBC – minimální baktericidní koncentrace; STAU – *Staphylococcus aureus*; MRSA – Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*; STEP – *Staphylococcus epidermidis*; VRE – Vankomycin-rezistentní *Enterococcus*; ESCO – *Escherichia coli*; KLPN- – *Klebsiella pneumoniae*; KLPN+ – *Klebsiella pneumoniae*, produkující širokospektré β – laktamázy; PSAE MR – multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*

Tabulka 3 – Výsledné hodnoty MIC a MBC u druhého setu látek (alkylderiváty substituovaného piperidinu)

Set 2	[$\mu\text{mol/l}$]	B10	B12	B14	B16	B18
STAU	MIC 24	>500	125	3,91-7,81	1,95-3,91	1,95
	MIC 48	>500	125	7,81	1,95-3,91	3,91
	MBC	>500	125	7,81-15,63	1,95-3,91	3,91
MRSA	MIC 24	>500	125	7,81-15,63	1,95-3,91	1,95
	MIC 48	>500	125	7,81-15,63	1,95-3,91	3,91
	MBC	>500	125	15,63-31,25	7,81-15,63	3,91
STEP	MIC 24	>500	125	7,81	0,98-1,95	3,91
	MIC 48	>500	125	7,81	1,95-3,91	3,91
	MBC	>500	125	62,5–125	1,95-3,91	7,81
VRE	MIC 24	>500	62,5	7,81	3,91	15,63
	MIC 48	7,81	62,5	7,81	3,91	15,63
	MBC	>500	62,5	31,25	7,81	15,63
ESCO	MIC 24	>500	500	62,5	15,63-31,25	31,25
	MIC 48	>500	500	62,5	15,63-31,25	31,25
	MBC	>500	500	62,5	31,25	31,25
KLPN -	MIC 24	>500	>500	125-250	31,25-62,5	125
	MIC 48	>500	>500	125-250	31,25-62,5	125
	MBC	>500	>500	125-250	31,25-62,5	125
KLPN +	MIC 24	>500	>500	250-500	31,25-62,5	62,5
	MIC 48	>500	>500	250-500	62,5	62,5
	MBC	>500	>500	250-500	62,5-125	250
PSAE	MIC 24	>500	>500	500	>250	>250
	MIC 48	>500	>500	500	>250	>250
	MBC	>500	>500	500	>250	>250

MIC – minimální inhibiční koncentrace; MBC – minimální baktericidní koncentrace; STAU – *Staphylococcus aureus*; MRSA – Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*; STEP – *Staphylococcus epidermidis*; VRE – Vankomycin-rezistentní *Enterococcus*; ESCO – *Escherichia coli*; KLPN- – *Klebsiella pneumoniae*; KLPN+ – *Klebsiella pneumoniae*, produkující širokospektré β – laktamázy; PSAE MR – multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*

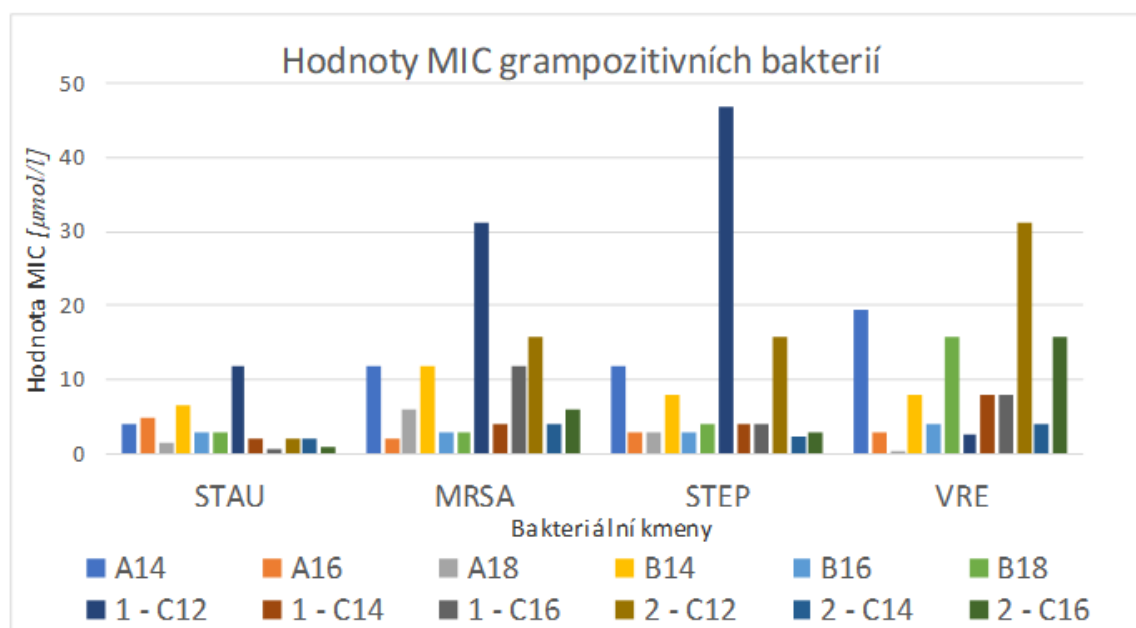
Tabulka 4 – Výsledné hodnoty MIC a MBC u standardů

Standardy	[$\mu\text{mol/l}$]	1 – C12	1 – C14	1 – C16	2 – C12	2 – C14	2 – C16
STAU	MIC 24	7,81	1,95	0,49	1,95	0,98	0,98
	MIC 48	15,63	1,95	0,98	1,95	0,98-1,95	0,98
	MBC	31,25	3,91	1,95	1,95	0,98-1,95	1,95
MRSA	MIC 24	7,81	3,91	7,81	15,63	3,91	3,91
	MIC 48	15,63	3,91	15,63	15,63	3,91	7,81
	MBC	31,25	7,81	15,63	15,63	3,91	7,81
STEP	MIC 24	31,25	3,91	3,91	15,63	0,98-1,95	1,95-3,91
	MIC 48	62,5	3,91	3,91	15,63	1,95	1,95-3,91
	MBC	62,5	3,91	3,91	15,63	1,95	1,95-7,81
VRE	MIC 24	0,98	7,81	7,81	31,25	3,91	15,63
	MIC 48	3,91	7,81	7,81	31,25	3,91	15,63
	MBC	31,25	7,81	7,81	31,25	7,81	15,63
ESCO	MIC 24	62,5	15,63	7,81	15,63	7,81	31,25
	MIC 48	62,5	15,63	7,81	15,36	7,81	62,5
	MBC	125	15,63	7,81	15,63	7,81	62,5
KLPN -	MIC 24	125	31,25	15,63	7,81	15,63	62,5
	MIC 48	125	31,25	15,63	7,81	15,63	62,5
	MBC	250	31,25	31,25	7,81	15,63	62,5
KLPN +	MIC 24	125	31,25	15,63	15,63	7,81	62,5
	MIC 48	125	62,5	15,63	15,63	7,81	62,5
	MBC	125	250	15,63	15,63	7,81	62,5-125
PSAE	MIC 24	500	500	>250	250	7,81–31,25	7,81-125
	MIC 48	500	500	>250	250 – 500	15,63–31,25	125
	MBC	500	500	>250	250 - 500	15,63–31,25	125-250

MIC – minimální inhibiční koncentrace; MBC – minimální baktericidní koncentrace; STAU – *Staphylococcus aureus*; MRSA – Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*; STEP – *Staphylococcus epidermidis*; VRE – Vankomycin-rezistentní *Enterococcus*; ESCO – *Escherichia coli*; KLPN- – *Klebsiella pneumoniae*; KLPN+ – *Klebsiella pneumoniae*, produkující širokospektré β – laktamázy; PSAE MR – multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*

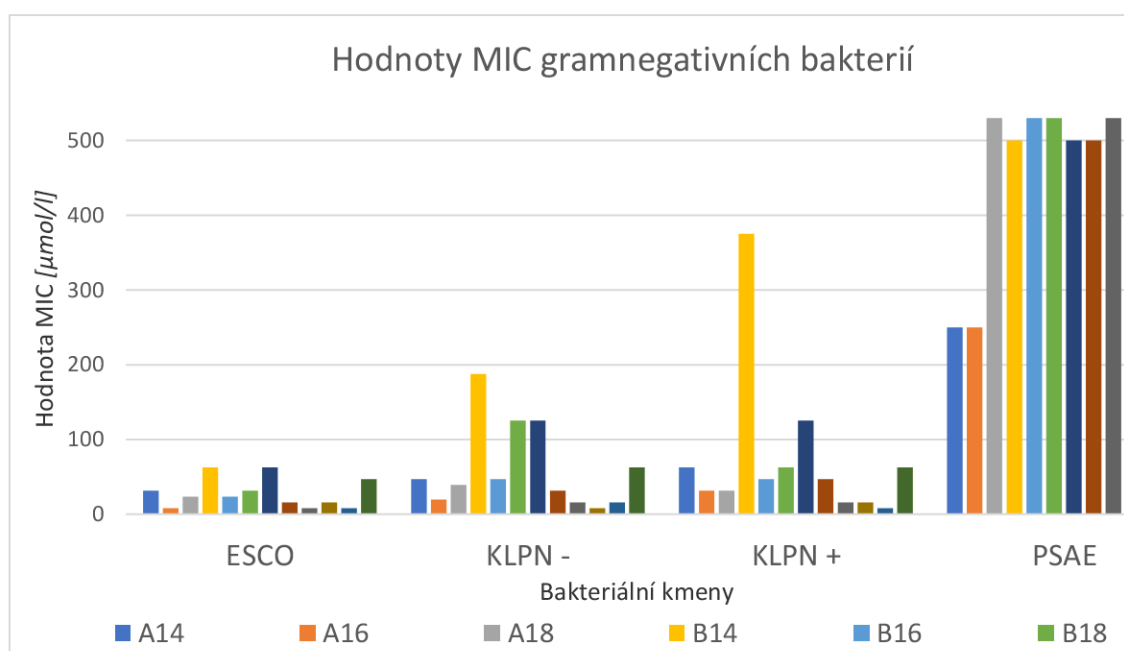
Z výše uvedených tabulek lze vyčíst, že na inhibici STAU nejlépe působila látka A18, na MRSA látka A16, STEP A16, A18, B16, B18, na VRE A18, ESCO A16, KLPN⁻ A16, KLPN⁺ A16, A18, na PSAE A14, A16. Pro přehlednější porovnání jsou neúčinnější látky spolu se standardy zobrazeny v grafech 1 až 4. Graf 1 zahrnuje srovnání hodnot MIC u vybraných neúčinnějších látek s oběma skupinami standardů pro grampozitivní bakterie. Graf 2 je pak pro gramnegativní bakterie. Grafy 3 a 4 porovnávají analogicky hodnoty MBC u grampozitivních bakterií (graf 3) a gramnegativních bakterií (graf 4).

Graf 1 – Srovnání hodnot MIC testovaných látek a standardů u grampozitivních bakterií



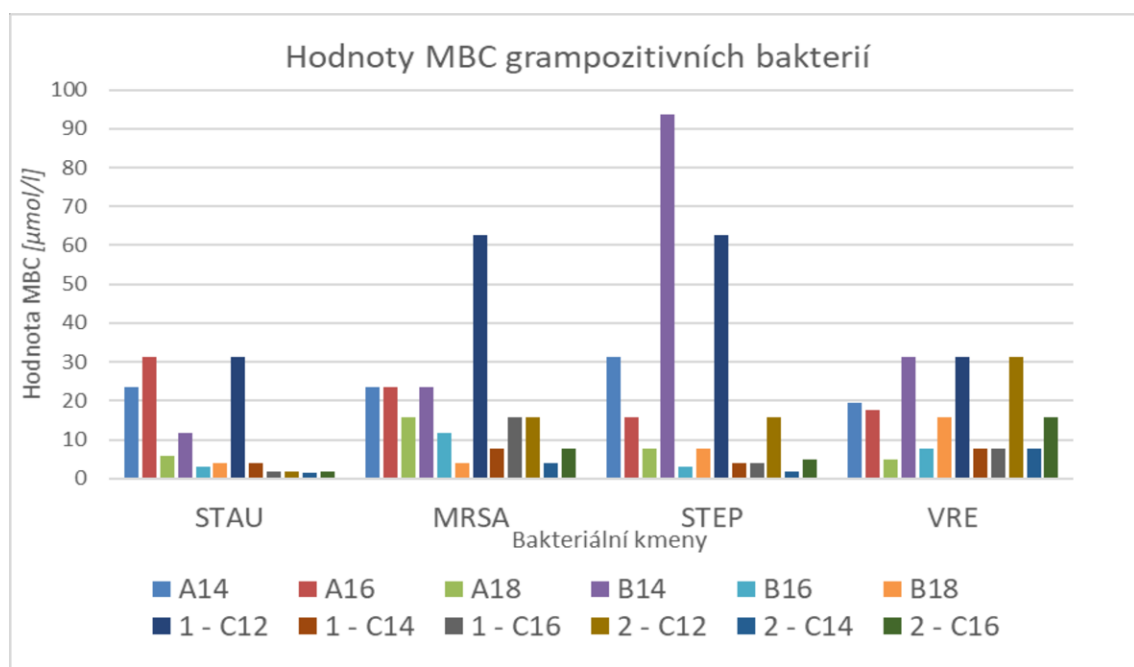
A – deriváty pyrrolidinu; B – deriváty piperidinu; 1 – standardy typu pyridinia; 2 – standardy typu benzalkonia; MIC – minimální inhibiční koncentrace; STAU – *Staphylococcus aureus*; MRSA – Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*; STEP – *Staphylococcus epidermidis*; VRE – Vankomycin-rezistentní *Enterococcus*

Graf 2 – Srovnání hodnot MIC testovaných látek a standardů u gramnegativních bakterií



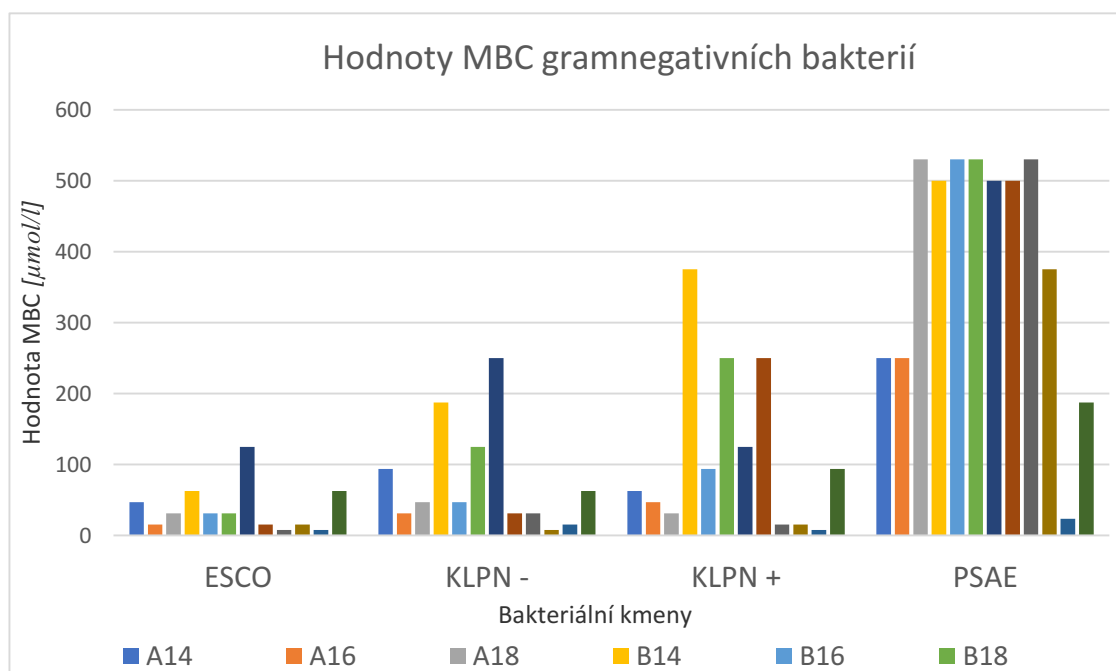
A – deriváty pyrrolidinu; B – deriváty piperidinu; 1 – standardy typu pyridinia; 2 – standardy typu benzalkonia; MIC – minimální inhibiční koncentrace; ESCO – *Escherichia coli*; KLPN- – *Klebsiella pneumoniae*; KLPN+ – *Klebsiella pneumoniae*, produkující širokospektré β – laktamázy; PSAE MR – multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*

Graf 3 – Srovnání hodnot MBC testovaných látek a standardů u grampozitivních bakterií



A – deriváty pyrrolidinu; B – deriváty piperidinu; 1 – standardy typu pyridinia; 2 – standardy typu benzalkonia; MBC – minimální baktericidní koncentrace; STAU – *Staphylococcus aureus*; MRSA – Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*; STEP – *Staphylococcus epidermidis*; VRE – Vankomycin-rezistentní *Enterococcus*

Graf 4 – Srovnání hodnot MBC testovaných látek a standardů u gramnegativní bakterií



A – deriváty pyrrolidinu; B – deriváty piperidinu; 1 – standardy typu pyridinia; 2 – standardy typu benzalkonia; MBC – minimální baktericidní koncentrace; ESCO – *Escherichia coli*; KLPN- – *Klebsiella pneumoniae*; KLPN+ – *Klebsiella pneumoniae*, produkující širokospektré β – laktamázy; PSAE MR – multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*

8.2 Stanovení antibiofilmové aktivity pomocí krystalové violeti

Při této metodě byl pozorován nárůst biofilmu bakteriálního kmene STAU. Naměřené hodnoty absorbancí pozitivních kontrol byly příliš nízké pro případné stanovení minimální biofilm inhibující koncentrace (MBIC). Výsledky zde proto nejsou uvedeny.

8.3 Stanovení antibiofilmové aktivity pomocí TTC

Při této metodě byla hodnocena antibiofilmová aktivita za použití metody s TTC, na biofilm vytvořený STAU. V tabulce 5 níže jsou vyneseny výsledky z měření MBIC, měřena v $\mu\text{mol/l}$. Jsou zde vyneseny hodnoty 4 látek a 4 standardů se stejně dlouhým alkylovým řetězcem, které byly vybrány na základě výsledku z mikrodiluční bujonové metody.

Tabulka 5 – Hodnoty MBIC za použití TTC assay

MBIC [$\mu\text{mol/l}$]	Vlnová délka (nm)			
	405 nm	450 nm	490 nm	540 nm
Označení látek				
A14	0,98	0,49-3,91	0,98-3,91	0,98
B14	3,91	1,95-3,91	3,91	1,95-3,91
A16	3,91-15,63	0,49-3,91	1,95-3,91	1,95-3,91
B16	7,81-15,63	0,98-3,91	3,91-7,81	3,91-7,81
1-C14	15,63	0,98-3,91	3,91	3,91
2-C14	15,63-31,25	0,98-1,95	1,95-3,91	1,95-3,91
1-C16	0,98	0,49-0,98	0,98	0,98
2-C16	1,95-7,81	0,98-1,95	1,95	1,95-3,91
P(T<=t)	0,00033	0,00019	0,00071	0,00048

A – deriváty pyrrolidinu; B – deriváty piperidinu; 1 – standardy typu pyridinia; 2 – standardy typu benzalkonia; MBIC – minimální biofilm inhibující koncentrace; TTC assay – stanovení narostlého biofilmu pomocí barviva; P(T<=t) – dvouvýběrový F a t-test pro stanovení rozptylu

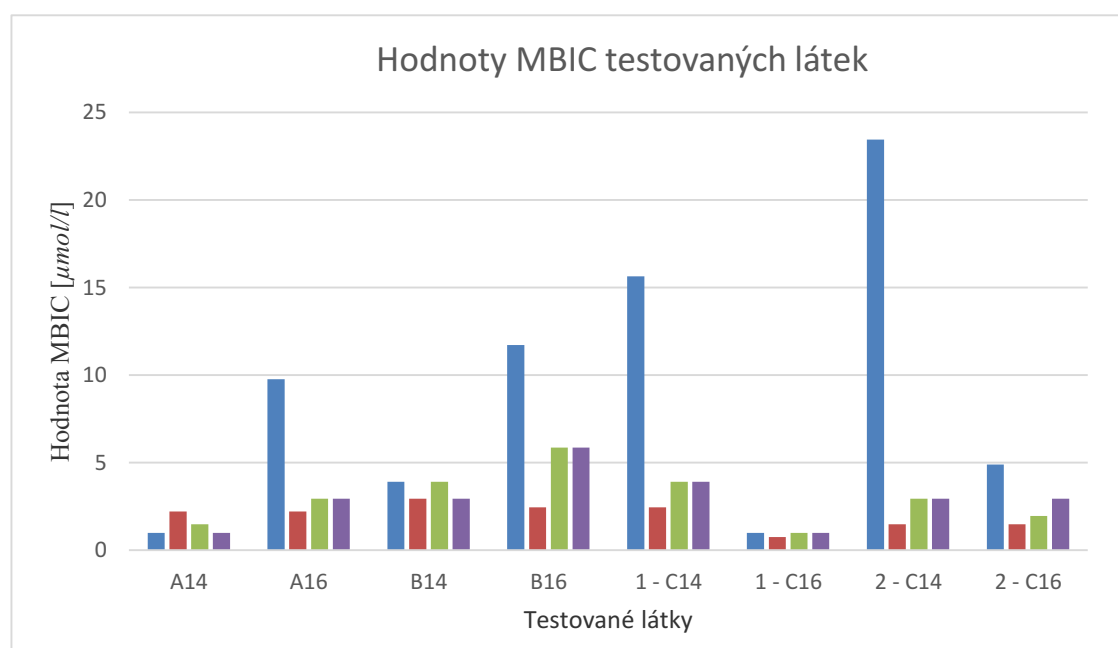
Byl sledován nárůst bakteriálního biofilmu kmene STAU a zároveň biofilm inhibující potenciál testovaných látek. Červený formazan vznikající v rámci bakteriálního metabolismu umožňoval stanovení narostlého biofilmu.

Pro stanovení byly použity 4 různé vlnové délky uváděné v literatuře [21]. Hodnoty pozitivních a negativních kontrol byly statisticky zhodnoceny pomocí dvouvýběrového F-testu pro rozptyl a dvouvýběrového t-testu s rovností (výsledky naměřené při vlnových délkách 405 a 450nm) či nerovností (výsledky naměřené při vlnových délkách 490 a 540nm) rozptylů s hladinou významnosti 5 %. Všechny čtyři vlnové délky bylo možné použít pro stanovení minimální biofilm inhibující koncentrace (MBIC).

Pro kvantifikaci narostlého biofilmu jsme porovnali množství vzniklého formazanu u pozitivní kontroly (narostlý biofilm bez testované látky) s bakteriální suspenzí o známé CFU/ml. CFU/ml narostlého biofilmu tak odpovídalo cca 10^8 .

V grafu č. 5 je pro přehlednost shrnuta aktivita vybraných testovaných látek proti biofilmu bakteriálního kmenu *Staphylococcus aureus*. Hodnoty MBIC byly odečteny po 24hodinové expozici biofilmu testovaným látkám. V grafu jsou uvedeny průměrné hodnoty MBIC stanovené při uvedených vlnových délkách. Hodnoty jsou uvedené v průměrech kvůli lepší zpracovatelnosti v grafu. Nejvyšší účinnost mají látky s nejnižší MBIC.

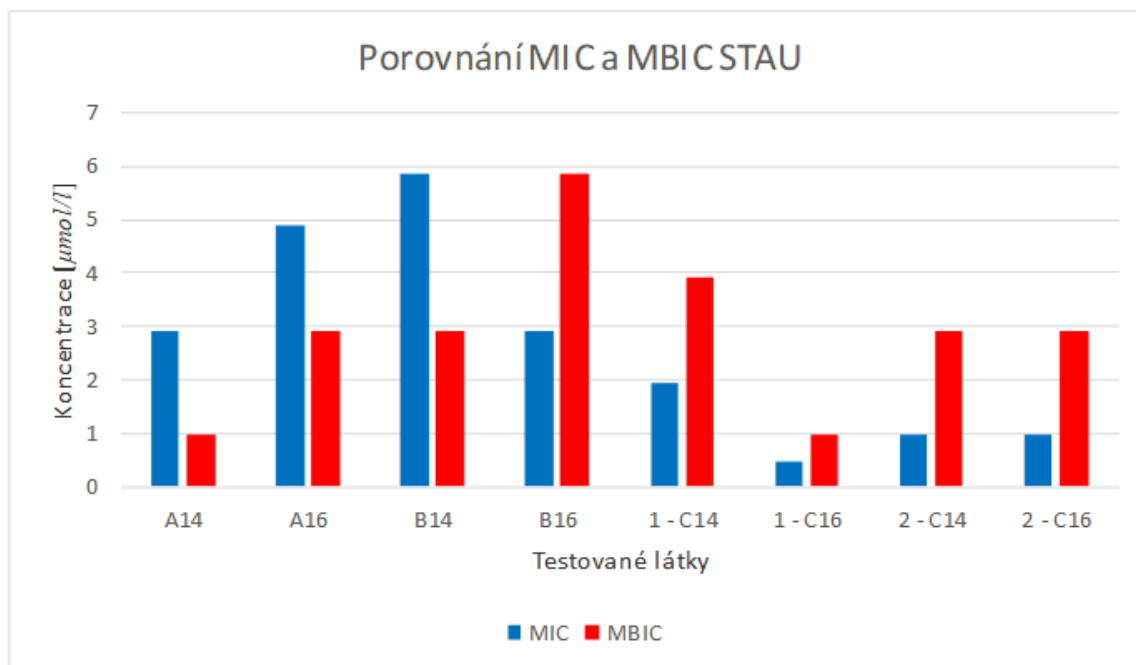
Graf 5 – Hodnoty MBIC testovaných látek



A – deriváty pyrrolidinu; B – deriváty piperidinu; 1 – standardy typu pyridinia; 2 – standardy typu benzalkonia; MBIC – minimální biofilm inhibující koncentrace

V grafu 6 jsou porovnávány hodnoty MIC, které byly měřeny při vlnové délce 600 nm a MBIC, měřené při vlnové délce 540 nm pro kmen *Staphylococcus aureus* u vybraných látek a standardů.

Graf 6 – Porovnání hodnot MIC a MBIC u *Staphylococcus aureus*



A – deriváty pyrrolidinu; B – deriváty piperidinu; 1 – standardy typu pyridinia; 2 – standardy typu benzalkonia; MIC – minimální inhibiční koncentrace; MBIC – minimální biofilm inhibující koncentrace

9. DISKUSE

Na základě stanovených cílů byly testovány nově syntetizované antimikrobiální látky odvozené od kvarterních amoniových solí na vybrané bakteriální kmeny. Účinnost jednotlivých látek byla hodnocena pomocí stanovených hodnot MIC a MBC k testovaným kmenům. Dále byla hodnocena antimikrobní aktivita na biofilm vytvořený bakteriálním kmenem STAU. Látky testované na MBIC byly vybírány na základě předchozích výsledků měření MIC, vybrány byly ty neúčinnější.

9.1 Závislost účinku na struktuře

Antimikrobní účinek byl hodnocen na základě hodnot MIC a MBC. Obecným pravidlem bylo porovnání jednotlivých inhibičních a baktericidních koncentrací jednotlivých látek. Nižší koncentrace značí vyšší účinnost vůči testovanému kmeni, jelikož je pro daný účinek dostačující nižší koncentrace látky.

Nejnižší účinnost měly látky s krátkými alkylovými řetězci, tedy A10, A12, B10 a B12. Stanovené hodnoty MIC byly často vyšší než nejvyšší testovaná koncentrace, případně byly stanovené koncentrace znatelně vyšší než u látek s delšími alkylovými řetězci. Tyto látky nejsou uvedeny v grafech, pouze v tabulce č. 1.

Nejvyšší účinnost vykazovaly látky s delšími alkylovými řetězci, jedná se o látky A14, A16, A18, B14, B16 a B18. Obecně byla pozorována vyšší účinnost proti gram pozitivním bakteriím, k nimž patří kmeny STAU, MRSA, STEP a VRE. U gram negativních kmenů byla aktivita látek nižší ve srovnání s kmeny G^+ , ale i tak byla účinnost těchto látek dostatečná pro inhibici G^- bakterií. Pouze v případě PSAE toto tvrzení neplatí, na tento bakteriální kmen účinkovaly pouze látky A14, A16 a B14. Z naměřených hodnot vyplývá, že testované látky s delšími alkylovými řetězci jsou účinnější. S ohledem na klesající rozpustnost látek s narůstajícím alkylovým řetězcem lze vyzdvihnout především čtrnácti a šestnácti uhlíkaté látky pro jejich relativně dobrou účinnost a zároveň rozpustnost. Při porovnání s naměřenými standardy byly v několika případech účinky některých látek lepší nebo srovnatelné, ale nelze zde pozorovat souvislost v účinnosti a délce alkylového řetězce mezi látkami a standardy.

Naměřené baktericidní koncentrace korelovaly s koncentracemi inhibičními a nelišily se o více než 2 ředění ve dvojkové koncentrační řadě. Proto lze všechny testované látky považovat rovněž za baktericidní.

Porovnáme-li tedy celkově látky se stejně dlouhými řetězci z různých setů zjistíme, že látky ze setu A, které jsou odvozené od pyrrolidinu, jsou účinnější než látky odvozené od piperidinu, který je v látkách setu B. U standardů jsou účinnější 12-ti a 14-ti uhlíkaté deriváty benzalkonia a naopak 16-ti uhlíkatý derivát pyridinia.

Existuje mnoho studií zabývajících se podobnou tematikou. Všeobecně je přijímáno, že účinnost QAS je závislá na rozsahu délky alkylového řetězce. Obecně jsou proti mikrobům účinnější ty, které mají 10 a více uhlíků v řetězci, ale zároveň není vhodné mít více než 18ti uhlíkatý alkylový řetězec, zejména kvůli obtížné rozpustnosti ve vodných roztocích. Při porovnání s našimi látkami lze pozorovat srovnatelný účinek 16ti uhlíkatých látek na grampozitivní bakterie. Kratší řetězce pak dle studií podporují účinek spíše proti grampozitivním bakteriím [32-33].

V našem měření je také možné vidět vyšší účinnost u látek s delším alkylovým řetězcem. Avšak nám se osvědčili látky s 14ti až 18ti uhlíkatými řetězci. Na rozdíl od výše zmíněné studie byla účinnost vůči grampozitivním bakteriím lepší spíše u 16ti a 18ti uhlíkatých látek. S účinností proti gramnegativním bakteriím můžeme souhlasit s 16ti uhlíkatými látkami, jak již bylo zmíněno. Jedinou výjimkou je *Pseudomonas aeruginosa* multirezistentní, kde byla neúčinnější látka s 14ti uhlíkatým řetězcem.

Vysvětlení rozdílné účinnosti různých QAS na rozdílné bakteriální kmeny je pravděpodobně v rozdílnosti složení lipidů v plazmatické membráně bakterií, dále záleží na buněčném cyklu a v neposlední řadě na faktorech prostředí, jak je popsáno v literatuře [32-33].

Na základě porovnání hodnot MIC (stanovených pro kmen STAU) a MBIC pro jednotlivé testované látky, lze říct, že pro boj s biofilmem jsou nutné koncentrace pouze zhruba 3krát vyšší, než u planktonní formy bakterií avšak neplatí to pro první tři testované látky, kde byla naměřena nižší hodnota MBIC než MIC, což by znamenalo, že látky efektivněji zabraňují tvorbě biofilmu než je jejich účinnost na planktonní formu. V ostatních případech včetně standardů bylo vždy třeba vyšší koncentraci látky pro inhibici růstu biofilmu než planktonní formy. Ve většině publikací je uváděno, že

biofilmová forma může být až 1000krát odolnější, avšak většinou se to vztahuje na eradikaci již narostlého biofilmu, kdy antimikrobní látka musí proniknout až do nitra narostlého biofilmu [34-35]. Při našem měření tomu tak nebylo. Jelikož jsme pozorovali pouze schopnost látek inhibovat růst biofilmu, dalo se předpokládat, že hodnoty MBIC nebudou výrazně vyšší než naměřené hodnoty MIC.

Stanovení MBIC pomocí krystalové violeti nebylo možné pravděpodobně z důvodu nedostatečně narostlého biofilmu. Náš biofilm obsahoval pouze 10^8 CFU/ml bakterií, což je na biofilm málo a tato metoda je nejspíš méně citlivá. Ukázalo se, že biofilm kmene *Staphylococcus aureus* roste pomalu, a 24hodinová inkubace nestačila pro nárůst dostatečně mohutného biofilmu. Řešením tohoto problému by mohla být delší doba inkubace, případně zvolit jiné kultivační médium, ve kterém by se bakterie lépe a rychleji pomnožila.

9.2 Závislost účinku na lipofilitě

Z naměřených hodnot vyplývá, že lipofilnější látky, tedy látky s vyšším CLogP, jsou účinnější oproti látkám, spíše hydrofilnějším. Je evidentní, že s rostoucí délkou alkylového řetězce roste lipofilita a zároveň i účinnost do určité délky řetězce, kde pak už narážíme na testovatelnost látek z důvodu rozpustnosti. Podobné výsledky popisují i další publikace, kde je ještě popsán vliv lipofility. Zásadní roli vždy hraje dlouhý alkylový řetězec, případně jejich počet. Vliv hydrofilního základu molekuly není tak zásadní [32].

V setu A byly nejúčinnější látky, které měly 16 nebo 18 uhlíků v alkylovém řetězci. U STAU, VRE a KLPN⁺ bylo u MIC, tak u MBC A18, která byla i nejlipofilnější ze setu A. U dalších kmenů byla nejúčinnější A16, která byla také velmi lipofilní. Rozdíl v účinnosti mezi A16 a A18 nebyl tak velký. Jedinou výjimku tvoří PSAE, kde byla účinná A16 a A14.

U setu B to vypadá velmi podobně s tím, že B18 účinkovalo na STAU a MRSA. A16 na STEP, VRE, ESCO, KLPN⁻ a KLPN⁺. Opět zde platí, že rozdíl mezi účinnou koncentrací těchto látek není velký. Výjimku tvoří zase PSAE, kde účinná byla pouze látka B14.

Lipofilita má tedy evidentní vliv na mechanismus interakce mezi účinnou látkou a bakteriální stěnou. Kladný náboj nacházející se na kvarterním atomu dusíku a dlouhý řetězec pak ovlivňují organizaci komplementu bakteriálních membrán. Membrány mají na povrchu záporně nabitě lipidy, ty následně QAS přitahují k sobě a způsobují jejich shlukování. Účinnější tak mohou být látky s rozvětvenějším bočním řetězcem [36].

10. ZÁVĚR

Pomocí mikrodiluční bujónové metody byla změřena MIC a MBC u nových látek a přiložených standardů. Dohromady bylo testováno 10 nových antimikrobních látek. Ty byly rozděleny na dva sady (A a B), podle toho, zda byly odvozeny od pyrrolidinu nebo piperidinu. Jejich účinnost byla porovnávána s 6 standardy.

Obecně lze říct, že testované látky měli vyšší účinnost na grampozitivní bakteriální kmeny. V porovnání se standardy látka A14 měla vyšší účinnost v MBC než příslušný standard, zejména na KLPN + a PSAE. Dále tomu tak bylo u látky B16, kde baktericidní účinek látky byl vyšší než u standardu, a to u bakterií STEP, VRE a ESCO. Na ostatní bakteriální kmeny byly látky většinou stejně účinné jako standardy, nebo méně.

Látky s největší účinností měli alkylový řetězec o délce 16 a 18 uhlíkových atomů, jedinou výjimkou byla *Pseudomonadas aeruginosa*, na kterou nejlépe účinkovaly látky o délce 14 uhlíkových atomů v řetězci.

Při pozorování účinnosti MBIC vybraných látek na narostlý biofilm kmene *Staphylococcus aureus*, byly použity 2 metody, za pomoci krystalové violeti a druhá za pomoci tetrazolinové soli (TTC). Byly testovány látky A14, A16, B14, B16 a jim odpovídající standardy. Metoda s krystalovou violetí nefungovala, pravděpodobně proto, že nebyl dostatečně narostlý biofilm a nemohla reagovat v plném rozsahu.

Metoda s TTC vyšla lépe. Nejlepší výsledky byly při vlnové délce 490 a 540 nm. Při těchto vlnových délkách bylo možné pozorovat inhibici růstu biofilmu a stanovit tak MBIC u všech testovaných látek. Při porovnání s hodnotami MIC získanými mikrodiluční bujónovou metodou nebyl pozorován výrazný rozdíl.

11. POUŽITÉ ZKRATKY

BHI	Brain Heart Infusion
CFU	Colony Forming Units
CLSM	Konfokální laserová skenovací mikroskopie
CRA	Konžský červený agar
CV	Krystalová violet
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DMSO	Dimethyl sulfoxid
ESCO	<i>Escherichia coli</i>
EPS	Polymerní extracelulární matrice
FISH	Fluorescenční in situ hybridizace
FNHK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
GFP	zelený fluorescenční protein
G+	grampozitivní bakterie
G-	gramnegativní bakterie
KLPN –	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL-
KLPN +	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL +
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
MBIC	Minimální biofilm inhibující koncentrace
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
M-H	Mueller-Hinton agar
MHB	Mueller-Hinton bujón
MRSA	Methicillin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
PSAE	Multirezistentní <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
QAS	Kvarterní amoniové soli
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie

STAU	<i>Staphylococcus aureus</i>
STEP	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
TM	Trubicová metoda
TTC	Trifenyl tetrazolium-chlorid
VRE	Vancomycin-rezistentní <i>Enterococcus</i>
XXT	2,3-bis- (2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl) -2H – tetrazolium-5-karboxanilid

12. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Testované látky	24
Tabulka 2 – Výsledné hodnoty MIC a MBC u prvního setu látek (alkylderiváty substituovaného pyrrolidinu)	30
Tabulka 3 – Výsledné hodnoty MIC a MBC u druhého setu látek (alkylderiváty substituovaného piperidinu).....	30
Tabulka 4 – Výsledné hodnoty MIC a MBC u standardů	31
Tabulka 5 – Hodnoty MBIC za použití TTC assay	36

13. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Struktura kvarterních amoniových solí	11
Obrázek 2 – Mechanismus účinku QAS	12
Obrázek 3 – Životní cyklus biofilmu	15

14. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Srovnání hodnot MIC testovaných látek a standardů u grampozitivních bakterií	33
Graf 2 – Srovnání hodnot MIC testovaných látek a standardů u gramnegativních bakterií	34
Graf 3 – Srovnání hodnot MBC testovaných látek a standardů u grampozitivních bakterií	34
Graf 4 – Srovnání hodnot MBC testovaných látek a standardů u gramnegativní bakterií	35
Graf 5 – Hodnoty MBIC testovaných látek	37
Graf 6 – Porovnání hodnot MIC a MBIC u Staphylococcus aureus	38

15. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] PADRTOVÁ, T., MARVANOVÁ, P., MOKRÝ, P. Kvarterní amoniové soli – syntéza a využití. *Chemické listy*. 2017, **111**(3), 197-205.
- [2] BENKOVA, M., SOUKUP, O., PRCHAL, L., a kol. Synthesis, Antimicrobial Effect and Lipophilicity-Activity Dependence of Three Series of Dichaine N-Alkylammonium Salts. *Chemistry Select*. 2019, **4**(41), 12076-12084.
- [3] SOUKUP, O., DOLEZAL, R., MALINAK, D., a kol. Synthesis, antimicrobial evaluation and molecular modeling of 5-hydroxyisoquinolinium salt series; the effect of the hydroxyl moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2016, **24**, 841-848.
- [4] MCDONNELL, G. a RUSSELL, D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999, **12**(1), 147 -179.
- [5] GERBA, C. P. Quaternary Ammonium Biocides: Efficacy in Application. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015, **81**(2), 464-469.
- [6] Struktura kvarterních amoniových solí. *Indiamart* [online]. Uttar Pradesh, Indie: IndiaMART InterMESH, 2020 [cit. 2021-5-9]. Dostupné z: <https://www.indiamart.com/proddetail/quaternary-ammonium-salts-10648117062.html>
- [7] CLSI [Clinical and Laboratory Standards Institute]. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Tenth Edition*. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. Volume 35, Number 2 ©2015. ISBN 1-56238-988-2.
- [8] MAREK, J., MALINAK, D., DOLEZAL, R., SOUKUP, O., PASDIOROVA, M., DOLEZAL, M., KUCA, K. Synthesis and Disinfection Effect of the Pyridine-4-aldoxime Based Salts. *Molecules*. 2015, **20**, 3681-3696. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules20033681
- [9] DOLEZAL, R., SOUKUP O., MALINAK, D., a kol. Towards understanding the mechanism of action of antibacterial N-alkyl-3-hydroxypyridinium salts: Biological activities, molecular modeling and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016, **121**, 699 - 711.
- [10] MAREK, J., JOSKOVA, V., DOLEZAL, R., a kol. Synthesis, Antimicrobial Effect and Surface Properties of Hydroxymethylsubstituted Pyridinium Salts. *Letters in Drug Design & Discovery*. 2017, **14**, 1-15.
- [11] HAMPLOVÁ, L. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol*. 1. Praha: Triton, 2015. ISBN 9788073879341.

[12] SCHINDLER, J. *Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů*. 2. Praha: Grada Publishing, 2014. ISBN 9788024747712.

[13] KVASNIČKOVÁ, E. Biofilmy: Život mikroorganismů v jednotném společenství. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. Praha: Vysoká škola Chemicko-technologická, 2016 [cit. 2021-03-08]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/popularizace/doktorandi-pisou/biofilmy>

[14] COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*. 1999, **284**, 1318-1322. Dostupné z: doi:10.1126/science.284.5418.1318

[15] KVASNIČKOVÁ, E., MAŽÁTKOVÁ, O., MASÁK, J. Medicinální aspekty mikrobiálních biofilmů. *Chemické listy*. 2016, **110**(7), 485 - 490.

[16] OMAR, A., WRIGHT, J.B., SCHULTZ, G., BURRELL, R., NADWORNÝ, P. Microbial Biofilms and Chronic Wounds. *Microorganisms*. 2017, **5**(9), 1-15. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms5010009

[17] KIRMUSAOĞLU, S. The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods* [online]. 1. London: IntechOpen, 2019, 1 - 16 [cit. 2021-03-25]. ISBN 978-1-78985-790-0. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.84411

[18] ACHINAS, S., CHARALAMPOGIANNIS, N., EUVERINK, G.J.W. A Brief Recap of Microbial Adhesion and Biofilms. *Applied sciences*. 2019, **9**(2801), 1 - 15. Dostupné z: doi:10.3390/app9142801

[19] MU, H., TANG, J., LIU, Q., SUN, C., WANG T., DUAN, J. Potent Antibacterial Nanoparticles against Biofilm and Intracellular Bacteria. *Scientific Reports*. 2016, **6**, 1-9. Dostupné z: doi:10.1038/srep18877

[20] HASSAN, A., USMAN, J., KALEEM, F., OMAIR, M., KHALID, A., IQBAL, M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *The Brazilian journal of infectious diseases*. 2011, **15**(4), 305 - 311.

[21] PEETERS, E., NELIS, H. J., COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*. 2008, **72**, 157 - 165.

[22] AZEREDO, J., AZEVEDO, N. F., BRIANDET R., a kol. Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*. 2017, **43**(3), 313 - 351.

[23] JORGENSEN, J. H., FERRARO, M. J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Medical Microbiology, Clinical Infectious Diseases*. 2009, **49**, 1749 - 1755. Dostupné z: doi:10.1086/647952

- [24] HILL, G. B., SCHALKOWSKY S. Development and Evaluation of the Spiral Gradient Endpoint Method for Susceptibility Testing of Anaerobic Gram-Negative Bacilli. *Reviews of Infectious Diseases*. 1990, **12**(2), 200 - 209.
- [25] O'Toole G.A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *JoVE*. 47. <http://www.jove.com/details.php?id=2437>. Dostupné z: doi: 10.3791/2437
- [26] LEWIS, K. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001, **45**(4), 999 - 1007. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.45.4.999-1007
- [27] JENKINS, S. G., SCHUETZ, A. N. Current Concepts in Laboratory Testing to Guide Antimicrobial Therapy. *Mayo Foundation for Medical Education and Research*. 2012, **87**(3), 290 - 308. Dostupné z: doi:10.1016/j.mayocp.2012.01.007
- [28] METZLER, A. Developing a Crystal Violet Assay to Quantify Biofilm Production Capabilities of Staphylococcus aureus. *Honors Research Thesis*. Department of Animal Sciences The Ohio State University, 2016, 1-15.
- [29] COFFEY, B. M., ANDERSON, G.M. Biofilm Formation in the 96-Well Microtiter Plate. Pseudomonas Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. 2014, (1149), 631 - 641. ISSN 978-1-4939-0472-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-0473-0_48.
- [30] TIAN, Q., CHEN, J., ZHANG, H., XIAO, Y. Study on the Modified triphenyl tetrazolium chloride – dehydrogenase activity (TTC-DHA) Method in Determination of bioactivity in the up-flow aerated bio-activated carbon filter. *African Journal of Biotechnology*. 2006, **5**(2), 181 - 188.
- [31] SHUKLA, S., TOLETI, S. R. (2017). An Improved Crystal Violet Assay for Biofilm Quantification in 96-Well Micro-Titre Plate. 10.1101/100214.
- [32] SALAJKOVA, S., BENKOVA, M., MAREK, J., a kol. Wide-Antimicrobial Spectrum of Picolinium Salts. *Molecules*. 2020, **25**(2254), 1 - 16. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25092254
- [33] SOUKUP, O., BENKOVA, M., DOLEZAL, R., a kol. The wide-spectrum antimicrobial effect of novel N-alkyl monoquaternary ammonium salts and their mixtures; the QSAR study against bacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020, **206**, 1 - 23.
- [34] HYMPANOVA, M., TERLEP, S., MARKOVA, A., a kol. The Antibacterial Effects of New N-Alkylpyridinium Salts on Planktonic and Biofilm Bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2020, **11**, 1 - 12. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.573951
- [35] CERI, H., OLSON, M.E., STREMICK, C., READ, R.R., MORCK, D., BURET, A. The calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic

susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, **37**(6), 1771 - 1776. Dostupné z: doi:10.1128/jcm.37.6.1771-1776.1999

[36] ALKHALIFA, S., JENNINGS, M. C., GRANATA, D., KLEIN, M., WUEST, W.M., MINBIOLE, K. P. C., CARNEVALE, V. Analysis of the Destabilization of Bacterial Membranes by Quaternary Ammonium Compounds: A Combined Experimental and Computational Study. *ChemBioChem*. 2020, **21**(10), 2 - 8. Dostupné z: doi:10.1002/cbic.201900698