

UNIVERZITA OBRANY
FAKULTA VOJENSKÉHO ZDRAVOTNICTVÍ

Doktorský studijní program:
Lékařská mikrobiologie



DISERTAČNÍ PRÁCE

**Název: Hodnocení antimikrobiálního účinku látek
typu kvartérních amoniových solí**

Zpracoval: Mgr. Michaela Hympánová

Školitel: PharmDr. Jan Marek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ 2023

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli PharmDr. Janu Markovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky v průběhu celého mého postgraduálního studia. Své konzultantce RNDr. Markétě Benkové, Ph.D. děkuji za uvedení do problematiky antimikrobiálního testování a seznámení s prací v mikrobiologické laboratoři. Dále bych ráda vyjádřila upřímné poděkování svým kolegům jak z Centra biomedicínského výzkumu FN HK, tak i z Katedry epidemiologie FVZ UO, za velmi příjemnou atmosféru na pracovišti i mimo něj. Taktéž děkuji Mgr. Anetě Markové, Ph.D. a Mgr. Natálii Živné, se kterými úzce spolupracujeme na výzkumných projektech, a bez jejichž práce by nevznikly nové chemické sloučeniny, které hrají hlavní roli v této disertační práci. Rovněž děkuji prof. Davidu Stoparovi, Ph.D. a jeho výzkumné skupině z Biotechnologické fakulty Univerzity v Lublani za odborné vedení během zahraniční stáže, která mi dala mnoho zkušeností a vědecky mě velmi posunula vpřed. V neposlední řadě bych ráda poděkovala M.Sc. Edgaru B. Montufarovi, Ph.D. z výzkumného Centra CEITEC za spolupráci v oblasti vývoje nových biokompatibilních materiálů s antimikrobiální aktivitou. Závěrečné poděkování patří mému partnerovi, rodině a přátelům za podporu nejen během mého studia.

Poděkování grantové podpoře

- Specifický vysokoškolský výzkum, MŠMT ČR (SV/FVZ201905) – projekt s názvem „MBEC assay: Modifikace metodiky pro vybrané bakteriální kmeny a jejich případnou kombinaci“ – hlavní řešitel, úspěšně dokončeno.
- Interní projekt FNHK 2021 – projekt s názvem „Model zubního biofilmu pro hodnocení účinků ústních dezinficiens“ – hlavní řešitel, úspěšně dokončeno.
- Agentura pro zdravotnický výzkum, MZ ČR (NV18-09-00181) – projekt s názvem „Vývoj polyvalentního dekontaminačního činidla“ – člen týmu, úspěšně dokončeno.
- Agentura pro zdravotnický výzkum, MZ ČR (NV 19-09-00198) – projekt s názvem „Vývoj nových látek na bázi kvartérních amoniových sloučenin proti mikrobiálním biofilmům ústní dutiny“ – člen týmu, úspěšně dokončeno.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury. Dále prohlašuji, že tato disertační práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 30.3.2023

Mgr. Michaela Hympánová

ABSTRAKT

Disertační práce se zabývá testováním antimikrobiální účinnosti nově připravených a referenčních látek typu kvartérních amoniových solí (KAS). Nové látky byly připraveny v rámci spolupráce s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany a Centrem biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové v rámci společných projektů.

V rámci disertační práce byla stanovena antimikrobiální účinnost na grampozitivních (G^+) i gramnegativních (G^-) bakteriích, v planktonní i biofilmové formě, na sbírkových kmenech i klinických izolátech. Základní screening antimikrobiální aktivity byl proveden pomocí mikrodiluční bujónové metody. Na modifikované metodice byl zároveň pozorován vliv použitého kultivačního média a počáteční bakteriální hustoty na stanovení. Pro podrobnější stanovení antimikrobiální aktivity byla úspěšně zavedena kvantitativní suspenzní zkouška, kde jsou lépe simulovány podmínky v běžné praxi. Antibiofilmová aktivita byla stanovena pomocí úspěšně zavedeného biofilmového modelu na bázi Calgary biofilm device. Podrobnější antibiofilmová aktivita byla stanovena na nově zavedených pokročilých modelech biofilmu. Zároveň byl v rámci testování na biofilmovém modelu *E. faecalis* prozkoumán potenciál KAS při kombinované léčbě s mechanickým laserovým působením.

Na základě získaných výsledků byl prokázán komplexní antibakteriální účinek testovaných KAS na G^+ i G^- kmenech, včetně vysoce infekčního kmene *F. tularensis*. V rámci sledování vlivu strukturních modifikací molekuly KAS na antimikrobiální aktivitu byla prokázána zásadní úloha délky alkylového řetězce v lipofilní části molekuly oproti modifikacím na polární hlavě KAS. Kromě délky alkylového řetězce byl sledován i vliv přidání druhého alkylového řetězce do struktury. Kromě účinnosti vůči planktonní formě bakterií byla podrobně zkoumána i antibiofilmová aktivita. Bylo zjištěno, že testované KAS vykazují obecně dobrý biofilmcidní účinek a při výhodné kombinaci s mechanickým laserovým působením lze docílit úplné eradikace bakterií i v biofilmové formě. Tento druh kombinovaného čištění by si mohl najít uplatnění především v zubním lékařství, kde by látky typu KAS mohly nahradit současně používané vysoce iritující dezinfekční agensy.

Výsledky disertační práce byly průběžně publikovány a nově připravené látky s nejvyšší účinností byly patentovány pro jejich případné budoucí komerční využití.

Klíčová slova: kvartérní amoniové soli; dezinfekce; antimikrobiální testování; biofilmové modely

ABSTRACT

This dissertation thesis deals with the antimicrobial susceptibility testing of newly prepared compounds based on quaternary ammonium salts (KAS) and their reference standards commonly used in practice. The new compounds were prepared in cooperation with the Department of Toxicology and Military Pharmacy of the Faculty of Military Health Sciences of the University of Defence and the Biomedical Research Centre at the University Hospital Hradec Králové as a part of joint projects.

The antimicrobial activity was established on gram-positive (G^+) and gram-negative (G^-) bacteria from type culture collections and clinical isolates, in planktonic and biofilm form. At first, the basic antimicrobial activity evaluation was performed by using the microdilution broth method. Additionally, the modified methodology was used to explore the influence of culture broth and initial bacterial density on evaluating the antimicrobial activity. Secondly, by using the quantitative suspension test, that better simulates normal practice conditions, has been successfully implemented at the department for the detailed antimicrobial activity evaluation. Thirdly, the biofilm model based on the Calgary Biofilm Device was successfully introduced and optimized for antibiofilm activity testing. Detailed antibiofilm activity was also evaluated by advanced biofilm models and the potential of combination treatment of selected compounds with laser irradiation was investigated on the *E. faecalis* biofilm model.

Complex antibacterial effect of tested compounds was observed on both G^+ and G^- strains, including the highly infectious *F. tularensis* strain. The influence of several structural modifications of the KAS molecule on antibacterial activity was examined, such as related to the alkyl chain length, the addition of a second alkyl chain and the modifications of the polar part of the molecule. In addition to the effectiveness against the planktonic form of bacteria, the antibiofilm activity was also investigated in detail. The tested KAS exhibited generally good antibiofilm activity and, moreover, the combination of KAS and laser treatment led to complete biofilm eradication. This kind of combined treatment could be advantageous, especially in dentistry, where agents based on KAS could replace the highly irritating disinfecting agents which are used nowadays.

Obtained results were continuously published and the most promising compounds have been patented for possible future commercial use.

Key words: quaternary ammonium salts; disinfection; antimicrobial evaluation; biofilm models

Obsah

1. ÚVOD.....	18
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	19
2.1. Kvartérní amoniové soli	19
2.1.1. Mechanismus účinku	20
2.1.2. Spektrum účinku	22
2.1.3. Využití v praxi	22
2.2. Materiály s antimikrobiální aktivitou.....	23
2.2.1. Dentální materiály.....	25
2.2.2. Ortopedické materiály	28
2.2.3. Krycí materiály	29
2.3. Bakteriální biofilm	30
2.3.1. Quorum sensing	31
3. CÍLE PRÁCE.....	35
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
4.1. Testované látky.....	37
4.2. Bakteriální kmeny	40
4.3. Kultivační média	41
4.4. Chemikálie.....	42
4.5. Postupy testování	42
4.5.1. Primární screening antibakteriální aktivity	42
4.5.2. Vliv média na stanovení MIC a MBC.....	43
4.5.3. Vliv bakteriální denzity na antimikrobní aktivitu KAS	44
4.5.4. Testování aktivity proti <i>F. tularensis</i>	44
4.5.5. Kvantitativní suspenzní zkouška ČSN EN 1276 (665202).....	45
4.5.6. Calgary biofilm device.....	47
4.5.7. Biofilmový model <i>E. faecalis</i>	48
4.5.8. Model biofilmu na biokompatibilním povrchu.....	50

5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	54
5.1.	Primární screening antibakteriální aktivity	54
5.1.1.	Vliv struktury na antibakteriální účinnost	54
5.2.	Vliv média na stanovení MIC a MBC u kmene <i>E. faecalis</i>	59
5.3.	Vliv bakteriální denzity na antimikrobní aktivitu KAS	60
5.4.	Testování aktivity proti <i>F. tularensis</i>	62
5.5.	Kvantitativní suspenzní zkouška	63
5.6.	Calgary biofilm device.....	65
5.7.	Biofilmový model <i>E. faecalis</i>	68
5.7.1.	Efekt KAS	68
5.7.2.	Kombinace KAS s Er:YAG laserem	70
5.8.	Model biofilmu na biokompatibilním povrchu	72
6.	ZÁVĚR.....	76
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	78
8.	SEZNAM PŘÍLOH.....	92

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AB	Alamar Blue
AHL	N-acylhomoserinové laktony
AI	autoinduktory
AIP	autoindukující peptidy
α -TCP	α -trikalciium fosfát
ART	atraumatické výplňové ošetření
BHI	Brain heart infusion broth (bujón z mozko-srdcové infuze)
C ₁₀	alkylový řetězec obsahující 10 uhlíků
C ₁₂	alkylový řetězec obsahující 12 uhlíků
C ₁₄	alkylový řetězec obsahující 14 uhlíků
C ₁₆	alkylový řetězec obsahující 16 uhlíků
C ₁₈	alkylový řetězec obsahující 18 uhlíků
Ca ²⁺	vápenaté kationty
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CBD	Calgary biofilm device
CBV FNHK	Centrum biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové
CDHA	kalcium-deficientní hydroxyapatit
Clog <i>P</i>	vypočítaný logaritmus rozdělovacího koeficientu
CLSM	konfokální mikroskopie
CMC	kritická micelární koncentrace
DDAB	didecyldimethylammonium bromid
DDMAI	2-dimethyl-2-dodecyl-1-methacryloxyethyl ammonium iodine
DMADDM	dimethylaminododecyl methacrylate
DMAE-CB	methacryloxyethyl cetyl ammonium chloride
DMSO	dimethylsulfoxid

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eDNA	extracelulární deoxyribonukleová kyselina
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EPS	extracelulární polymerní látky
ESBL	širokospektré β -laktamázy
ESCO	<i>Escherichia coli</i>
Eexp	expected combined effect (předpokládaný výsledek kombinované léčby)
Eobs	observed combined effect (pozorovaný výsledek kombinované léčby)
Eob	excess over Bliss (rozdíl mezi předpokládaným a pozorovaným výsledkem kombinované léčby)
FACS	fluorescent activated cell sorting (průtoková cytometrie)
G ⁻	gramnegativní
G ⁺	grampozitivní
HA	hydroxyapatit
HACC	hydroxypropyltrimethyl ammonium chlorid chitosanu
ICSD	Inorganic Crystal Structure Database
KAS	kvartérní amoniové soli
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KLPN -	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KLPN +	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produkující širokospektré β -laktamázy
LVS	live vaccine strain (živý vakcinační kmen)
Mg ²⁺	hořečnaté kationty
MDPB	12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MBEC	minimální biofilm eradikující koncentrace
MHA	Müller-Hinton agar

MHB	Müller-Hinton bujón
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MPC	2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine
MRSA	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NaOCl	chlornan sodný
O.D.	optická denzita
OHHL	N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserin lakton
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	fosfátový pufr
PMMA	polymethylmethakrylát
PMPC	poly-2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine
PS	plastový povrch (polystyren)
PSAE MR	multirezistentní <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
QADM	quaternary ammonium dimethacrylate
QAM	quaternary ammonium methacrylate
QAMA	quaternized ethylene glycol dimethacrylate piperazine octyl ammonium iodide
QAMP	quaternary ammonium methacrylate polymer
QQ	quorum quenching
QS	quorum sensing
QSI	quorum sensing inhibitory
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	rastrovací elektronový mikroskop
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SHA	spékaný hydroxyapatit
SSP	super short pulse (super krátký impulz)
STAU	<i>Staphylococcus aureus</i>
STEP	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

TPGDA	tripropylene glycol diacrylate
TSA	Trypton-sojový agar
TSB	Trypton-sojový bujón
VRE	vankomycin-rezistentní <i>Enterococcus faecium</i>
XRD	X-ray powder diffraction (rentgenová krystalografie)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Struktura kvartérních amoniových solí.....	20
Obrázek 2 - Mechanismus působení KAS na bakteriální buňku.....	21
Obrázek 3 - Způsob aplikace kvartérních amoniových solí.....	23
Obrázek 4 - Formování biofilmu.....	31
Obrázek 5 - Quorum sensing – AHL typ.....	32
Obrázek 6 - Quorum sensing – AIP typ.....	33
Obrázek 7 - Mechanismy QS inhibice.....	34
Obrázek 8 - Princip Alamar Blue stanovení.....	48
Obrázek 9 - Vliv délky alkylového řetězce na antibakteriální aktivitu KAS.....	55
Obrázek 10 - Vliv četnosti alkylového řetězce na antibakteriální aktivitu.....	57
Obrázek 11 - Vliv dalších substituentů na antibakteriální aktivitu.....	58
Obrázek 12 - Vliv media na stanovení MIC a MBC u <i>E. faecalis</i>	59
Obrázek 13 - Růstové křivky a vliv bakteriální hustoty na MBC.....	61
Obrázek 14 - Citlivost <i>F. tularensis</i> LVS k vybraným KAS.....	62
Obrázek 15 - Výsledky kvantitativní suspenzní zkoušky.....	64
Obrázek 16 - Biofilmový nárůst na Calgary biofilm device.....	65
Obrázek 17 - Stanovené hodnoty MBEC a MBC.....	67
Obrázek 18 - Efekt KAS na biofilmový model <i>E. faecalis</i>	69
Obrázek 19 - Efekt KAS a Er:YAG laseru na biofilmový model <i>E. faecalis</i>	71
Obrázek 20 - Mikrostruktura kalcium-fosfátových materiálů.....	72
Obrázek 21 - CLSM a SEM analýza biofilmu <i>S. mutans</i>	74
Obrázek 22 - Experimentální plán.....	77

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - KAS inkorporované do antimikrobiálních materiálů	24
Tabulka 2 - Quorum sensing systémy	32
Tabulka 3 - Nově syntetizované látky	38
Tabulka 4 - Referenční látky	39
Tabulka 5 - Bakteriální kmeny použité v rámci jednotlivých metodik	40
Tabulka 6 - Kultivační média	41
Tabulka 7 - Citlivost biofilmu k vybraným standardním dezinfekčním látkám	75

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 - Logistická rovnice populačního růstu	44
Rovnice 2 - Stanovení redukce bakteriálního nárůstu	46
Rovnice 3 - Výpočet redukce Alamar Blue	48
Rovnice 4 - Výpočet předpokládaného výsledku kombinované léčby	49

SEZNAM AUTORSKÝCH A SPOLUAUTORSKÝCH PUBLIKACÍ VZNIKLÝCH V RÁMCI DISERTAČNÍ PRÁCE

Hympanova, M., S. Terlep, A. Markova, L. Prchal, I. Dogša, L. Pulkrabkova, M. Benkova, J. Marek a D. Stopar. The Antibacterial Effects of New N-Alkylpyridinium Salts on Planktonic and Biofilm Bacteria. *Front. Microbiol.* **11**, 573951 (2020). doi:10.3389/fmicb.2020.573951.

IF₍₂₀₂₀₎ 5,64

Markova, A., **M. Hympanova**, M. Matula, L. Prchal, R. Sleha, M. Benkova, L. Pulkrabkova, O. Soukup, Z. Krocova, D. Jun a J. Marek. Synthesis and Decontamination Effect on Chemical and Biological Agents of Benzoxonium-Like Salts. *Toxics.* **9**, 222 (2021). doi:10.3390/toxics9090222.

IF₍₂₀₂₁₎ 4,15

Hympanova, M., C. Oliver-Urrutia, M. Vojta, M. Macháček, P. Krupka, R. Kukla, L. Celko, E.B. Montufar a J. Marek. Assessment of *Streptococcus mutans* biofilm formation on calcium phosphate ceramics: The role of crystalline composition and microstructure. *Biomater. Adv.* **135**, 212750 (2022). doi:10.1016/j.bioadv.2022.212750.

IF₍₂₀₂₂₎ 7,33

Terlep, S., **M. Hympanova**, I. Dogša, F. Pajk a D. Stopar. Photoacoustic removal of *E. faecalis* biofilms from titanium surface with an Er:YAG laser using Super Short Pulse, *LIMS.* **37 (1)**, (2021). doi:10.1007/s10103-021-03265-6.

IF₍₂₀₂₁₎ 3,16

Soukup, O., M. Benkova, R. Dolezal, R. Sleha, D. Malinak, S. Salajkova, A. Markova, **M. Hympanova**, L. Prchal, L. Ryskova, L. Hobzova, K. Sepčić, N. Gunge-Cimerman, J. Korabecny, D. Jun, V. Bostikova, P. Bostik a J. Marek. The wide-spectrum antimicrobial effect of novel N-alkyl monoquaternary ammonium salts and their mixtures; the QSAR study against bacteria. *Eur. J. Med. Chem.* **206**, 112584, (2020). doi:10.1016/j.ejmech.2020.112584.

IF₍₂₀₂₀₎ 6,51

Hympanova, M[#], Kučera T.[#], O. Benek, J. Korábečný a J. Marek. Searching for new antimicrobial agents by targeting bacterial nad metabolism: Evaluation of frentizole derivatives selected by molecular docking. *MMSL*. **89(2)**, (2020). doi:10.31482/mmsl.2020.005.

Recenzované neimpaktované periodikum indexováno v databázi Embase a Scopus.

sdílení prvoautoři

PUBLIKACE VZNIKLÉ NAD RÁMEC DISERTAČNÍ PRÁCE

Küppers, J., **M. Hympanova**, T. Keuler, A. Schneider, G. Schnakenburg a M. Gütschow. Transformation of the Carboxyl Group of an Amino Acid to Variously Substituted Imidazoles through a Davidson-Type Heterocyclization. *Synthesis*. **51(09)**, (2019).

IF₍₂₀₁₉₎ 2,68

PATENTOVÉ A UŽITNÉ VZORY JAKO VÝSTUPY DISERTAČNÍ PRÁCE

Jun D., O. Soukup, J. Marek, M. Matula, R. Sleha, A. Dlabková, D. Herman, **M. Hympanová**, A. Marková „Polyvalentní dekontaminační činidlo pro eliminaci účinků chemických a/nebo biologických látek a jeho použití“ evidované pod čj. MO 95413/2021-2994.

Soukup O., A. Marková, J. Marek, **M. Hympanová**. Kvartérní amoniová sůl, způsob její přípravy, dezinfekční kompozice a její použití. Patentová přihláška PV 2021-139 z 20. 3. 2021 (v řízení Úřadu průmyslového vlastnictví) FAKULTNÍ NEMOCNICE HRADEC KRÁLOVÉ

1. ÚVOD

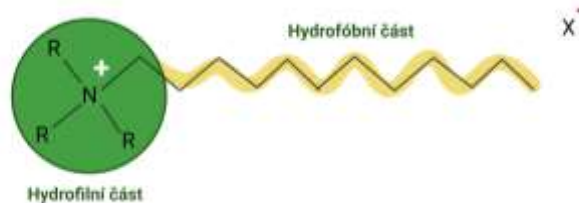
Nadužívání antimikrobních látek ve zdravotnictví, zemědělství a potravinářství nebo jejich nesprávná likvidace vede dlouhodobě k výraznému nárůstu antimikrobiální rezistence. To vyvolává nejen u odborníků, ale i u široké veřejnosti velké obavy, jelikož většina oblastí moderní medicíny by bez účinné antimikrobiální léčby nemohla nadále fungovat. Již nyní se odhaduje, že nejméně 700 000 lidí každoročně umírá na rezistentní infekce a pokud se tento problém nebude řešit, může se dle prognóz toto číslo do roku 2050 vyšplhat až na 10 milionů.¹ Tento celosvětový problém je třeba řešit hledáním nových antimikrobiálních látek, které významným způsobem zpomalují nebo úplně zastavují šíření nebezpečných nákaz. Jednu z možností popisuje i předložená disertační práce, ve které jsou popsány antimikrobní účinky nových látek na bázi kvartérních amoniových solí. Významnou součástí práce je rovněž zavedení a popis složitějších metodik testování látek mimo jiné na bakteriálním biofilmu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Kvartérní amoniové soli

Kvartérní amoniové soli (KAS) byly poprvé připraveny v roce 1890 Menschutkinem reakcí terciárních aminů s alkylovými halogenidy.² Jejich antimikrobiální potenciál byl poprvé prokázán v roce 1916 u hexamethylentetraaminu Jacobsem a jeho spolupracovníky.³ Z chemického hlediska se jedná o kationtové surfaktanty, které se skládají z jednoho kvartérního dusíku nesoucího jeden nebo více hydrofobních substituentů.⁴ Díky jejich širokospektrému antimikrobiálnímu účinku jsou často součástí v praxi běžně užívaných antiseptických a dezinfekčních přípravků.^{5,6}

Základní chemická struktura KAS je tvořená hydrofobní a hydrofilní částí (**obrázek 1**). Pro antimikrobiální aktivitu jsou důležité obě tyto části, kdy hydrofilní kladně nabitá část molekuly je schopná interagovat s polárním prostředím a je tak zodpovědná za rozpustnost ve vodě a schopnost navázat se na negativně nabitý povrch bakteriální stěny. Tato část molekuly je reprezentována kladně nabitým atomem dusíku, který může být inkorporovaný do aromatického kruhu nebo se může vyskytovat jako necyklický atom, který se kovalentně váže se čtyřmi atomy uhlíku, kde alespoň jeden substituent (R) je lipofilní *n*-alkylový řetězec s různým počtem uhlíků (nejčastěji C₈–C₁₈).^{7–11} Tento dlouhý alkylový řetězec reprezentuje hydrofobní část molekuly, která umožňuje penetrovat nepolární aglomeráty a ovlivňovat biologické struktury, jako např. membrány, receptory a lipidy.^{12,13} Aniontová část soli je nejčastěji zastoupena chloridem (Cl⁻) nebo bromidem (Br⁻).^{14,15} Na základě amfifilního charakteru, který je určen výše popisovanou strukturou, jsou KAS považovány za povrchově aktivní látky, neboli tenzidy či surfaktanty. Charakteristickou vlastností tenzidů je tvorba micel při překročení kritické micelární koncentrace (CMC), která je specifická pro každý tenzid.¹⁶ Ve vysoce koncentrovaném roztoku se v polárním rozpouštědle uspořádají molekuly tenzidu tak, že nepolární (hydrofobní) část vytvoří hydrofobní jádro obalené hydrofilním obalem. Tento termodynamicky stabilní sférický agregát stabilizovaný hydrofobními interakcemi podporuje rozpouštění hydrofobních komponent membrány (např. lipid A, fosfolipidy atd.).^{17,18} Zároveň mohou micely vytvářet příznivé mikroprostředí a sloužit tak jako katalyzátory akcelerující rozklad nežádoucích chemických látek. Z tohoto důvodu jsou využívány i jako aktivní složky dekontaminačních směsí.¹⁹



Obrázek 1 - Struktura kvartérních amoniových solí.

Hydrofilní část obsahuje kvartérní dusík (N^+) a krátké alkylové řetězce, nebo jiné hydrofilní substituenty (R). Žlutě je zobrazen dlouhý alkylový řetězec tvořící hydrofobní část. X^- představuje aniont. Obrázek byl vytvořen pomocí BioRender.com.

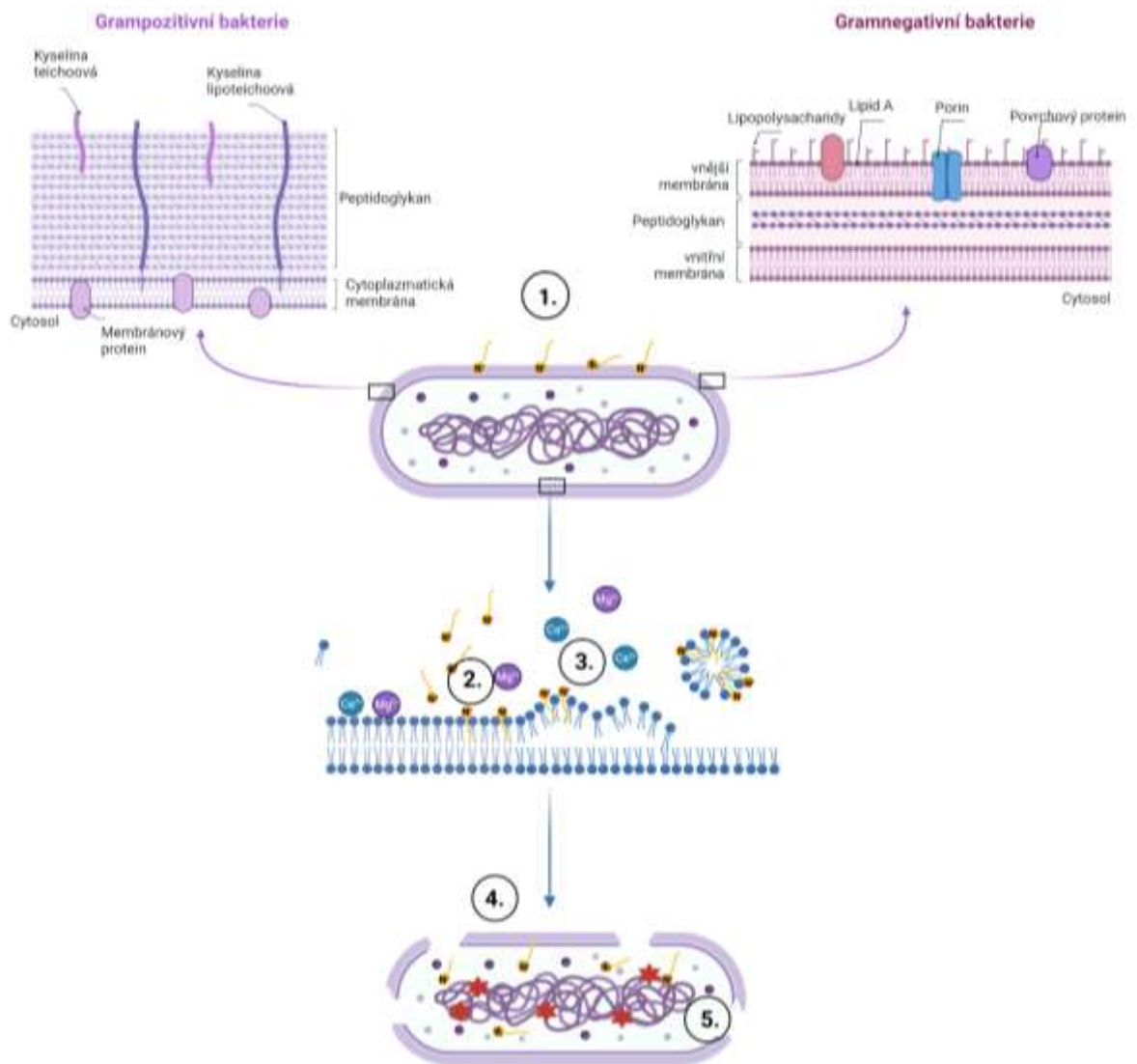
2.1.1. Mechanismus účinku

Biocidní účinek KAS je založen na narušení cytoplazmatické membrány, respektive fosfolipidové dvojvrstvy, a následném ovlivnění funkce jaderných kyselin, enzymů nebo receptorů. Finálním důsledkem tohoto procesu je řízená buněčná smrt prostřednictvím lytických enzymů.^{5,20}

Mechanismus účinku KAS je podrobně znázorněný na **obrázku 2**. Molekula KAS nejprve penetruje skrz bakteriální stěnu k cytoplazmatické membráně, kde se následně naváže pozitivně nabitý kvartérní dusík na hydrofilní část membránových fosfolipidů. Kladný náboj KAS tak zároveň nahradí vápenaté kationty (Ca^{2+}) na povrchu membrány, které za normální situace stabilizují společně s hořečnatými kationty (Mg^{2+}) negativně nabitý povrch bakteriálních membrán. Následně dochází k zanoření hydrofobního alkylového řetězce do hydrofobní fosfolipidové vrstvy mikroorganismu, což vede ke ztrátě fluidity a segmentaci membrány do shluků až po případné vytržení jednotlivých segmentů z této dvojvrstvy a difuzi do okolního prostředí.¹⁸ Membrána následně ztrácí osmoregulační schopnost, fyziologické funkce a dochází k úniku nízkomolekulárních molekul, jako např. ATP. U nižších koncentrací KAS byla taktéž pozorována intracelulární degradace proteinů a nukleových kyselin, která vede k narušení fyziologických funkcí a uvolnění autolytických enzymů způsobujících lýzi buněčné stěny. Finálně dochází ke kompletní ztrátě buněčné integrity.^{21,22}

Výše popsané specifické interakce ovlivňují selektivitu antimikrobiálního působení různých zástupců KAS.²³ Obecně jsou ke KAS méně citlivé G^- (gramnegativní) bakterie oproti G^+ (grampozitivním) bakteriím. Hlavním důvodem může být rozdíl ve složení buněčné stěny G^- a G^+ bakterií. Buněčná stěna G^+ bakterií obsahuje silnou vrstvu

peptidoglykanu, kyselinu teichoovou a menší množství fosfolipidů. Naproti tomu buněčná stěna G⁻ bakterií obsahuje tenčí vrstvu peptidoglykanu, neobsahuje kyselinu teichoovou a na povrchu je kryta vnější membránovou vrstvou s obsahem antigenů. Zvýšená odolnost G⁻ bakterií je tak pravděpodobně způsobena právě přítomností vnější fosfolipidové membrány, která poskytuje buňkám silnější fyzikálně-chemickou i mechanickou ochranu a znesnadňuje biocidním látkám průnik k cytoplazmatické membráně.^{24,25} Rozdílné složení bakteriální stěny a mechanismus působení KAS na bakteriální buňky jsou znázorněny na **obrázku 2**.



Obrázek 2 - Mechanismus působení KAS na bakteriální buňku

1. Kvartérní amoniová sůl (KAS) penetruje skrz bakteriální stěnu. 2. Kvartérní dusík se váže na fosfolipidy a nahrazuje hořečnaté a vápenaté kationty na povrchu membrány. Alkylový řetězec se zanoří mezi fosfolipidy. 3. Destabilizace a segmentace membrány až případné odtržení jednotlivých segmentů. 4. Ztráta osmoregulace, narušení fyziologických funkcí. 5. Intracelulární degradace proteinů a nukleových kyselin. Obrázek byl vytvořen pomocí BioRender.com.

2.1.2. Spektrum účinku

Jak již bylo naznačeno výše, KAS vykazují především antibakteriální aktivitu. Nicméně spektrum jejich účinku je mnohem širší. Byla potvrzena efektivita i vůči kvasinkám, vláknitým houbám, řasám, obaleným virům (jako je virus hepatitidy B a cytomegalovirus) a výjimečně vykazují i sporicidní účinek při vyšších koncentracích a teplotách.^{5,7,20,26} Zároveň byla prokázána biocidní aktivita nejen proti planktonním formám patogenních mikroorganismů ale i proti formě biofilmové, která dle studií vyazuje až 1000× vyšší rezistenci vůči antimikrobiálním látkám.^{27–31} V případě KAS a dalších antimikrobních látek pozoruje většina studií především parametry stanovující inhibici tvorby biofilmu namísto jeho eradikace. Např. byla prokázána biofilm-inhibiční aktivita běžně velmi často používané KAS, benzalkonia chloridu, u kmenů *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) a *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*).³² Biofilm eradikující efekt u derivátu KAS dále prokázal Maegan C. Jennings a spol. na kmenech *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*).²⁹ Dále byla pozorována i schopnost inhibovat tvorbu filament *Candida albicans* (*C. albicans*), které jsou klíčové v prvním stadiu tvorby kandidového biofilmu.³³ Schopnost KAS eradikovat biofilm a samotná biofilmová forma bakterií je podrobněji popsána níže.

2.1.3. Využití v praxi

KAS se díky svým výše zmíněným fyzikálně-chemickým vlastnostem a širokospektrému antimikrobiálnímu účinku používají v mnoha oblastech medicíny, průmyslu a zemědělství. Antimikrobiální účinek je využíván při implementaci do zubních výplní a past, ústních vod, očních kapek, hydratačních krémů, čisticích přípravků na obličej, opalovacích krémů, dezinfekčních prostředků na ruce, výplachů močového měchýře a pochvy, přísad do dezinfekčních koupelí, při purifikaci vody, zpracování potravin, ošetření bazénů, fontán, lodí a dřeva.^{30,34–39} Další skupina derivátů KAS si našla své uplatnění při léčbě bronchitidy a bronchiálního astmatu a jako svalové relaxans při křečích a v anesteziologii^{40–42}. Dále jsou KAS využívány jako katalyzátory fázového přenosu, separační činidla, extrakční činidla a fluorescenční sondy^{43,44}. Příklady běžných aplikací KAS jsou vyobrazeny na **obrázku 3**.



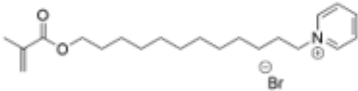
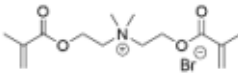
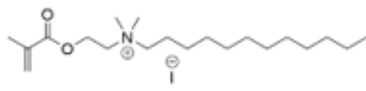
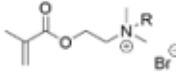
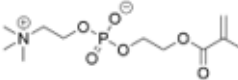
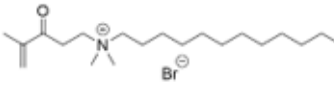
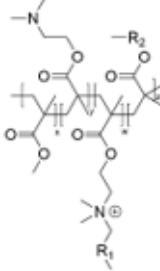
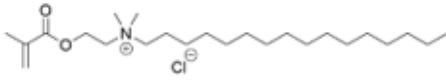
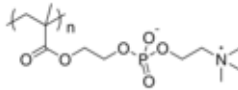
Obrázek 3 - Způsob aplikace kvartérních amoniových solí.

Obrázek byl vytvořen pomocí BioRender.com.


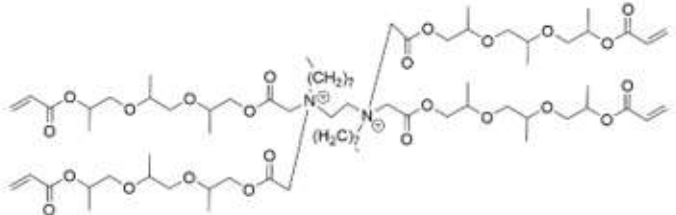
2.2. Materiály s antimikrobiální aktivitou

Vývoj materiálů zabraňujících iniciální bakteriální adhezi a následnou tvorbu biofilmu hrají významnou roli v prevenci a boji s perzistentními infekcemi. Účinnost antimikrobiálního povrchu může být založena buď na antiadhezivní aktivitě zabraňující iniciální přilnutí bakterií k povrchu, nebo na baktericidní aktivitě, kdy jsou mikroorganismy ničeny před nebo po kontaktu s daným povrchem. Největší potenciál mají antimikrobiální povrchy uplatňující obě tyto strategie zároveň. Ve vývoji těchto materiálů se kromě KAS uplatňují i jiné známé antimikrobiální látky, jako např. antimikrobiální peptidy, antibiotika nebo stříbrné nanočástice.⁴⁵ S ohledem na téma disertační práce budou blíže popsány pouze materiály obsahující KAS. Často se jedná o polymerní KAS se složitým systematickým názvem, u kterých se běžně využívají zkratky a polosystematické anglické názvy. Zkratky, názvy a struktury níže popsaných látek jsou uvedené v **tabulce 1**.

Tabulka 1 – KAS inkorporované do antimikrobiálních materiálů

Zkratka	Struktura Název
MDPB	 <p><u>12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide</u></p>
QADM	 <p><u>quaternary ammonium dimethacrylate</u></p>
DDMAI	 <p><u>(2-dimethyl-2-dodecyl-1-methacryloxyethyl ammonium iodine)</u></p>
QAM	 <p><u>quaternary ammonium methacrylate</u></p>
MPC	 <p><u>2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine</u></p>
DMADDM	 <p><u>dimethylaminododecyl methacrylate</u></p>
QAMP	 <p><u>quaternary ammonium methacrylate polymer</u></p>
DMAE-CB	 <p><u>methacryloxyethyl cetyl ammonium chloride</u></p>
PMPC	 <p><u>poly-2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine</u></p>

Pokračování tabulky 1 - KAS inkorporované do antimikrobiálních materiálů

Zkratka	Struktura Název
QAMA	 <u>quaternized ethylene glycol dimethacrylate piperazine octyl ammonium iodide</u>
TPGDA	 <u>tripropylene glycol diacrylate</u>

2.2.1. Dentální materiály

Jedním z nejběžnějších biofilmů je zubní plak, který se tvoří velmi rychle a často i při pečlivé ústní hygieně, zejména pak na špatně přístupných místech, např. v mezizubních prostorech. Zapříčiňuje následné onemocnění dásní a závěsného aparátu zubů (parodontopatie) a je rozhodujícím faktorem při tvorbě zubního kazu. Dalšími zubními onemocněními spojenými s lokální bakteriální infekcí jsou např. zánět v okolí kořene (tzv. váček) nebo odumření zubní dřeně (nervu), které vedou k často nezbytnému ošetření kořenových kanálků. V současné době lze většinu bakterií v kořenovém kanálku vyčistit mechanicky, nicméně tento postup zanechává často malé množství reziduálních bakterií ve špatně dostupných místech. Do těchto oblastí se obtížně zavádějí nástroje pro kořenové kanálky i výplachová tekutina. Proto není možné infekci kořenového kanálku zcela odstranit a reziduální bakterie se stávají hlavním rizikovým faktorem pro vznik pulpální infekce a periradikulární léze.^{46–50}

Základní zubní hygiena byla postupem času vylepšena dnes již běžným využíváním speciálních zubních kartáčků, nití a výplachů. Novějším přístupem, jak zamezit tvorbě zubního biofilmu je pak inkorporace antimikrobiálních látek, včetně polymerních a monomerních KAS, do dentálních materiálů popsanych níže. Na základě zkoumání finálního antimikrobiálního účinku, mechanických vlastností a biokompatibility se

inkorporace KAS setkává s obecně pozitivními výsledky, které byly detailně popsány v souhrnném článku Zhang a spol.⁵¹

Kompozitní pryskyřice

V současné době je nejrozšířenějším dentálním materiálem používaným k ošetření kazivých lézí kompozitní pryskyřice, a to zejména pro její vynikající estetické, nosné a plastické vlastnosti.^{52–54} Na druhou stranu mohou být miniaturní mezery na okrajích výplní snadno kolonizovány bakteriemi a potencovat tak vznik sekundárního zubního kazu.^{55–59} Mezi KAS inkorporované do kompozitních pryskyřic patří např.:

- MDPB (12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide)⁵⁹
- QADM (quaternary ammonium dimethacrylate)^{60,61}
- DDMAI (2-dimethyl-2-dodecyl-1-methacryloxyethyl ammonium iodine)⁶²
- QAM (quaternary ammonium methacrylate)⁶³
- MPC (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)⁶⁴

Pryskyřice obsahující výše uvedené KAS prokázaly ve všech případech antimikrobiální aktivitu bez významného ovlivnění mechanických vlastností.^{59–64}

Adhezivní systémy

Rizikovým místem pro bakteriální kolonizaci je také kavita, která se vyplňuje adhezivními systémy pro spojení zubní tkáně a pryskyřičné náhrady. Antimikrobiální působení adhezivních systémů ještě před jejich vytvrzením by snížilo riziko vzniku případné infekce. S tímto cílem byly připraveny adhezivní systémy obsahující následující KAS:

- QADM⁶⁵
- DMADDM (dimethylaminododecyl methacrylate)⁶⁶
- QAMP (quaternary ammonium methacrylate polymer)^{67,68}
- DMAE-CB (methacryloxyethyl cetyl ammonium chloride)^{69,70}
- benzalkoniumchlorid⁷¹

Adhezivní systémy obsahující výše uvedené KAS prokázaly ve všech případech antimikrobiální aktivitu, a zároveň došlo v některých případech k posílení síly spoje.^{65–71}

Polymethylmethakrylát

Dalším často používaným výplňovým materiálem je polymethylmetakrylát (PMMA).⁷² Ten bohužel snadno absorbuje vodu a potencuje tak bakteriální a plísňovou kolonizaci a následný výskyt zubního kazu, parodontózy a stomatitidy zubních náhrad.^{73,74} Proto byly připraveny i PMMA obsahující následující KAS, které dodaly akrylátové pryskyřici antimikrobiální aktivitu:

- PMPC (poly-2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)⁷⁵
- KAS (Poly 202063A)^{76,77}

Skloionomerní cement

Při inovativním atraumatickém výplňovém ošetření (ART) se využívá skloionomerního cementu, který je tvořen směsí portlandského cementu a modifikovaného cementu se solí polykarboxylové kyseliny a integruje tak výhody obou materiálů. V klinické praxi vykazuje dobrou biokompatibilitu, schopnost postupného uvolňování fluoridů a pomocné mineralizace.⁷⁸⁻⁸² V rámci ART je však obtížné odstranit bakterie a snadno tak může dojít k tvorbě sekundárního kazu.^{83,84} Proto se i do skloionomerního cementu začaly přidávat tyto KAS:

- benzalkoniumchlorid⁸⁵
- cetylpyridiniumchlorid⁸⁵
- cetrimid^{86,87}

Skloionomerní cementy obsahující výše uvedené KAS prokázaly ve všech případech antimikrobiální aktivitu bez významného ovlivnění uvolňování fluoridů. Benzalkoniumchlorid a cetylpyridiniumchlorid zároveň neovlivnily mechanické vlastnosti cementu. Pouze u cetrimidu se prokázal pokles mechanické odolnosti.

2.2.2. Ortopedické materiály

I přes přísné sterilizační a aseptické postupy zůstávají infekce spojené s biomedicínským materiálem v ortopedii kritickým problémem. Incidence periprotetické infekce je 0,5–5 % v závislosti na místě operace a provedeném zákroku.⁸⁸ Proto jsou i v ortopedii velmi žádoucí antimikrobiálně aktivní biomedicínské materiály, které by zabránily potenciálním infekcím a sloužily jako lokální systémy pro podávání antimikrobiálních látek k léčbě hlubokých kostních infekcí. V současné době je možné využívat kostní cementy obsahující antibiotika, která se řízeně uvolňují a slouží pro prevenci infekcí po totální náhradě kloubu a pro léčbu osteomyelitidy.⁸⁹ Nedegradabilní kostní cementy a spacery z PMMA naložené antibiotiky mohou uvolňovat léčiva z cementu v průběhu času s vysokou počáteční rychlostí uvolňování a následným konstantním uvolňováním. Nicméně jejich použití je spojeno také s nevýhodami, jako je nepředvídatelná dlouhodobá účinnost, riziko vzniku antibiotické rezistence a lokální tkáňová toxicita.

Kostní cementy

Několik publikací potvrzuje, že použití KAS poskytuje kostním cementům stabilní a trvalé antimikrobiální vlastnosti. Do kostních cementů byly inkorporovány následující KAS:

- QAMA (quaternized ethylene glycol dimethacrylate piperazine octyl ammonium iodide)⁹⁰
- QADM⁹¹
- TPGDA (tripropylene glycol diacrylate)⁹²
- HACC (hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan)^{93,94}
- nanočástice derivátů kvartérního chitosanu^{95,96}

Tyto modifikované kostní cementy prokázaly širokospektrou antimikrobiální aktivitu proti G⁺ i G⁻ bakteriím a zároveň nepůsobily cytotoxicky na okolní tkáň a nezapříčinily změnu mechanických vlastností cementu. V případě HACC byla pozorována dokonce i lepší osteogenní aktivita oproti PMMA s gentamycinem.

Titanové implantáty

HACC je možné také imobilizovat na povrchu titanových implantátů. Tento materiál prokázal schopnost zabránit uchycení bakterií na povrch, tím snížil vznik infekce a byl dobře integrován s okolní kostí.⁹⁷

2.2.3. Krycí materiály

Léčba ran je důležitou součástí zdravotní péče a případné uchycení a množení bakterií na šicích a obvazových materiálech je významným rizikovým faktorem pro rozvoj infekce rány.⁹⁸ Aby se zabránilo těmto infekcím a zajistilo se optimální prostředí pro regeneraci tkání, jsou předmětem intenzivního výzkumu i antibakteriální úpravy obvazových materiálů.^{99,100}

Obvazy

Při inkorporaci KAS bylo dosaženo nejlepších výsledků u polymerních látek, jako např. u akryloyloxyethyltrimethylammonium chloridu, který byl inkorporován do biokompatibilních keratinových vláken pro lékařské aplikace. Modifikovaná vlákna vykazovala antimikrobiální aktivitu a zároveň výrazně lepší schopnost odvádět vlhkost.¹⁰¹ V dalším případě byly stehy a zubní nitě potaženy derivátem octadecanaminia, což dodalo materiálu antibakteriální aktivitu proti parodontálnímu patogenu *Porphyromonas gingivalis* a endodontickému patogenu *E. faecalis*.¹⁰² Dále Kang a spol. zaznamenali zlepšenou antibakteriální účinnost u antimikrobiálních bavlněných vláken, která byla ošetřena glycidyltrimethylammonium-chloridem a stříbrnými nanočásticemi.¹⁰³ Inkorporace KAS do polyuretanového obvazu na rány vedla k inhibici tvorby bakteriálního biofilmu v ráně a obvazu.^{104,105} Modifikované antibakteriální obvazy současně vykazují všeobecně dobrou biokompatibilitu pro fibroblasty a epidermální keratinocyty a mají vynikající propustnost pro vodní páru, což zabraňuje hromadění exsudátů a snižuje povrchový zánět v oblasti rány.

Hydrogely

Jako obvazy na rány lze také využít hydrogely na bázi syntetických nebo přírodních polymerů. Ty jsou biokompatibilní, málo imunogenní, za fyziologických podmínek rychle hydrolyzují a lze je také využít k lokálnímu dodání bioaktivních látek.¹⁰⁶ Pilakasiri a spol. zjistili, že modifikované chitinové gely na bázi KAS jsou slibnými kandidáty pro léčbu

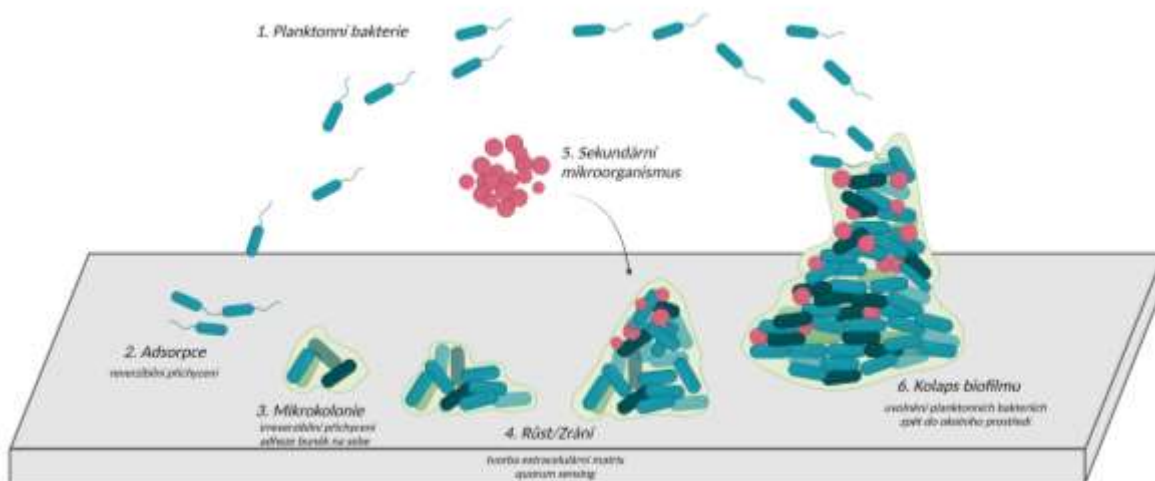
celoplošných otevřených ran, přičemž hojení ran probíhalo lépe než u klinicky dostupného obvazu.¹⁰⁷ I želatinový hydrogel obsahující KAS prokázal antibakteriální vlastnosti proti G⁺ i G⁻ bakteriím, včetně *S. aureus*, *E. coli* a *Bacillus subtilis*.¹⁰⁸ Kromě širokospektrální antimikrobiální aktivity vykazovaly gely rychlou degradaci při pokojové teplotě (4–6 dní). To je činí slibnými pro využití v implantabilních biomateriálech pro hojení ran.

2.3. Bakteriální biofilm

Biofilm lze obecně definovat jako přisedlé společenstvo mikroorganismů, jehož buňky jsou nevratně přichyceny k povrchu nebo jedna k druhé a vytvářejí kolem sebe extracelulární polymerní matrix. Nejlépe se tvoří na hydrofobních pórovitých plochách ve vlhkém prostředí s dostatečným množstvím živin.¹⁰⁹ Tyto bakterie zároveň vykazují odlišný fenotyp s ohledem na rychlost růstu a transkripci genů. Existence bakterií i jiných mikroorganismů v biofilmu je pro ně výhodná především díky větší ochraně před chemickým i fyzikálním působením.

V první fázi dochází k reverzibilnímu přisednutí jednotlivých bakterií k povrchu, ze kterého se ale mohou jednoduše uvolnit zpět do okolí. Míra adheze je závislá především na typu bakteriálního pohybu (pasivní transport tekutinou nebo aktivní transport za pomoci bičíků), zeta potenciálu, míře produkce extracelulárních polymerů, van der Waalsových a elektrostatických silách. Adheziny nejprve specificky vážou mono i oligosacharidy a vytváří tak nejprve bakteriální monovrstvu, která postupným dělením nabývá 3D struktury a následná maturace vede ke vzniku tzv. „zralého“ biofilmu. Za adhezi jsou zodpovědné především skupiny povrchových proteinů. První povrchový protein asociovaný s biofilmovou formací – Bap, byl odhalen u kmene *S. aureus*, způsobujícího mastitidu krav, a dalších stafylokoků. Homology Bap (BapA, Esp či LapA) byly nalezeny u jiných kmenů s výjimkou lidských typů *S. aureus*.¹⁰⁹ Během maturace biofilmu dochází následně k aktivaci specifických genů, které zodpovídají za zástavu tvorby bičíků či za vznik polysacharidové matrix. Polysacharidová matrix se skládá ze směsi extracelulárních polymerních látek (EPS), které zajišťují soudržnost biofilmu. EPS obsahuje neutrální a anionické polysacharidy, které se sdružují s dvojmocnými ionty a vytváří tak polymerní vlákna. Dále se zde nachází stavební a enzymatické proteiny a extracelulární deoxyribonukleová kyselina (eDNA), která vytváří mřížkovitou strukturu, usnadňuje přenášení elektronů a zároveň stabilizuje biofilmovou strukturu.¹¹⁰ Na základě tlaku cirkulující vody a produkce látek podporujících degradaci nebo odumírání bakterií

v biofilmu může následně docházet k disperzi biofilmu a uvolnění části planktonních bakterií do okolí. Jednotlivá stádia tvorby biofilmu jsou zobrazena a popsána na **obrázku 4**. Bakterie v různých hloubkách biofilmu mění svou genovou expresi na základě gradientu kyslíku a výživy. Ve spodních vrstvách biofilmu se tedy nachází především buňky v klidovém stavu, a naopak na povrchu jsou především aktivně dělící se bakterie.



Obrázek 4 - Formování biofilmu

Obrázek byl vytvořen pomocí BioRender.com.

2.3.1. Quorum sensing

Mezibakteriální komunikace, která reguluje tvorbu biofilmu, se nazývá quorum sensing (QS). Objev komunikace mezi jednotlivými buňkami bakterií byl poprvé zaznamenán u bakterie *Vibrio fischeri*. Jednalo se o důležitý vědecký poznatek, jelikož komunikace byla do té doby považována za výhradu pouze vyšších organismů.¹¹¹

Základem QS jsou specifické signální molekuly, tzv. autoinduktory (AI), a jejich odpovídající receptory. V prvotních fázích vzniku biofilmu se navyšuje množství bakterií v okolí a zároveň se tak zvyšuje koncentrace AI. Při dosažení prahové koncentrace se AI naváží na receptor, který indukuje expresi genů specifických pro biofilm a zajišťujících určité fyziologické aktivity biofilmu (např. bioluminiscenci, virulenci, symbiózu, pohyblivost). Jednotlivé bakteriální druhy mají své vlastní specifické AI, na základě kterých byly prozatím odhaleny čtyři hlavní QS systémy (**tabulka 2**).¹¹²

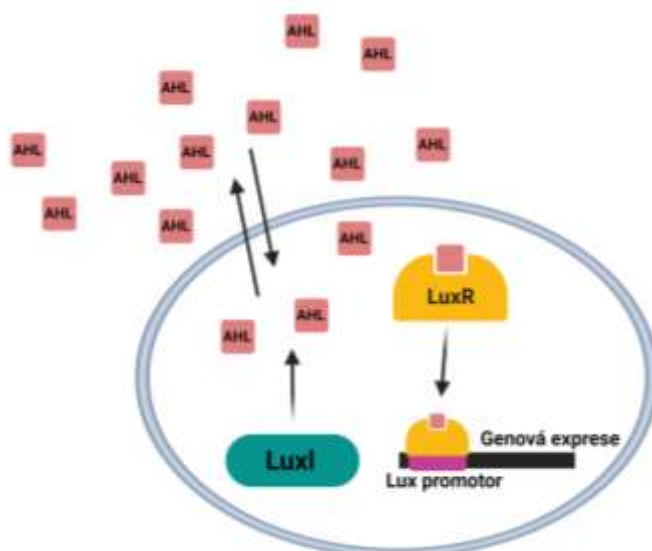
Tabulka 2 - Quorum sensing systémy

Quorum sensing systém	Signální molekula	Výskyt
AHL	N-acylhomoserinové laktony	G ⁻
AIP	autoindukující peptidy	G ⁺
AI-2	furanosylborátové diestery, jejichž prekurzorem je 4,5-dihydroxypentan-2,3-dion	G ⁺ i G ⁻
AI-3	pyretroidy	G ⁺ i G ⁻

* grampozitivní bakterie (G⁺), gramnegativní bakterie (G⁻)

QS regulace tvorby biofilmu u G⁻ bakterií

U většiny G⁻ bakterií je tvorba biofilmu regulována především QS systémem AHL se signální molekulou reprezentovanou N-acylhomoserinovými laktony. Tento systém byl poprvé objeven u bakterie *Vibrio fischeri*.¹¹³ U této bakterie je signální molekula N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserin laktón (OHHL) biosyntetizována AI syntetázou LuxL a následně difunduje ven z bakteriální buňky. Při překročení kritické bakteriální hustoty v okolí se OHHL váže na receptor LuxR, který aktivuje expresi genů spojených s tvorbou biofilmu. Na **obrázku 5** je schematické znázornění QS-AHL typického pro G⁻ bakterie.¹¹⁴



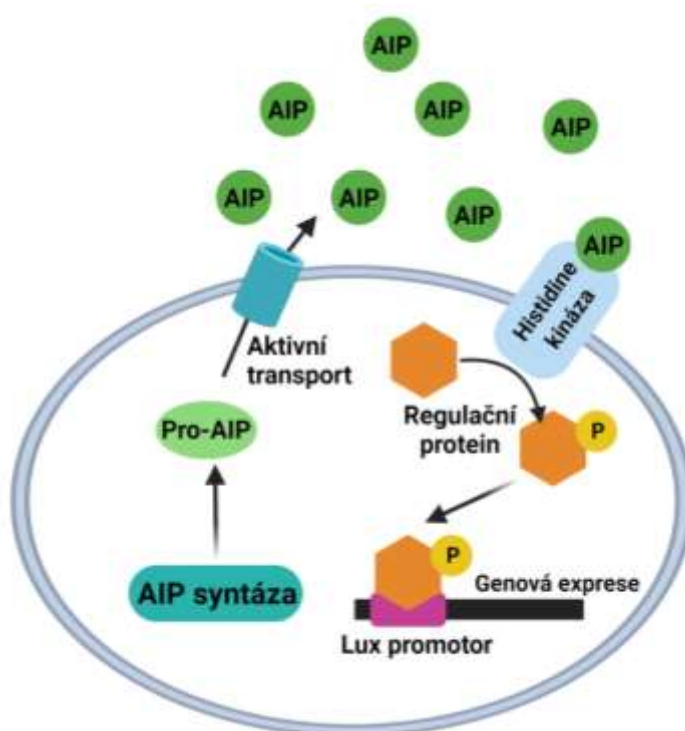
Obrázek 5 - Quorum sensing – AHL typ

N-acylhomoserinové laktony (AHL) představující u G⁻ bakterií signální molekulu pro QS regulaci.

Obrázek byl vytvořen pomocí BioRender.com.

QS regulace tvorby biofilmu u G⁺ bakterií

Pro G⁺ bakterie je typickým regulačním systémem tvorby biofilmu systém AIP. Bakterie produkují ve svých buňkách malý oligopeptid, který je modifikací zpracován na zralý AIP, a poté je transportován mimo buňku. Když koncentrace AIP dosáhne prahové hodnoty, naváže se na extracelulární segment histidinkinázy, který je reprezentován transmembránovým receptorem na buněčné membráně a zprostředkovává aktivaci kinázy, která následně fosforyluje další faktory regulující expresi genů souvisejících s tvorbou biofilmu. Na **obrázku 6** je schematické znázornění QS-AIP typického pro G⁺ bakterie.¹¹⁵



Obrázek 6 - Quorum sensing – AIP typ

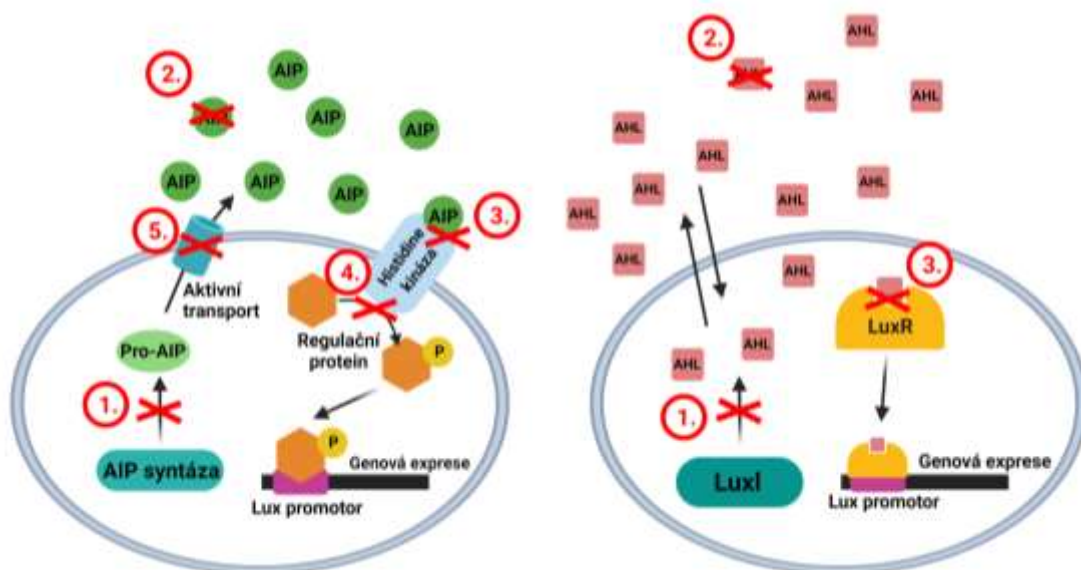
Autoindukující peptidy (AIP) představující u G⁺ bakterií signální molekulu pro QS regulaci. Pro-AIP je prekurzor zralého AIP. Obrázek byl vytvořen pomocí BioRender.com.

Kontrola biofilmu pomocí inhibice QS

V posledních 20 letech se začal výzkum zaměřovat na vývoj QS inhibitorů (QSI) a tzv. quorum quenching (QQ) enzymů s cílem zabránit tvorbě této odolnější formy bakterií. Dle místa a mechanismu inhibice QS lze dělit QSI i QQ enzymy na 3 kategorie:

- inhibice AI signálních molekul
- inhibice receptorů signálních molekul
- inhibice enzymů v rámci signální kaskády.

Jednotlivá místa působení inhibice QS jsou schematicky znázorněna na **obrázku 7**. Pokles tvorby biofilmu jako následek flavonoidy indukované inaktivace receptorů LasR byl pozorován např. u *P. aeruginosa*.¹¹⁶



Obrázek 7 - Mechanismy QS inhibice

1. Inhibice syntézy AI. 2. Enzymatická degradace nebo inaktivace AI. 3. Blokáce AI receptoru. 4. Narušení signální kaskády přes „response regulator“. 5. Inhibice efluxu AI – snížení koncentrace AI v okolí a následné mezibuněčné signalizace. Autoindukující peptidy (AIP) představují u G⁺ bakterií signální molekulu pro QS regulaci. Pro-AIP je prekurzor zralého AIP. N-acylhomoserinové laktony (AHL) představují u G⁻ bakterií signální molekulu pro QS regulaci. Obrázek byl vytvořen pomocí BioRender.com.

3. CÍLE PRÁCE

1) *In vitro* testování vybraných skupin nově připravených KAS a porovnání s referenčními látkami

– testování antibakteriální účinnosti na nozokomiálních bakteriálních kmenech v planktonní formě.

– sledování vlivu strukturní modifikace KAS na antimikrobiální účinnost.

2) Testování vybraných KAS proti *F. tularensis* jako modelové biologické agens pomocí průtokové cytometrie.

3) Zavedení a optimalizace kvantitativní suspenzní zkoušky dle ČSN EN 1276 (665202) s využitím sbírkových kmenů pro testování antibakteriální účinnosti nejnadějnějších látek.

4) Zavedení a optimalizace metodiky testování účinnosti proti biofilmové formě bakterií (Calgary biofilm device metodika, její obměny a pokročilé biofilmové modely).

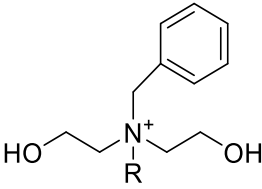
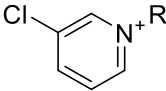
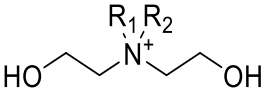
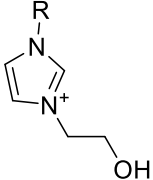
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Testované látky

V období studia bylo připraveno a otestováno více než 80 nových látek typu kvartérních amoniových solí. Látky byly připraveny v rámci spolupráce s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany a Centrem biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové (CBV FNHK). Na základě výsledků primárního screeningu antimikrobiální aktivity (stanovení minimální inhibiční a baktericidní koncentrace) byly pro tuto disertační práci vybrány 4 strukturální řady, které prokázaly nejvyšší antimikrobiální účinnost. Zástupci těchto chemických skupin podstoupili podrobnější stanovení antimikrobiální aktivity, jehož výsledky jsou v rámci disertační práce uvedeny a komentovány. První číslice označení testovaných látek udává číslo strukturální řady (**1-4**) a označení **a-f** udává délku alkylového řetězce, kdy **a** představuje alkylový řetězec obsahující 8 uhlíků, **b** 10 uhlíků, **c** 12 uhlíků, **d** 14 uhlíků, **e** 16 uhlíků a **f** 18 uhlíků.

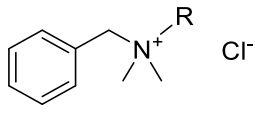
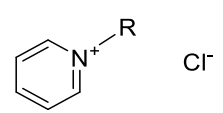
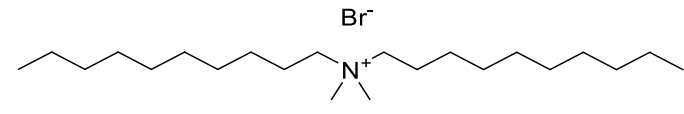
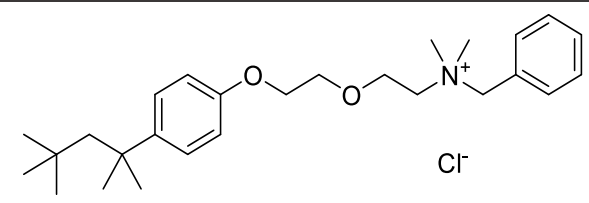
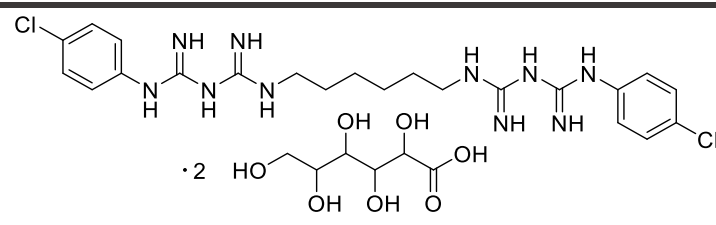
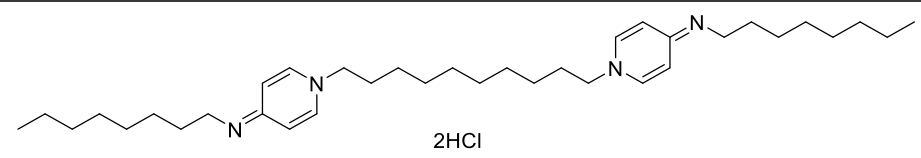
Jako referenční látky byly připraveny 3 standardně používané benzalkoniové soli (v textu označeny **S1c**, **S1d**, **S1e**), které jsou obsaženy jako směs hlavních aktivních látek v komerčním dezinfekčním přípravku Ajatin a 3 standardně používané pyridiniové soli (v textu označeny **S2c**, **S2d**, **S2e**). Další referenční látky běžně používané v praxi byly zakoupeny od dodavatele Sigma – Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Seznam nově připravených látek zahrnutých v této disertační práci spolu s jejich označením a strukturami je uveden v **tabulce 3**, referenční látky pak v **tabulce 4**. Připravené látky byly charakterizovány pomocí nukleární magnetické rezonance a hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením. Lipofilita látek je vyjádřena vypočítaným logaritmem rozdělovacího koeficientu ($\log P$). Výpočty prováděl PharmDr. Lukáš Prchal, Ph.D. z CBV FNHK pomocí softwaru MarvinSketch (v14.9.8.0). Syntéza a biologická testování některých látek uvedených v disertační práci byla již publikována v zahraničních odborných periodikách.^{27,28,117} Příprava referenčních látek série **S1** byla popsána v publikaci Kuči a kol.¹¹⁸ a příprava referenčních látek série **S2** byla popsána v publikaci Marka a kol.¹¹⁹

Tabulka 3 - Nově syntetizované látky

Označení	R	Struktura	Clog P
1b	C ₁₀ H ₂₁		-1,91
1c	C ₁₂ H ₂₅		-1,02
1d	C ₁₄ H ₂₉		-0,13
1e	C ₁₆ H ₃₃		0,76
1f	C ₁₈ H ₃₇		1,65
2b	C ₁₀ H ₂₁		
2c	C ₁₂ H ₂₅	2,30	
2d	C ₁₄ H ₂₉	3,19	
2e	C ₁₆ H ₃₃	4,08	
2f	C ₁₈ H ₃₇	4,96	
3ab	C ₈ H ₁₇ , C ₁₀ H ₂₁		
3ac	C ₈ H ₁₇ , C ₁₂ H ₂₅		3,52
3bc	C ₁₀ H ₂₁ , C ₁₂ H ₂₅		1,74
3bb	C ₁₀ H ₂₁ , C ₁₀ H ₂₁		4,41
3cc	C ₁₂ H ₂₅ , C ₁₂ H ₂₅		2,63
4c	C ₁₂ H ₂₅		
4d	C ₁₄ H ₂₉	1,61	
4e	C ₁₆ H ₃₃	2,50	

* Clog P je vypočítaný logaritmus rozdělovacího koeficientu

Tabulka 4 - Referenční látky

Ozn.	R	Struktura	Clog P
S1c	C ₁₂ H ₂₅	 benzalkonium chlorid	2,6
S1d	C ₁₄ H ₂₉		3,52
S1e	C ₁₆ H ₃₃		4,41
S2c	C ₁₂ H ₂₅	 alkylpyridinium chlorid	1,69
S2d	C ₁₄ H ₂₉		2,58
S2e	C ₁₆ H ₃₃		3,47
S3bb		 didecyldimethylammonium bromid (DDAB)	4,01
S4		 benzethonium chlorid	2,37
S5		 chlorhexidin diglkonát	3,63
S6		 2HCl oktenidin dihydrochlorid	10,96

* Clog P je vypočítaný logaritmus rozdělovacího koeficientu

4.2. Bakteriální kmeny

Seznam bakteriálních kmenů, jejich označení, informace o původu a doplňující informace jsou uvedeny v **tabulce 5** níže. Všechny kmeny byly zamraženy v ITEST kryozkumavkách (ITEST plus s.r.o., Hradec Králové, Česká republika) a uchovávány při teplotě -70 °C. Před testováním byly kmeny rozmrazeny a kultivovány na sekundární kulturu.

Set bakteriálních kmenů pro testování antibakteriální účinnosti mikrodiluční bujónovou metodou a Calgary biofilm device (CBD) metodikou byl vybrán a izolován na základě spolupráce s FNHK. Izolace, identifikace a antibiotická citlivost byla stanovena v rámci rutinní laboratorní diagnostiky na Ústavu klinické mikrobiologie FNHK. Všechny kmeny se řadí mezi tzv. nozokomiální patogeny. Set bakteriálních kmenů pro kvantitativní zkoušku v suspenzi byl zvolen dle protokolu ČSN EN 1276. Pro pokročilé biofilmové modely byly vybrány bakteriální kmeny spojené s tvorbou orálního biofilmu.

Tabulka 5 - Bakteriální kmeny použité v rámci jednotlivých metodik

Metodika	Bakteriální kmen	Označení (zkratka)	Zdroj, zdrojové označení	ATB rezistence
Mikrodiluční bujónová metoda, Calgary biofilm device	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i> , STAU	Klinický izolát FNHK C1947	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> ESCO	Klinický izolát FNHK A1235	
Mikrodiluční bujónová metoda	<i>Staphylococcus aureus</i>	MRSA	Klinický izolát FNHK C1926	metilicilin
	<i>Streptococcus epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i> STEP	Klinický izolát FNHK C1936	
	<i>Enterococcus faecium</i>	VRE	Klinický izolát FNHK S2484	vankomycin
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> KLPN ESBL -	Klinický izolát FNHK C1950	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> KLPN ESBL +	Klinický izolát FNHK C1934	ESBL +
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> MR PSAE MR	Klinický izolát FNHK A1245	MR
Mikrodiluční bujónová metoda, Calgary biofilm device, Biofilmový model <i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>S. mutans</i>	Klinický izolát FNHK	

* ESBL+ (kmen produkující širokospektré β -laktamázy), MR (multirezistentní)

Pokračování tabulky 5 - Bakteriální kmeny použité v rámci jednotlivých metodik

Metodika	Bakteriální kmen	Označení (zkratka)	Zdroj, zdrojové označení	ATB rezistence
Mikrodiluční bujónová metoda, Biofilmový model <i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	SymbioGruppe GmbH & Co KG SymbioPharm GmbH)	
Průtoková cytometrie – fluorescent activated cell sorting (FACS)	<i>Francisella tularensis</i> (živý vakcinační kmen)	<i>F. tularensis</i> LVS	Sbírka FVZ UNOB	
Kvantitativní zkouška v suspenzi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	<i>P. aeruginosa</i> 15442	Česká sbírka mikroorganismů, CCM 7930	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>S. aureus</i> 6538	Česká sbírka mikroorganismů, CCM 4516	

4.3. Kultivační média

Média a agary použité v rámci metodik jsou uvedeny v **tabulce 6**. Všechna média byla připravena dle pokynů výrobce a sterilizována v autoklávu 20 minut při 121 °C.

Tabulka 6 - Kultivační média

Metodika	Medium	Zkratka	Zdroj
Mikrodiluční bujónová metoda, Calgary biofilm device	Müeller-Hinton bujón M391	MHB	HiMedia - CADERSKY-ENVITEK, Brno, Česká republika
Kultivace kmenů	Müeller-Hinton agar M173	MHA	
	Trypton-sojový bujón M011	TSB	HiMedia - CADERSKY-ENVITEK, Brno, Česká republika
	Trypton-sojový agar M290	TSA	

Pokračování tabulky 6 - Kultivační média

Metodika	Medium	Zkratka	Zdroj
Mikrodiluční bujónová metoda, Calgary biofilm device, Model zubního biofilmu, Biofilmový model <i>E. faecalis</i>	Bujón z mozko-srdcové infuze M210I	BHI	HiMedia - CADERSKY-ENVITEK, Brno, Česká republika
Kultivace LVS	McLeod agar		HiMedia - CADERSKY-ENVITEK, Brno, Česká republika

4.4. Chemikálie

Zásobní roztoky testovaných látek byly připraveny v dimethylsulfoxidu (DMSO; DMSO for molecular biology $\geq 99,9\%$; Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic). V rámci fluorescenčního značení byl využit LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit L7012 (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, United States). Při rastrovací elektronové mikroskopii (SEM) byly vzorky fixovány glutaraldehydem (Grade I.; Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) a oxidem osmičelým (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic). Metabolická aktivita biofilmu byla stanovena pomocí Alamar Blue (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, United States).

4.5. Postupy testování

4.5.1. Primární screening antibakteriální aktivity

Mikrodiluční bujónová metoda byla zavedena dle CLSI standardu M07Ed11.¹²⁰ Účinnost látek byla testována ve dvojkové koncentrační řadě na 11 koncentrací v rozmezí 500 – 0,49 $\mu\text{mol/l}$. U látek s nižší rozpustností byla koncentrační řada posunuta dle limitu rozpustnosti (250 – 0,25 $\mu\text{mol/l}$; 125 – 0,12 $\mu\text{mol/l}$; 62,5 – 0,06 $\mu\text{mol/l}$; 31,25 – 0,03 $\mu\text{mol/l}$). Minimální inhibiční (MIC; po 24 a 48hodinové expozici látkám) a baktericidní (MBC; po 24hodinové expozici látkám) koncentrace byly stanoveny na osmi bakteriálních kmenech – čtyřech G^+ (*S. aureus*, MRSA, *S. epidermidis*, VRE) a čtyřech G^- (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae* ESBL +, *P. aeruginosa* MR). Zásobní roztoky testovaných látek byly připraveny rozpuštěním v DMSO (dimethylsulfoxid) v koncentraci 100x vyšší než první testovaná koncentrace. 40 μl zásobního roztoku testované látky

bylo asepticky napipetováno do sterilní zkumavky obsahující 3,96 ml Müller-Hinton bujónu (MHB). Finální koncentrace DMSO odpovídala vždy 1 %. Finální roztok byl promíchán a zkontrolován, zda nedošlo k vysrážení testované látky. Pokud ano, tak za první testovanou koncentraci byla považována nižší koncentrace (dle dvojkového ředění), kde látka nebyla vysrážena. Ředění probíhalo následujícím postupem, kdy byla připravena dvojková ředící řada v 96jamkové mikrotitrační destičce. 200 µl roztoku testovaných látek bylo asepticky přeneseno do všech prvních jamek mikrotitrační destičky. Do druhých a třetích jamek bylo přeneseno 100 µl roztoku. 100 µl MHB s 1 % DMSO bylo asepticky napipetováno do 2.–11. jamky všech řádků mikrotitrační destičky. Do poslední 12. jamky bylo napipetováno 200 µl (pozitivní kontroly růstu bakteriálních kmenů bez testované látky). Obsah druhých a třetích jamek byl řádně promíchán. Z 3. jamek bylo přeneseno 100 µl do 4. jamek a obsah byl opět řádně promíchán. Následně bylo opět přeneseno 100 µl z 4. jamek do 5. jamek, promícháno a tímto způsobem se postupovalo až k 11. sloupci mikrotitrační destičky. Z tohoto 11. sloupce bylo po promíchání 100 µl odstraněno. Poté byly doplněny všechny jamky sloupců 3–11 100 µl média s 1 % DMSO. Následně bylo do každé jamky jednoho řádku napipetováno 10 µl bakteriální suspenze o 0,5 ° dle McFarlandovy zákalové stupnice. Tato suspenze byla předem připravená resuspendací kolonií sekundárních kultur v cca 3 ml fyziologického roztoku. Jeden řádek příslušel jednomu bakteriálnímu kmenu. Takto připravená mikrotitrační destička byla inkubována při 35±1 °C. MIC byla odečtena po 24 a 48 hodinách inkubace pomocí spektrofotometru při 600 nm. MIC odpovídá nejnižší koncentraci testované látky, která zamezila růstu bakterie. Pro stanovení MBC byla po 24hodinovém odečtu MIC připravena nová mikrotitrační destička, do které bylo napipetováno 200 µl MH média a 10 µl obsahu jamek z destičky použité pro stanovení MIC bylo přeneseno do odpovídajících jamek nové destičky. MBC hodnoty byly následně stanoveny obdobně jako MIC po 24 hodinách inkubace při 35±1 °C.

4.5.2. Vliv média na stanovení MIC a MBC

Pro nutričně náročnější bakteriální kmen *E. faecalis* byly stanoveny MIC a MBC hodnoty i v nutričně bohatších médiích – TSB a BHI. Stanovení proběhlo dle výše uvedeného postupu mikrodiluční bujónové metody (viz. 4.5.1. Primární screening antibakteriální aktivity). Jedinou odchylkou v postupu byla záměna použitých kultivačních medií. Dále byly pro kmen *E. faecalis* stanoveny růstové křivky ve zvolených kultivačních médiích (MHB, TSB a BHI) následujícím postupem. 2–3 kolonie ze sekundární kultury *E. faecalis* byly inokulovány do 10 ml média a následně inkubovány

při 35±1 °C za stálého třepání. Prvních 7 hodin inkubace byla každých 30 minut odečtena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. Z naměřených hodnot byla následně pro všechna média stanovena růstová křivka a růstový faktor podle logistické rovnice populačního růstu (**rovnice 1**).

Rovnice 1 - Logistická rovnice populačního růstu

$$N(t) = \frac{KN_0}{(K-n_0)e^{-rt}+N_0}$$

N_0 = počáteční absorbance exponenciální fáze růstu

K = maximální absorbance exponenciální fáze růstu

t = doba exponenciální fáze růstu

r = růstový faktor

4.5.3. Vliv bakteriální denzity na antimikrobní aktivitu KAS

Pro stanovení vlivu bakteriální denzity na antibakteriální aktivitu KAS bylo připraveno z jedné kultury *S. aureus* a *E. coli* 7 suspenzí v rozmezí 10⁵ až 10⁸ CFU/ml. Pro vybrané látky a připravené suspenze s různou počáteční bakteriální hustotou byla následně stanovena MBC po 5 minutách a 24 hodinách inkubování těchto směsí dle postupu mikrodiluční bujónové metody (viz. 4.5.1. Primární screening antibakteriální aktivity).

4.5.4. Testování aktivity proti *F. tularensis*

Z čerstvé primární kultury *F. tularensis* LVS byla ve fosfátovém pufru – pH 7,4 (PBS) připravena bakteriální suspenze o O.D.=1 (optická denzita při 600 nm), která v případě *F. tularensis* LVS odpovídá 4×10⁹ CFU/ml. 1ml alikvóty byly centrifugovány 7 minut při 7000× g a 4 °C. Supernatant byl nahrazen 500 µl 0,1% roztoku testované látky rozpuštěné v PBS (500 µl PBS v případě negativní kontroly). Po 5minutové expozici byla bakteriální suspenze s testovanou látkou znovu centrifugována 7 minut při 7000× g a 4 °C a supernatant, představován roztokem testované látky, byl odstraněn. Bakterie byly resuspendovány v 1 ml PBS a uskladněny na ledu před cytometrickým měřením. Pro pozitivní kontrolu byla připravena bakteriální suspenze v PBS o O.D.=1 z bakterií usmrčených předchozím vystavením 36% formaldehydu přes noc. Všechny vzorky byly následně zředěny 1:100 v 1 ml PBS a obarveny fluorescenčními barvivy – 1 µl propidium jodida 1,5 µl Syto 9. Po 15minutové inkubaci ve tmě při pokojové teplotě bylo přidáno

10 µl mikrosfér a vzorky byly promíchány. Všechny vzorky byly analyzovány pomocí průtokového cytometru CyAn ADP Flow Cytometer (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA). Naměřená data byla analyzována softwarem Summit v4.3 (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA). Všechny experimenty byly provedeny v triplikátech.

4.5.5. Kvantitativní suspenzní zkouška ČSN EN 1276 (665202)

Celý název ČSN EN 1276 (665202) zní: Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní zkouška v suspenzi k hodnocení baktericidní aktivity chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik používaných v potravinářství, průmyslu, domácnostech a veřejných prostorách – Zkoušení metoda a požadavky (fáze 2 / stupeň 1). Kategorie: Všeobecně použitelné dezinfekce.

Kvantitativní zkouška v suspenzi byla provedena zředovací neutralizační metodou. V rámci metodiky bylo využito nízké znečištění (0,3 g/l bovinního albuminu frakce V – receptura v **příloze A**) a krátká expoziční doba - 2 minuty. Zkušební roztoky látek byly připraveny v tvrdé vodě (receptura v **příloze A**) v minimálně 3 koncentracích 1,25× vyšších než finální testovaná koncentrace.

V rámci testování byla nejprve připravena zkušební bakteriální suspenze N (McFarland = 1 ° v 10 ml zředovacího roztoku – receptura v **příloze A**). Připravená suspenze byla rozředěna desítkovou řadící řadou ve fyziologickém roztoku, inokulována na TSA a inkubována 24 hodin při 35±1 °C. Druhý den bylo odečteno přesné CFU/ml. V rámci samotného testování jsme nejprve přidali do zkumavky 100 µl bovinního albuminu frakce V (3 g/l), 100 µl zkušební bakteriální suspenze N a 800 µl zkušebního roztoku. Obsah zkumavky byl promíchán a ponechán působení po dobu zvoleného expozičního času. Následně se odebralo 100 µl do zkumavky obsahující 800 µl neutralizačního činidla (receptura v **příloze A**) a 100 µl tvrdé vody. Objem zkumavky byl promíchán a neutralizační činidlo se nechalo působit 10±1 s. Následně bylo 100 µl inokulováno na TSA a agary byly inkubovány 24 hodin při 35±1 °C. Druhý den bylo odečteno přesné CFU/ml a byla stanovena dekadická logaritmičká redukce (lg R) podle **rovnice 2**.

Rovnice 2 - Stanovení redukce bakteriálního nárůstu

$$\lg R = \lg \frac{N}{10} - \lg N_x$$

N = stanovené CFU/ml zkušební bakteriální suspenze N

N_x = stanovené CFU/ml po expozici látkou X.

Experimentální podmínky testování byly kontrolovány následujícím postupem. Do zkumavky se 100 μ l bovinního albuminu frakce V (3 g/l) a 100 μ l validační bakteriální suspenze N_v (1:3 zředěná zkušební suspenze N zředovacím roztokem) bylo přidáno 800 μ l tvrdé vody. Obsah zkumavky byl promíchán a ponechán působení po dobu zvoleného expozičního času. Následně byl vhodný objem inokulován na TSA a agary byly inkubovány 24 hodin při 35 ± 1 °C. Druhý den bylo odečteno přesné CFU/ml. Experimentální podmínky byly vyhovující, pokud bylo stanovené CFU/ml větší nebo rovno 0,5násobku CFU/ml validační suspenze N_v .

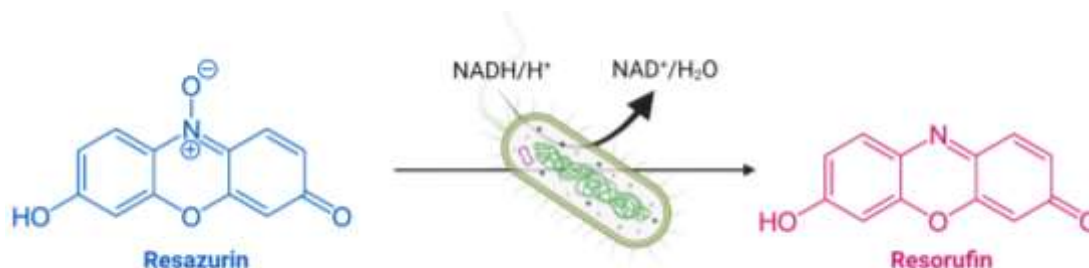
Efektivita neutralizačního činidla byla kontrolována následujícím postupem. Do zkumavky bylo přidáno 800 μ l neutralizačního činidla, 100 μ l tvrdé vody a 100 μ l validační suspenze N_v . Obsah zkumavky byl promíchán a ponechán působení po dobu neutralizačního času (10 ± 1 s.). Následně bylo 100 μ l inokulováno na TSA a agary byly inkubovány 24 hodin při 35 ± 1 °C. Druhý den bylo odečteno přesné CFU/ml. Efektivita neutralizačního činidla byla vyhovující, pokud bylo stanovené CFU/ml větší nebo rovno 0,5násobku CFU/ml validační suspenze N_v .

Validace zředovací neutralizační metody byla provedena následujícím postupem. Do zkumavky se 100 μ l bovinního albuminu frakce V (3 g/l) a 100 μ l zředovacího roztoku bylo přidáno 800 μ l zkušební roztoku o nejvyšší koncentraci. Obsah zkumavky byl promíchán a ponechán působení po dobu zvoleného expozičního času. Následně se odebralo 100 μ l do zkumavky obsahující 800 μ l neutralizačního činidla. Objem zkumavky byl promíchán a neutralizační činidlo se nechalo působit 10 ± 1 s. Následně bylo přidáno 100 μ l validační suspenze. Obsah zkumavky byl promíchán, vložen do temperované vodní lázně na 20 ± 1 °C na 30 ± 1 min. Následně byl vhodný objem inokulován na TSA a agary byly inkubovány 24 hodin při 35 ± 1 °C. Druhý den bylo odečteno přesné CFU/ml. Metoda byla validní, pokud bylo stanovené CFU/ml větší nebo rovno 0,5násobku CFU/ml validační suspenze N_v .

4.5.6. Calgary biofilm device

Při testování antibiofilmové aktivity proti biofilmu *S. aureus* a *E. coli* byla z kolonií ze sekundárních kultur připravena bakteriální suspenze v MHB o zákalu 1,0 McFarlandovy zákalové stupnice. Tato suspenze byla následně zředěna 1:30 v MHB pro získání inokulační suspenze pro růst biofilmu. Inokulační suspenze kmene *S. mutans* byla připravena zředěním suspenze připravené v TBS inkubací přes noc 1:100 v BHI bujónu. 150 μ l inokulační suspenze bylo napipetováno do všech jamek Calgary biofilm device (CBD) mikrotitrační destičky (Innovotech, Edmonton, AB, Canada) kromě jamky 12H, která obsahovala pouze čisté médium pro kontrolu sterility. Biofilm byl formován během 24hodinové inkubace při 35 ± 1 °C za stálého třepání při 110 RPM. Následně bylo víčko s narostlým biofilmem na kolících opláchnuto fyziologickým roztokem, kolíky 12C a 12F byly odlomeny sterilními kleštěmi, vloženy jamek nové mikrotitrační destičky obsahující medium s 5% Alamar Blue (AB) a inkubovány ve tmě 3 hodiny při 35 ± 1 °C. Po inkubaci byla změřena absorbance média s AB při 570 nm a 600 nm a narostlý biofilm byl kvantifikován dle níže popsaného postupu dle **rovnice 3**. Víčko s biofilmem bylo dále vloženo na předpřipravenou destičku s testovanými látkami. Destička s testovanými látkami byla připravena obdobně jako při mikrodiluční bujónové metodě, kdy jamky každého řádku obsahovaly 200 μ l jedné testované látky ve dvojkové koncentrační řadě. Destička s testovanými látkami a víčkem s narostlým biofilmem byla inkubována 24 hodin při 35 ± 1 °C. Následně bylo víčko s biofilmem opláchnuto fyziologickým roztokem a přemístěno na destičku s jamkami obsahujícími 200 μ l média s 5% AB. Destička byla inkubována ve tmě 3 hodiny při 35 ± 1 °C. Po inkubaci byla změřena absorbance média s AB při 570 nm a 600 nm. Pro kvantifikaci kontrolního a eradikovaného biofilmu byl optimalizován protokol dle literatury.^{121,122} Princip stanovení je založen na redukci modře zbarvené oxidované formy resazurinu na růžově zbarvený resorufin pomocí bakteriálního metabolismu živých bakterií (**obrázek 8**). S AB bylo nakládáno dle protokolu od výrobce včetně skladování při 4 °C. Riziko vystavení světlu bylo v rámci experimentu minimalizováno. Procento redukce AB bylo vypočteno pomocí **rovnice 3**. Za minimální biofilm eradikující koncentraci byla považována nejnižší koncentrace látky korespondující s jamkou, kde redukce AB byla nižší než 5 %. Vypočtená redukce AB zároveň posloužila ke stanovení množství bakterií v biofilmu, kdy pro kalibraci redukce AB ku parametru CFU/ml byly připraveny suspenze testovaných bakteriálních kmenů obsahující cca 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 a 10^9 CFU/ml. Pro všechny připravené suspenze bylo stanoveno přesné CFU/ml pomocí inokulace na MHA a inkubace přes noc při 35 ± 1 °C. K 90 μ l každé připravené suspenze bylo přidáno 10 μ l AB. Mikrotitrační destička se suspenzemi a AB byla zakryta alobalem a inkubována 3 hodiny ve tmě při 35 ± 1 °C. Po

inkubaci byla na spektrofotometru (Synergy™ HT, Bio-Tek Instruments, Vermont, USA) změřena absorbance při 570 nm a 600 nm. Kontrolní jamky obsahovaly médium s AB. Procentuální redukce AB byla stanovena podle **rovnice 3**. Výsledné hodnoty byly použity pro kalibrační křivku závislosti procentuální redukce AB na CFU/ml.



Obrázek 8 - Princip Alamar Blue stanovení

Obrázek byl vytvořen pomocí BioRender.com.

Rovnice 3 - Výpočet redukce Alamar Blue

$$\% \text{ redukované Alamar Blue} = \frac{C_{\text{red}}(\text{test})}{C_{\text{ox}}(\text{NK})} = \frac{(\epsilon_{\text{ox}})\lambda_2 \times A\lambda_1 - (\epsilon_{\text{ox}})\lambda_1 \times A\lambda_2}{(\epsilon_{\text{red}})\lambda_1 \times A'\lambda_2 - (\epsilon_{\text{red}})\lambda_2 \times A'\lambda_1} \times 100$$

$C_{\text{ox}}(\text{test})$ = koncentrace oxidované formy Alamar Blue u testovaného vzorku

$C_{\text{red}}(\text{NK})$ = koncentrace redukované formy Alamar Blue u negativní kontroly

ϵ_{ox} = molární absorpční koeficient oxidované Alamar Blue (pro $\lambda_1 = 80,586$; pro $\lambda_2 = 117,216$)

ϵ_{red} = molární absorpční koeficient redukované Alamar Blue (pro $\lambda_1 = 155,677$; pro $\lambda_2 = 14,652$)

A = absorbance testovaného vzorku

A' = absorbance negativní kontroly

$\lambda_1 = 570 \text{ nm}$

$\lambda_2 = 600 \text{ nm}$

4.5.7. Biofilmový model *E. faecalis*

Bakteriální suspenze *E. faecalis* připravená inkubací přes noc za stálého třepání v TSB (průměrně 1×10^8 CFU/ml) byla zředěna 1:100 v BHI. Biofilm *E. faecalis* byl formován na titanových discích (komerční titan, grade 2) o průměru 7 mm a tloušťce 1 mm, které byly ponořeny v připraveném inokulu po dobu 3 dní při 37 ± 1 °C. Před experimentem byly disky opískovány zubařskou pískovačkou (FerroEcoBlast Europe; Microblast ceramic beads B120), očištěny 70% ethanolom a vysterylizovány autoklávováním po dobu 20 minut při 134 °C. Narostlý biofilm byl vystaven roztoku

dezinfekčních látek v BHI po dobu 1, 3 a 60 minut. Dále byl sledován efekt kombinace působení KAS a laseru LightWalker Er:YAG (Fotona, Ljubljana, Slovenia), kdy byla 1minutová expozice KAS následována 10sekundovým laserovým působením. Laser byl nastaven na vlnovou délku 2940 nm, energii 20 mJ, frekvenci 15 Hz, water off, air off, single pulse modality – SSP (super short pulse – 50 ms). Byl použit „contact handpiece“ H14 a „Flat Sweeps fiber tip“ 400/14 byl umístěn 5 mm nad disk s biofilmem. Následně byly disky opláchnuty fyziologickým roztokem a obarveny 5 ml směsí Syto 9 a propidium jodidu připravené zředěním zásobních roztoků barviv LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit L7012 1:300 ve fyziologickém roztoku. Po 5minutové inkubaci ve tmě byly vzorky pozorovány fluorescenčním mikroskopem Zeiss Axio Observer Z1 (ZEISS GmbH, Německo) vybaveným konfokální jednotkou LSM 800. „Z-stacks“ a „tiles“ byly pořizovány při 100násobném nebo 20násobném zvětšení na třech náhodně vybraných místech disku. Mikroskop byl ovládán pomocí ZEN 2.3 softwaru (ZEISS GmbH, Germany). Při 100× zvětšení byla intenzita modrého laseru o vlnové délce 488 nm a žlutého laseru o vlnové délce 561 nm nastavena na 1 %, GaAsP PMT detektor na 700 V, pinhole na 71 mm, a velikost pořizovaného 8bitového smínku byla 3476×3476 pixelů. Při 20× zvětšení byla intenzita modrého laseru o vlnové délce 488 nm a žlutého laseru o vlnové délce 561 nm nastavena na 0,85 %, GaAsP PMT detektor na 700 V, pinhole na 50 mm, a velikost pořizovaného 8-bitového smínku byla 1306×1306 pixelů. Typický Z-step Z-stacku byl 1 mm pro 100× zvětšení a 3,26 mm pro 20× zvětšení. Pořízený obraz byl složen ze čtyř zorných polí. Vlastní skript byl vytvořen v softwaru Fiji¹²³ pro vyhodnocení antibiofilmového efektu s ohledem na poměr mrtvých/živých bakterií a procentuální kolonizaci povrchu bakteriemi. Bliss independence model byl použit pro vyhodnocení typu interakcí u kombinované léčby pomocí KAS a laseru.¹²⁴ Tento model je založen na předpokladu, že jednotlivé složky kombinované léčby působí samostatně, ale zároveň přispívají k finálnímu výsledku.^{124,125} Pozorovaný výsledek kombinované léčby (Eobs) je porovnán s předpokládaným výsledkem kombinované léčby (Eexp), který je vypočten z **rovnice 4**. Rozdíl mezi Eobs a Eexp je označován jako „Excess over Bliss“ (eob). Kladný eob značí synergickou interakci a záporný eob značí antagonistické chování. Nulový eob znamená nulové interakce mezi jednotlivými složkami.

Rovnice 4 - Výpočet předpokládaného výsledku kombinované léčby

$$E_{exp} = 1 - (1 - E1) \times (1 - E2)$$

E1 a E2 jsou efekty jednotlivých složek kombinované léčby.

E_{exp} je vypočtený předpokládaný výsledek kombinované léčby.

4.5.8. Model biofilmu na biokompatibilním povrchu

Příprava a charakterizace hydroxyapatitových disků

Níže popsaná příprava a charakterizace hydroxyapatitových disků byla provedena E. Montufarem a spol. na pracovišti Středoevropského technologického institutu (CEITEC, VUT Brno, Česká republika).

Do 2,5% vodného roztoku hydrogenfosforečnanu sodného (Na_2HPO_4 ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA) byl přimíchán prášek α -trikalcium fosfát (α -TCP) (připraven „solid state“ reakcí dle dříve publikovaného postupu¹²⁶ o velikosti částic 32-45 μm) v koncentraci 1,67 g/ml. Ze vzniklé pasty byly pomocí teflonové formy vytvořeny disky o průměru 11 mm a tloušťce 2 mm, které byly ponořeny ve vodě po dobu 10 dní při 37 °C, aby byla dosažena kompletní hydrolyza α -TCP prášku na kalcium-deficientním hydroxyapatitu (CDHA). CDHA disky byly následně karbonizovány ponořením do 20% roztoku hydrogen uhličitany sodného (NaHCO_3 ; LachNer, Czech Republic) po dobu 24 hodin při 190 °C. Následné spékání CDHA a zkarbonizovaného CDHA po dobu 9 hodin při 1100 °C vytvořilo β -TCP a spékané hydroxyapatitové (SHA) disky.

Krystalová kompozice jednotlivých materiálů byla stanovena pomocí rentgenové krystalografie (XRD; Rigaku; SmartLab, 3kW CF2, Japonsko). Snímky byly pořízeny v Bragg-Brentanově uspořádání, při využití Cu K α radiace (40 kV, 30 mA). Úhel 2 θ byl stanovován v rozmezí 10° a 90° při skenovací rychlosti 3 °/min. Stanovené difrakce byly porovnány s databází Inorganic Crystal Structure Database (ICSD) pro fázovou identifikaci včetně strukturní modelace pro α -TCP (ICSD No. 923), β -TCP (ICSD No. 6191) a HA (ICSD No. 024240). Mikrostruktura jednotlivých vzorků byla po nanokarbonizaci povrchu pozorována pomocí SEM (TESCAN; Lyra3, Czech Republic) při akceleračním napětí 5 kV. Specifický povrch (SSA) byl stanoven pomocí adsorpce dusíku (NOVA 3200e; Quantachrome Instruments) dle Brunauer-Emmett-Teller metody. Porozita byla měřena Archimedovou metodou na základě předpokladu, že teoretická hustota odpovídá skeletální hustotě měřené heliovou pyknometrií (Micromeritics; AccuPyc II 1340).

Tvorba biofilmu

Biofilm byl formován bakteriálním kmenem *S. mutans*, který je nejběžněji izolován z raných ústních biofilmů a je zodpovědný za vznik zubního kazu. 2–3 kolonie izolátu byly inokulovány do 100 ml TSB a inkubovány přes noc při 35±1 °C a stálém třepání při 120 RPM. 900 μl narostlé suspenze bylo zamraženo s přídavkem 100 μl

kryoprotektivního DMSO a skladováno v kryozkumavkách při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před tvorbou biofilmu byla připravena čerstvá bakteriální suspenze odebráním 100 μl zamražené suspenze do 10 ml TSB a následnou inkubací přes noc při $35\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ při stálém třepání 120 RPM. Následně byla tato suspenze zředěna 1:100 s BHI. Sterilní disk byl vložen do jedné jamky 24jamkové sterilní destičky a zalit 2 ml připravené bakteriální suspenze. Biofilm byl na disku formován při 72hodinové inkubaci při $35\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Charakterizace biofilmu pomocí konfokální mikroskopie (CLSM)

Protokol pozorování biofilmu pomocí CLSM byl optimalizován podle dříve uvedeného pozorování *E. faecalis* biofilmu. Disky s narostlým biofilmem byly opláchnuty fyziologickým roztokem (0,9% NaCl v H_2O) a obarveny 10 μl fluorescenční směsí předpřipravené smícháním zásobních roztoků Syto 9 and propidium jodidu z LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit L7012 (Thermo Fisher Scientific, Oregon, USA) v poměru 1:100 ve fyziologickém roztoku. Obarvené biofilmy byly 5 minut inkubovány při pokojové teplotě ve tmě a následně byly vzorky pozorovány konfokálním mikroskopem Nikon A1+ (Nikon, Tokyo, Japan), který byl vybaven lasery o vlnové délce 488 nm pro kanál FITC a 561 nm pro kanál Cy3. Fotomikrografie byly pořízeny při 40 \times zvětšení (Nikon CFI Plan Achromat Lambda 40 \times , N.A. 0,95) na třech náhodně vybraných místech disku. Typický Z-step Z-stacku byl 1 μm , průměr pinhole 33 μm a bylo zaznamenáno 7–15 ohniskových fokálních vrstev, aby byly získány informace o celém objemu biofilmu. Mikroskop byl ovládán a obraz byl získán pomocí softwaru NIS Elements AR 4.20.01. Množství bakterií tvořících biofilm na povrchu disků a poměr mrtvých a živých bakterií byl stanoven pomocí vyhodnocovacího softwaru Fiji¹²³, pro který byl sepsán vlastní vyhodnocovací skript.

Charakterizace biofilmu pomocí elektronové mikroskopie

Disky s narostlým biofilmem byly opláchnuty fyziologickým roztokem a zafixovány pro SEM podle „Leica sample preparation“ protokolu.¹²⁷ Ve zkratce, všechny vzorky byly nejprve zafixovány 3% vodným roztokem glutaraldehydu po dobu 16 hodin a teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$. Následně byly disky 3 \times opláchnuty destilovanou vodou a zafixovány 1% vodným roztokem OsO_4 (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) po dobu 16 hodin při 4 $^{\circ}\text{C}$. Následně byly disky 3 \times opláchnuty destilovanou vodou a dehydratovány postupnou ethanolovou řadou (30%, 50%, 70%, 85%, 96% a 100% ethanol po dobu 10 minut při 25 $^{\circ}\text{C}$) a následně acetonovou řadou (30%, 50% a 100% aceton po dobu 10 minut při 25 $^{\circ}\text{C}$). Finální dosušení proběhlo pomocí sušení ke kritickému bodu v Leica EM CPD 300 (Leica microsystems, Illinois, USA). Následně byly vzorky uchyceny na uhlíkový

„stub“ a pokovány 8nm vrstvou zlata pomocí pokovovačky Leica EM ACE200 (Leica microsystems, Illinois, USA). Mikrostruktura biofilmů byla pozorována elektronovým mikroskopem Hitachi FlexSEM 1000 (Hitachi, Tokyo, Japan) při akceleračním napětí 15 kV.

Kvantifikace biofilmu pomocí plotnové metody a Alamar Blue Biofilm assay

Disky s narostlým biofilmem byly opláchnuty fyziologickým roztokem a umístěny do všech jamek sterilní 24jamkové mikrotitrační destičky s 1 ml BHI bujónu. Zavřená destička byla zapečetěna parafilmem a sonifikována 10 minut v ultrazvuku (35 kHz). Biofilm byl ultrazvukem rozrušen a bakterie se uvolnily do média v destičce. Médium bylo následně desetinasobně sériově zředěno a inokulováno na BHI agary. Po 24hodinové inkubaci při 37 °C bylo stanoveno CFU/ml odpovídající množství bakterií tvořící biofilm.

Alamar Blue (AB) Biofilm assay byla provedena obdobně jako při stanovení antibiofilmové aktivity s Calgary biofilm device. Disky s narostlým biofilmem byly opláchnuty fyziologickým roztokem a umístěny do jamek sterilní 24jamkové mikrotitrační destičky s 900 µl BHI bujónu a 100 µl AB. Destička byla zabalena do alobalu a inkubována ve tmě 24 hodin při 37 °C. Po inkubaci byla na spektrofotometru (SynergyTM HT, Bio-Tek Instruments, Vermont, USA) změřena absorbance při 570 nm a 600 nm. Kontrolní jamky obsahovaly médium s AB. Dle **Rovnice 3** byla stanovena procentuální redukce AB, která byla následně pomocí kalibrační křivky převedena na CFU/ml.

Korelace mezi plotnovou metodou a Alamar Blue Biofilm assay

Pro stanovení korelace byla provedena AB Biofilm assay a stanovení pomocí plotnové metody ve stejný den s použitím stejného bakteriálního inokula. Experimenty byly opakovány alespoň třikrát. Korelace byla hodnocena pomocí Pearson's two tailed correlation testu, který byl stanoven z průměrů naměřených dat pomocí softwaru Prism 6.04 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA).

Stanovení citlivosti biofilmu k antimikrobním látkám pomocí AB Biofilm assay

Citlivost biofilmu byla stanovena pro roztoky chlorhexidinu o koncentraci 0,01, 0,1 a 0,2 % (m/v) (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) a ethanolu o koncentraci 70 % (VWR International s.r.o., Prague, Czech Republic), které byly připraveny ve fyziologickém roztoku. HA disky s narostlým biofilmem byly vystaveny roztokům antimikrobních látek po dobu 2 minut ponořením disku do 1 ml roztoku látky. Po 2 minutách byl disk opláchnut fyziologickým roztokem a umístěn do jamky sterilní

24jamkové destičky obsahující promíchanou směs 900 μ l BHI bujónu a 100 μ l AB. Další kroky ke stanovení procentuální redukce AB byly provedeny obdobně, jak již bylo popsáno v části AB Biofilm assay po 3, 5 a 24 hodinách inkubace. Kontrolní jamky obsahovaly médium s AB a sterilní HA disk.

Statistika

Všechny experimenty byly provedeny nezávisle na sobě alespoň ve 3 opakováních. Výsledné hodnoty byly analyzovány Shapiro-Wilkovým testem normality a na základě zjištěného normálního rozdělení dat byl pro analýzu poměru mrtvých a živých bakterií, AB redukci a CFU/ml následně použit Tukey's multiple comparison test, kde p-hodnota $<0,05$ byla považována za signifikantní. Všechny statistické analýzy a odpovídající grafické zobrazení výsledků bylo zpracováno v softwaru GraphPad Prism 6.04 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA).

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Primární screening antibakteriální aktivity

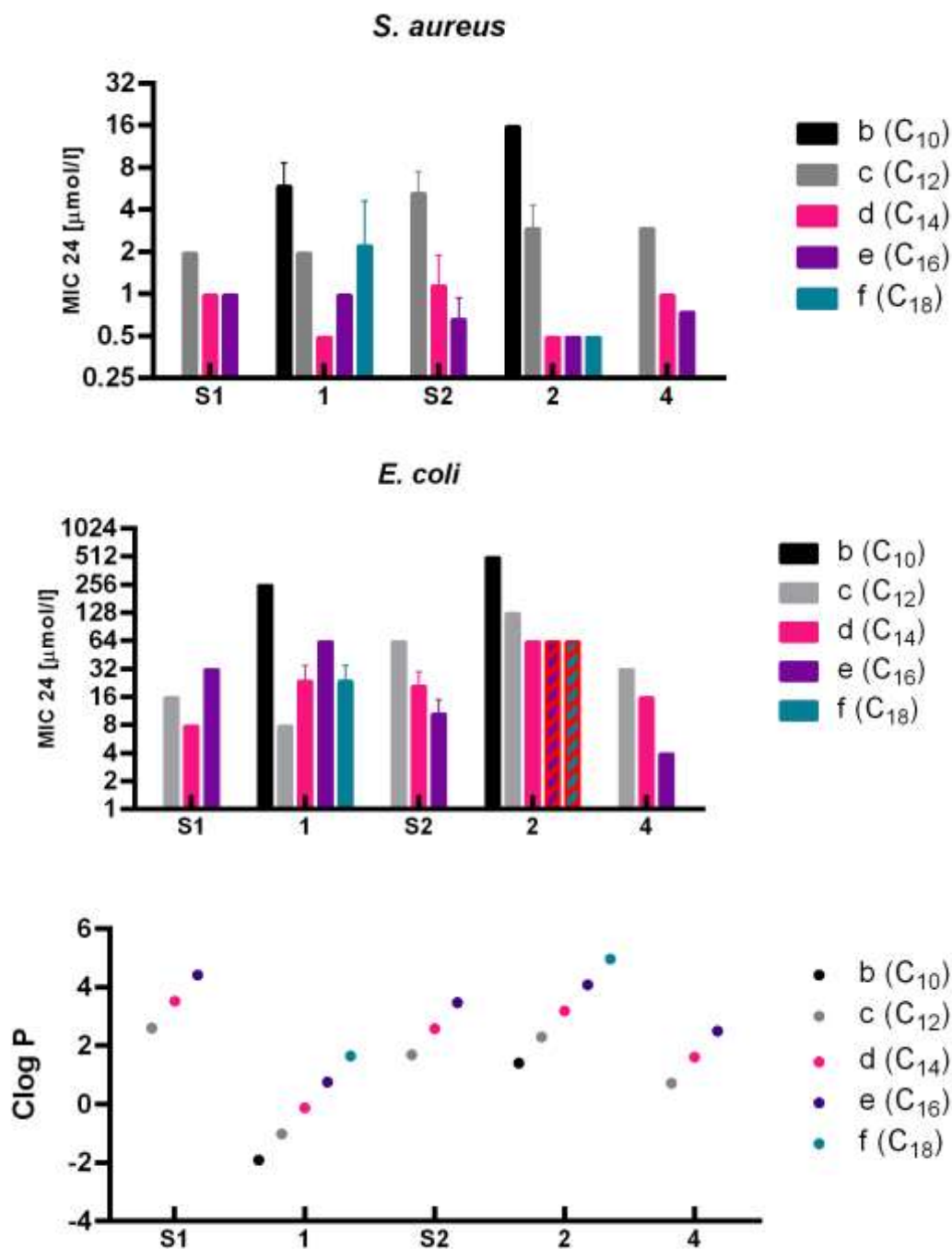
Základní screening antibakteriální aktivity nových a referenčních látek byl proveden pomocí mikrodiluční bujónové metody. Výsledné hodnoty triplikátů byly zprůměrovány a jsou uvedeny v **příloze B** a **příloze C**.

G⁺ kmeny byly obecně citlivější k testovaným KAS oproti kmenům G⁻. Vyšší citlivost G⁺ bakterií může být vysvětlena rozdílným složením buněčných stěn G⁺ a G⁻ bakterií a následnou nižší schopností KAS penetrovat vnější membránu G⁻ bakterií k cílové cytoplazmatické membráně.¹²⁸ Nejméně citlivý byl kmen *P. aeruginosa* MR, který byl citlivý pouze na některé testované látky často ve vyšších koncentracích. Slabý efekt testovaných látek na tento multirezistentní kmen se dal očekávat i na základě dříve publikovaných poznatků, kdy bylo zjištěno, že genom multirezistentních kmenů *P. aeruginosa* často obsahuje geny či integrony spojené se zvýšenou rezistencí vůči biocidům včetně KAS.^{129,130} Z nových látek prokázaly nejvyšší účinnost srovnatelnou s referenčními látkami především látky ze sérií **3** a **4**.

5.1.1. Vliv struktury na antibakteriální účinnost

Modifikace lipofilní části molekuly – délka a četnost alkylového řetězce

Vliv délky alkylového řetězce byl sledován na referenčních látkách **S1c-e** a **S2c-e** a u všech látek nově připravených. V případě KAS s jedním dlouhým alkylovým řetězcem byla pozorována nejvyšší antibakteriální aktivita u látek s alkylovým řetězcem obsahujícím 12 (C₁₂), 14 (C₁₄) a 16 (C₁₆) uhlíků. Nově syntetizované látky s jedním 10uhlíkatým řetězcem (**1b** a **2b**) byly výrazně méně účinné než deriváty s delšími alkylovými řetězci, a naopak látky nesoucí 18 (C₁₈) uhlíků v alkylovém řetězci (**1f** a **2f**) už nebyly výrazně účinnější než deriváty s kratšími alkylovými řetězci a zároveň měly výrazně horší rozpustnost. S ohledem na antimikrobiální aktivitu i rozpustnost (potažmo využitelnost v praxi) tak deriváty s jedním řetězcem o 10 nebo 18 uhlících nevykazovaly optimální vlastnosti pro případné použití nebo další hodnocení. Pro vizualizaci uvedených zjištění jsou na **obrázku 9** graficky znázorněny stanovené hodnoty MIC po 24 hodinách inkubace (MIC₂₄) pro kmen *S. aureus*, reprezentující G⁺ bakterie, a kmen *E. coli*, reprezentující G⁻ bakterie. Na **obrázku 9** jsou zároveň graficky znázorněny vypočtené hodnoty Clog *P* predikující rozpustnost látek.



Obrázek 9 - Vliv délky alkylového řetězce na antibakteriální aktivitu KAS

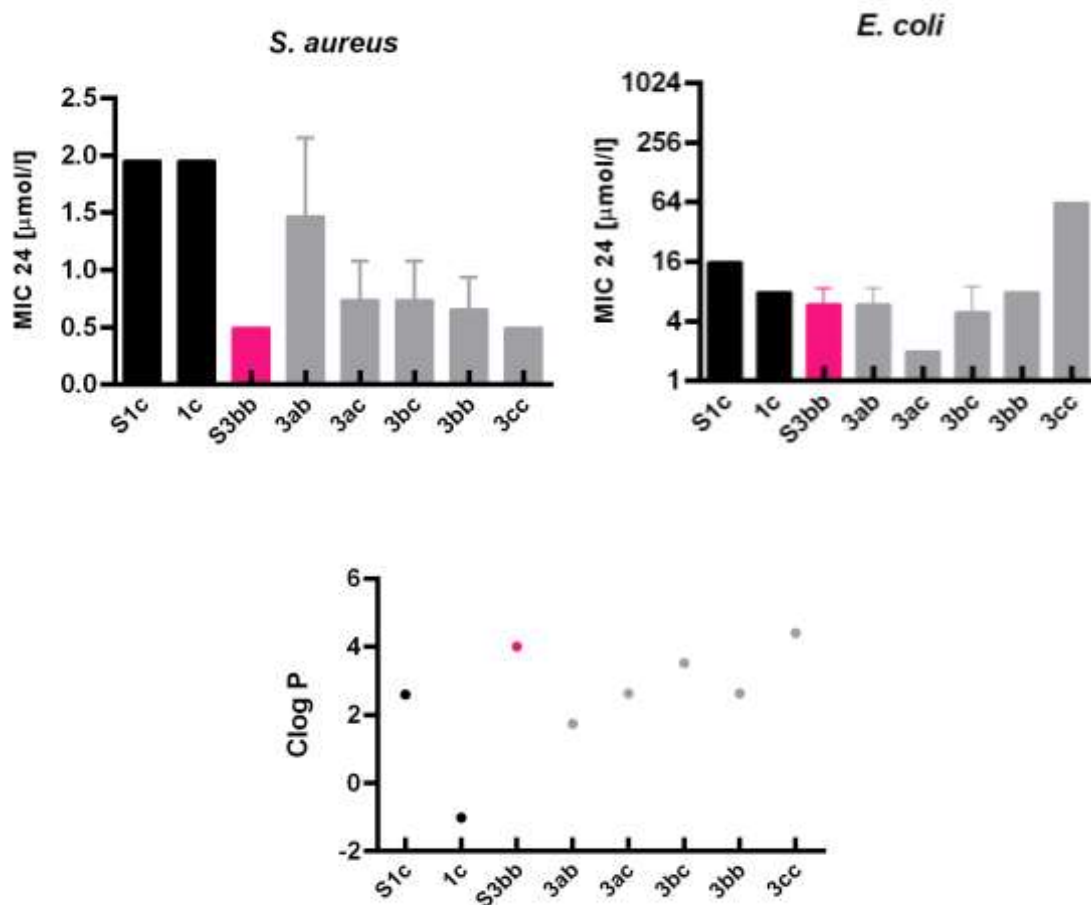
Minimální inhibiční koncentrace stanovené po 24hodinové (MIC 24; $\mu\text{mol/l}$) expozici KAS. Výsledné hodnoty MIC 24 stanovené pro kmen *S. aureus* (**horní graf**) a *E. coli* (**prostřední graf**). Ve skupinovém sloupcovém grafu jsou na ose x označeny vždy jednotlivé série KAS (**S1, 1, S2, 2, 4**) a barevné sloupce odpovídají jednotlivým derivátům série s odlišnou délkou alkylového řetězce (černá: b (C₁₀), šedá: c (C₁₂), růžová: d (C₁₄), fialová: e (C₁₆), tyrkysová: f (C₁₈)). V grafech jsou uvedeny průměry naměřených hodnot ($N = 2-4$). **Spodní graf:** Vypočítaný log P (Clog P) pro jednotlivé série KAS (**S1, 1, S2, 2, 4**) označené na ose x.

Při porovnání účinnosti všech látek proti G⁺ kmenům se v jednotlivých sériích prokázaly, bez výrazných rozdílů, jako nejefektivnější látky s C₁₄ a C₁₆. Naopak C₁₂ deriváty byly vždy výrazně méně účinné. Tyto výsledky příliš nekorespondují se závěry publikovaných studií Daouda a kol.²³ a Gilberta a Moora¹⁸, podle kterých by vůči G⁺ bakteriím měly být nejúčinnější látky s alkylovým řetězcem C₁₄²³ či C₁₂₋₁₄¹⁸. Naopak tyto výsledky potvrzují námi dříve publikovaná data.^{15,117,131}

V případě G⁻ bakterií nebyl vztah účinnosti k délce alkylového řetězce tolik zřetelný. Nejúčinněji se jevíly především deriváty C₁₄, ale v některých sériích byly efektivní i deriváty C₁₂ nebo C₁₆. Nižší rozpustnost často negativně ovlivnila stanovení a vyhodnocení citlivosti G⁻ kmenů u C₁₆ derivátů, jelikož bylo třeba začínat měření na nižších koncentracích. Dosažené výsledky tak znovu příliš nekorespondují se závěry výše zmíněných publikací, kde na G⁻ bakterie účinkovaly především látky s C₁₆²³ či C₁₄₋₁₆¹⁸.

Pokud vezmeme v potaz závěry této práce i závěry zmíněných studií, tak se deriváty obsahující C₁₄ prokázaly vždy jako velice účinné na G⁺ i G⁻ bakterie. Z naší studie lze tedy konstatovat, že KAS s jedním alkylovým řetězcem se 14 uhlíky zajišťují vysokou účinnost společně s dobrou rozpustností a jsou z hlediska kompromisu nejlepší volbou pro případné jednosložkové kompozice.

Na látkách ze série **3** a na referenční látce **S3bb** byl pozorován vliv přidání druhého dlouhého alkylového řetězce (C₈, C₁₀ nebo C₁₂) do struktury molekuly oproti látkám **1c** a **S1c**, které obsahují benzylovou skupinu a pouze jeden řetězec. Tato záměna vedla ke zvýšení antimikrobiální aktivity, ale zároveň i ke zvýšení Clog *P* a tedy poklesu rozpustnosti ve vodných médiích. Naopak ale v případě látek ze série **3** bylo zvýšení Clog *P* zmírněno zavedením hydroxyethylových skupin do struktury. Snížená rozpustnost tak neomezovala výslednou účinnost (s výjimkou *P. aeruginosa* MR) a MIC (případně MBC) byly hluboko pod hranicí rozpustnosti. Stanovené hodnoty MIC 24 a Clog *P* pro tyto látky jsou graficky znázorněny na **obrázku 10**. Látky se dvěma dlouhými alkylovými řetězci všeobecně prokázaly dobrou antimikrobiální aktivitu, srovnatelnou s běžnými KAS s jedním dlouhým alkylovým řetězcem. Vliv symetrie dvou delších alkylových řetězců (**3bb**, **3cc** – symetrické rozložení a **3ab**, **3ac**, **3bc** – asymetrické rozložení) na antimikrobiální aktivitu nebyl prokázán.



Obrázek 10 - Vliv četnosti alkylového řetězce a jejich kombinace na antibakteriální aktivitu KAS

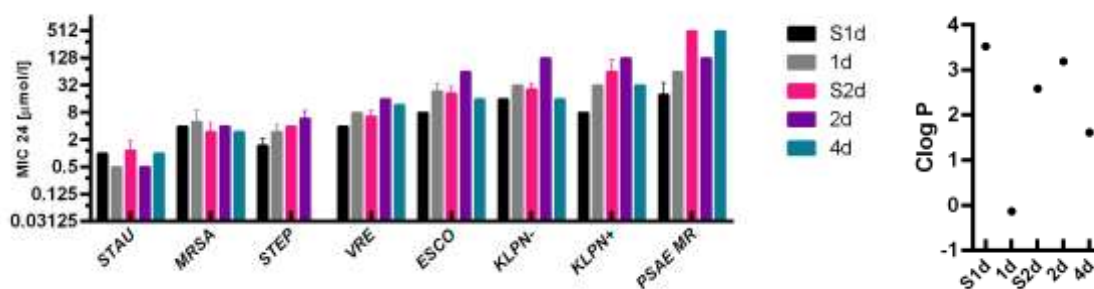
Minimální inhibiční koncentrace stanovené po 24hodinové (MIC 24; $\mu\text{mol/l}$) expozici referenčním látkám **S1c** (černá barva), **S3bb** (růžová barva) a novým látkám ze série **3** (šedá barva) a **1c** (černá barva). **Horní grafy:** Výsledné hodnoty MIC 24 stanovené pro kmen *S. aureus* (vlevo) a *E. coli* (vpravo). V grafech jsou uvedeny průměry naměřených hodnot ($N = 2-4$). **Spodní graf:** Vypočítaný log P (Clog P).

Vliv dalších substituentů na hydrofilní části molekuly

Nově syntetizované látky ze série **1** byly odvozeny od referenčních látek ze skupiny **S1**. Modifikovaná struktura vznikla záměnou methylových skupin na kvartérním dusíku za hydroxyethylové skupiny s cílem zvýšit rozpustnost benzalkoniových derivátů a zároveň zachovat antimikrobiální aktivitu. Jedna látka této skupiny (**1c**) se stala v nedávné době komerčně dostupnou, pod názvem benzoxonium chlorid. Tento předpokládaný efekt byl potvrzen stanovenými hodnotami MIC, MBC a Clog P . Nově syntetizované pyridinové deriváty ze série **2** byly odvozeny od referenčních látek ze

skupiny **S2** substitucí v poloze 3, kde jsme předpokládali zlepšení účinnosti vlivem chloru. Tato obměna způsobila očekávané zvýšení Clog *P*, a zároveň nevedla k výraznému zvýšení antimikrobiální účinnosti. Tuto strukturní modifikaci tak lze považovat za neperspektivní. S ohledem na celkový vliv strukturních modifikací na hydrofilní části molekuly jsou na **obrázku 11** graficky znázorněny MIC 24 a Clog *P* stanovené u zástupců všech referenčních a nových skupin se stejnou délkou alkylového řetězce. Znázorněny jsou výsledky derivátů se 14uhlíkatým řetězcem (**S1d**, **1d**, **S2d**, **2d**, **4d**), jelikož bylo výše prokázáno, že tato délka alkylového řetězce je pro antibakteriální aktivitu neoptimálnější.

Obecně lze shrnout, že obměna substituentů na polární části molekuly KAS má jen zanedbatelný vliv na antimikrobní účinnost oproti vlivu délky alkylového řetězce či jejich počtu jako nepostradatelné nepolární části molekuly. Efektivní mohou být ale pro optimalizaci fyzikálně-chemických vlastností látek a jejich praktické využití. Mimo předmět této disertační práce bylo navíc prokázáno, že modifikace polární části KAS mohou zároveň vést k rozšíření spektra účinku o virucidní aktivitu.²⁸ Předmětem intenzivního výzkumu jsou zároveň KAS obsahující dvě symetrické části spojené různě dlouhým řetězcem. Tyto takzvané gemini-KAS často vykazují vyšší antimikrobiální aktivitu v porovnání s nejpoužívanějšími KAS, ale zároveň jsou méně rozpustné a více toxické.^{132–134} Příkladem gemini-KAS je i referenční látka **S6** komerčně známá jako oktenidin, která prokázala nejvyšší účinnost vůči všem bakteriálním kmenům včetně *P. aeruginosa* MR.

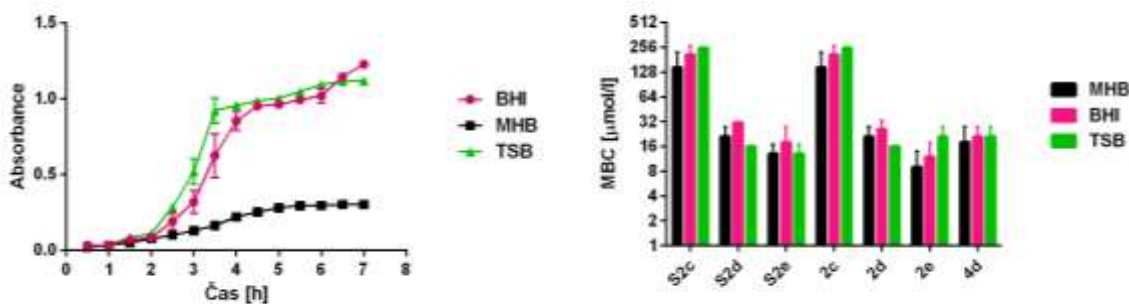


Obrázek 11 - Vliv dalších substituentů na hydrofilní části molekuly na antibakteriální aktivitu KAS

Levý graf: Minimální inhibiční koncentrace stanovené po 24hodinové (MIC 24; µmol/l) expozici KAS s jedním alkylovým řetězcem v délce C₁₄ (**S1d**, **1d**, **S2d**, **2d**, **4d**). V grafu jsou uvedeny průměry naměřených hodnot (N = 2 – 4) stanovené pro kmeny: *S. aureus* (STAU), meticilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA), *S. epidermidis* (STEP), vankomycin-rezistentní *E. faecium* (VRE), *E. coli* (ESCO), *K. pneumoniae* (KLPN -), *K. pneumoniae* produkující širokospektré β-laktamázy (KLPN +), multirezistentní *P. aeruginosa* (PSAE MR). **Pravý graf:** Vypočítaný log *P* (Clog *P*).

5.2. Vliv média na stanovení MIC a MBC u kmene *E. faecalis*

Mezi G^+ bakterie, na kterých byly stanoveny MIC a MBC, patří i kmen *E. faecalis*, který se zároveň řadí mezi tzv. nutričně náročnější bakteriální kmeny, pro které CLSI standard M07Ed11 doporučuje v případě špatného růstu použití MHB média obohaceného o kationty. Při našem měření jsme nepozorovali výrazné problémy v růstu *E. faecalis* ve standardním MHB, ale přesto jsme se rozhodli stanovit MIC, MBC a růstové křivky i v nutričně bohatších mediích, tj. TSB a BHI. I přestože stanovené faktory rychlosti růstu ukázaly značně pomalejší růst kultury *E. faecalis* v nutričně chudším médiu oproti nutričně bohatším, stanovené MIC a MBC hodnoty se významně nelišily. Stanovené růstové křivky s příslušnými faktory rychlosti růstu a stanovené MIC a MBC hodnoty jsou zobrazeny na **obrázku 12**.



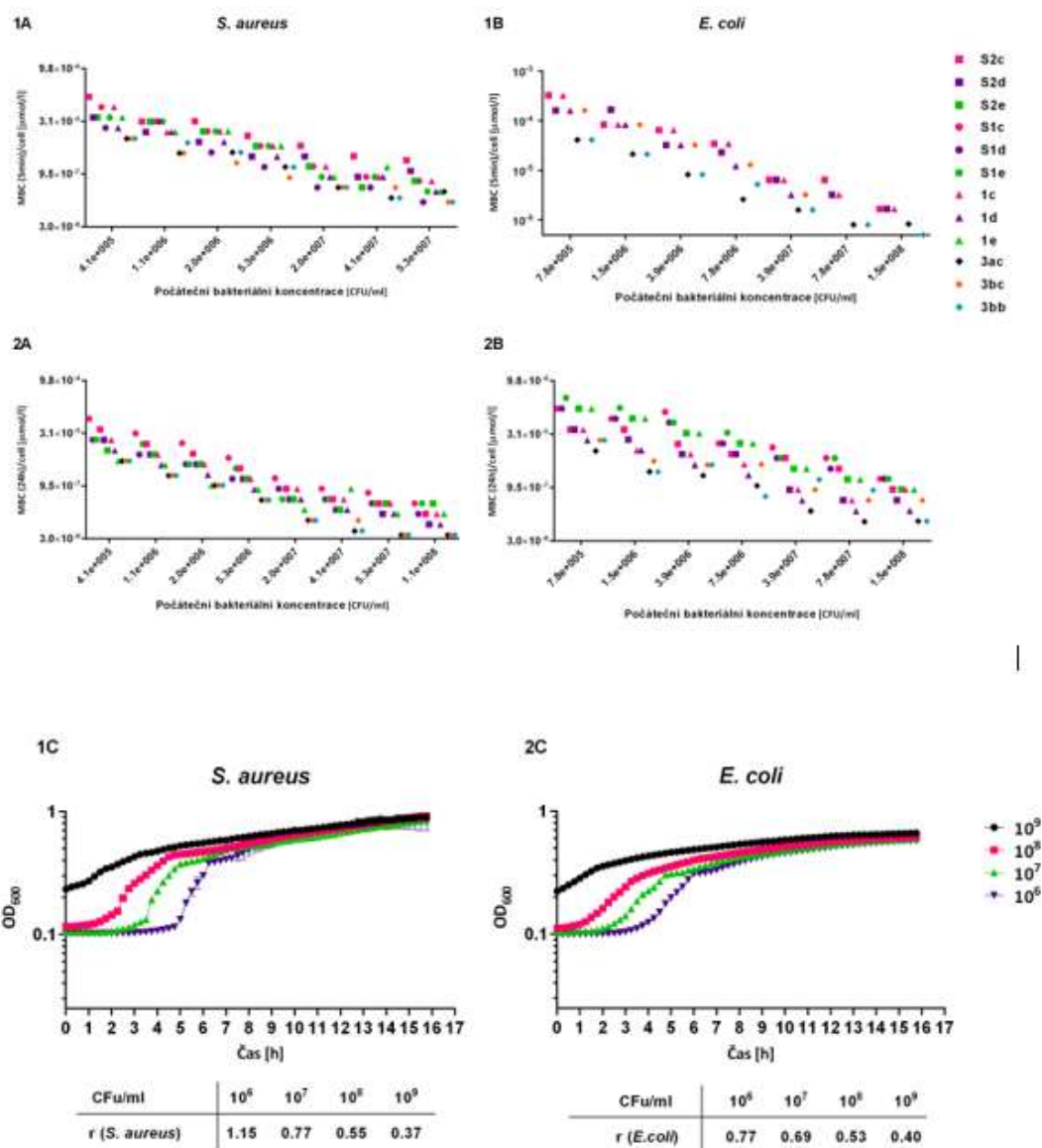
MÉDIUM	MHB	BHI	TSB
r	1,42	2,08	2,52

Obrázek 12 - Vliv média na stanovení MIC a MBC u *E. faecalis*

Levý graf: Růstové křivky *E. faecalis* stanovené v MHB, TSB a BHI. V tabulce je uveden stanovený faktor rychlosti růstu (r) kmene *E. faecalis* v jednotlivých mediích. Exponenciální fáze růstu byla pro výpočet stanovena v rozmezí absorbancí 0,1 – 1,0 pro TSB a BHI a 0,1 – 0,3 pro MHB. **Pravý graf:** Stanovené minimální baktericidní koncentrace (MBC; $\mu\text{mol/l}$) pro látky **S2c**, **S2d**, **S2e**, **2c**, **2d**, **2e**, **4d** při použití kultivačních médií MHB, TSB a BHI.

5.3. Vliv bakteriální denzity na antimikrobní aktivitu KAS

V rámci mikrodiluční bujónové metody se dle CLSI standardu M07Ed11 stanovují MIC a MBC hodnoty v bakteriální suspenzi o přibližné hustotě 10^7 CFU/ml. Před hodnocením antibiofilmové aktivity látek byl nejprve hodnocen samotný vliv bakteriální hustoty na antibakteriální aktivitu, jelikož právě vyšší bakteriální hustota je jedním z typických znaků biofilmu. Hodnoty MBC byly tak stanoveny na bakteriálních suspenzích o různé počáteční koncentraci (v jednotkách CFU/ml). Pro experiment byly vybrány kmeny *S. aureus* a *E. coli* jakožto typičtí zástupci G^+ a G^- bakterií. MBC byly stanoveny po 5minutové a 24hodinové expozici vybraným KAS. Společně s rostoucí počáteční bakteriální hustotou byl pozorován nárůst MBC. Nicméně sledovaný nárůst MBC nebyl lineárně úměrný ke zvýšení počtu bakteriálních buněk. Relativní hodnota MBC na jednu bakteriální buňku (MBC/cell) odhalila, že efektivní MBC ve skutečnosti výrazně klesá se zvyšující se hustotou bakteriálních buněk (**obrázek 13**). Stanovená MBC/cell byla u méně koncentrované bakteriální suspenze (4×10^5 CFU/ml) *S. aureus* téměř 100× vyšší než u suspenze 100× koncentrovanější (5×10^7 CFU/ml). Obdobné výsledky byly získány i v případě *E. coli*, kdy MBC/cell klesla o cca 2 řády, zatímco koncentrace bakterií cca o 2 řády stoupla. Z výsledků vyplývá, že čím hustší je počáteční bakteriální suspenze, tím více jsou jednotlivé bakteriální buňky citlivé k testovaným KAS. Důvodem by mohla být zvýšená úroveň stresu, který zažívají jednotlivé bakterie v přeplněném prostředí. Přestože by se bakterie mohly kolektivně přizpůsobit vysoké hustotě buněk a naopak zvýšit odolnost vůči antimikrobním látkám např. indukci QS dráhy tj. zvýšením počtu perzistentních buněk v populaci, zvýšenou expresí peroxidáz, které zajišťují ochranu před reaktivními formami kyslíku nebo nadměrnou expresí efluxních pump.¹³⁵ Výsledky této studie naopak naznačují, že jednotlivé bakterie kmenů *S. aureus* i *E. coli* jsou při vyšších počátečních koncentracích bakterií více stresovány a tedy citlivější k antimikrobiálním látkám. Tento stres může být vyvolán sníženou dostupností živin a následnou sníženou rychlostí růstu. Pro ověření jsme sledovali růst bakterií v suspenzi při různých počátečních hustotách v čerstvém médiu. Rychlost růstu, která je obecným ukazatelem dobrého stavu buněk, se výrazně snižovala s rostoucí počáteční hustotou buněk. Grafické znázornění vlivu počáteční bakteriální hustoty na MBC a jednotlivé růstové křivky jsou uvedeny na **obrázku 13**.

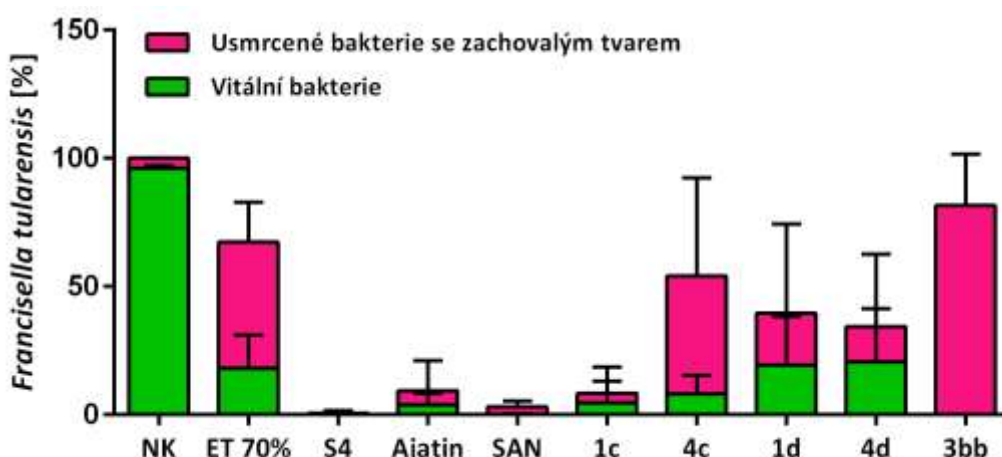


Obrázek 13 - Růstové křivky a vliv bakteriální hustoty na MBC

MBC/cell stanovené u bakteriálních suspenzí *S. aureus* o různé počáteční bakteriální denzitě po 5minutové (1A) a 24hodinové (2A) expozici vybraným KAS a u bakteriálních suspenzí *E. coli* o různé počáteční bakteriální denzitě po 5minutové (1B) a 24hodinové (2B) expozici vybraným KAS. Růstové křivky bakteriálních suspenzí *S. aureus* (1C) a *E. coli* (2C) o různém počátečním CFU/ml. V tabulce jsou uvedeny stanovené růstové faktory r . Exponenciální fáze růstu byla pro výpočet stanovena v rozmezí absorbancí 0,1 – 1,0.

5.4. Testování aktivity proti *F. tularensis*

Kromě výše uvedených bakteriálních kmenů, které patří mezi zástupce nozokomiálních patogenů a způsobují tak často obtížně léčitelné infekce především v nemocničním prostředí, byla do testování na základě projektu Agentury pro zdravotnický výzkum ČR s názvem „Vývoj polyvalentního dekontaminačního činidla“ zařazena i bakterie *F. tularensis* LVS, která patří mezi vysoce rizikové infekční agens pro její možné zneužití při vývoji biologických zbraní a bioterorismu. Citlivost *F. tularensis* byla stanovena s využitím fluorescenční průtokové cytometrie (FACS). Tato metoda nám umožnila stanovit procento usmrcených a přeživších bakteriálních buněk po expozici testovaným látkám. Standardizované množství mikrosfér zároveň umožnilo zjistit, zda testované KAS zcela rozrušují celistvost bakteriální buňky, nebo bakterie usmrcují v zachovalém tvaru. Toto testování podstoupily pouze nejlepší látky dle výsledků z mikrodiluční bujónové metody. *F. tularensis* byla nejcitlivější ke standardu **S4**, zástupci běžného dezinfekčního přípravku Sanytolu pro koupelny (aktivní účinná látka **S3bb**) a nově připravené látky **3bb**, které jediné usmrtily více než 99 % bakterií po 5minutové expozici 0,1% roztoku testované látky. V případě látky **3bb** odhalilo toto stanovení možný rozdílný mechanismus účinku KAS se dvěma dlouhými alkylovými řetězci na kvartérním dusíku, jelikož tato látka, na rozdíl od ostatních KAS s jedním řetězcem, většinu bakteriálních buněk usmrtila bez narušení celistvosti bakteriální buňky. Stanovení dále prokázalo klesající citlivost *F. tularensis* v řadě derivátů sérií **1** a **4**, lišících se v délce alkylového řetězce od C₁₂ po C₁₄ (**1c**: 95,3 %; **1d**: 80,7 %; **4c**: 92,0 %, **4d**: 79,4 % usmrcených bakterií). Výsledky jsou graficky znázorněny v **obrázku 14**.



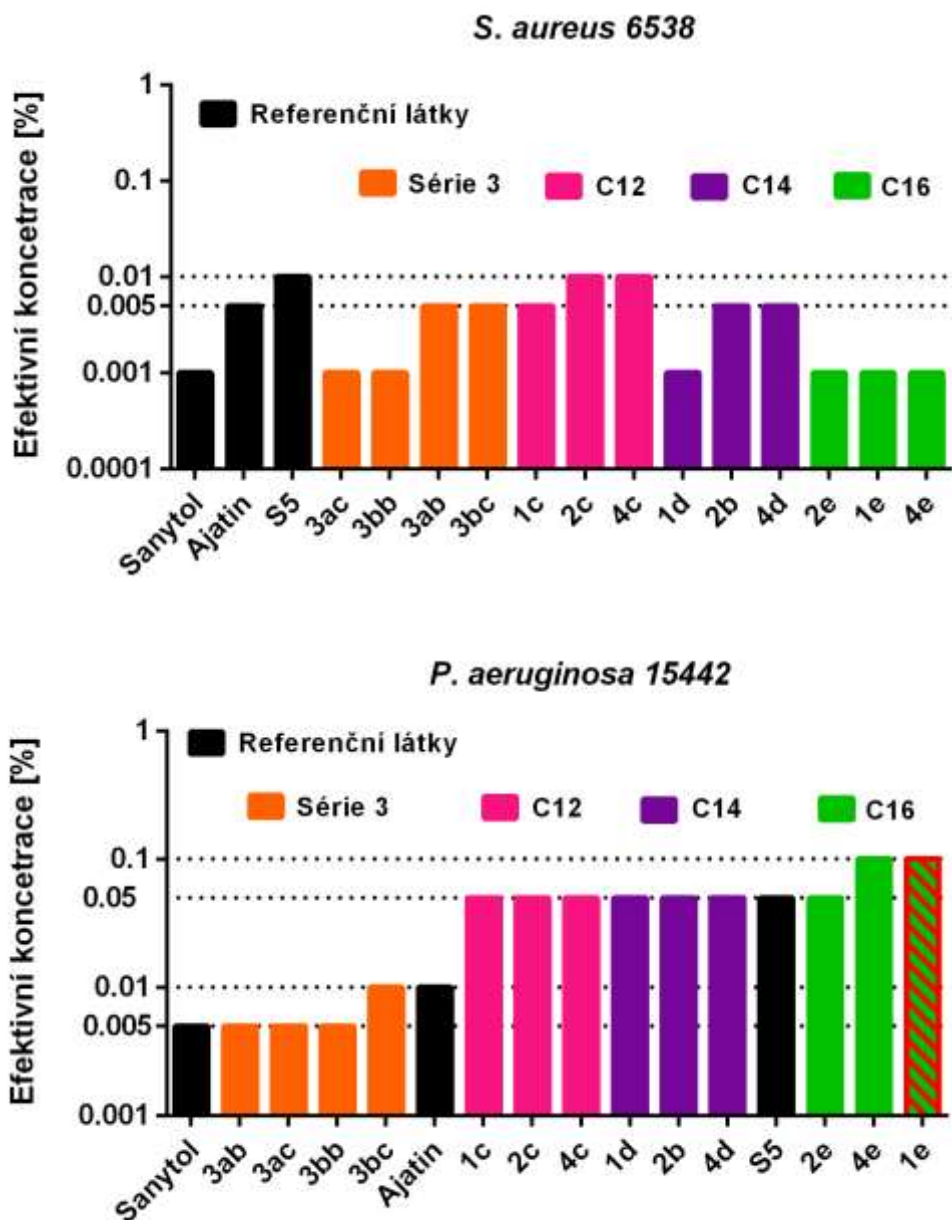
Obrázek 14 - Citlivost *F. tularensis* LVS k vybraným KAS

Výsledky jsou zobrazeny v procentuálním zastoupení vitálních a usmrcených bakterií se zachovaným tvarem po 5minutovém vystavení 0,1% roztokům nových KAS (**1c**, **1d**, **4c**, **4d**, **3bb**),

referenční KAS **S4**, Sanytolu pro koupelny (SAN), Ajatinu a 70% ethanolu (ET 70%). Nezobrazená sloupcová část do 100 % odpovídá usmrceným bakteriím s rozrušenou celistvostí. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota \pm SD; $n = 3$. NK představuje negativní kontrolu, která byla vystavena fyziologickému roztoku.

5.5. Kvantitativní suspenzní zkouška

Nové monoalkylové KAS obsahující C₁₂, C₁₄ a C₁₆ společně s látkami ze série **3** prokázaly dle mikrodiluční bujónové metody vysokou účinnost vůči G⁺ i G⁻ bakteriím, srovnatelnou se standardně používanými dezinfekčními látkami. Na základě toho byla pro tyto látky stanovena i antibakteriální aktivita při krátkém expozičním času (2 minuty) na sbírkových kmenech pomocí kvantitativní suspenzní zkoušky dle normy ČSN EN 1276. Tato zkouška je požadována pro případnou registraci a zavedení přípravků do praxe. Zároveň toto stanovení porovnálo účinnost daných látek s běžně užívanými dezinfekčními prostředky: Sanytol pro koupelny (aktivní účinná látka **S3bb**), Ajatin (aktivní účinná látka je směs **S1c**, **S1d** a **S1e**) a referenční látkou **S5**. Výsledky stanovení prokázaly, že všechny testované látky vykazují velice dobrou účinnost. Na **obrázku 15** jsou graficky znázorněny nejnižší efektivní koncentrace testovaných látek splňující požadavek normy, tj. redukci bakterií v suspenzi o 5 logaritmů. V případě derivátů s jedním dlouhým alkylovým řetězcem se znovu potvrdil vliv délky alkylového řetězce na aktivitu vůči G⁺ a G⁻ kmenům. U G⁺ kmene *S. aureus* 6538 se zvyšovala antibakteriální aktivita s prodlužujícím se alkylovým řetězcem od C₁₂ po C₁₆. Naopak u G⁻ kmene *P. aeruginosa* 15442 se zvyšovala aktivita se zkracujícím se alkylovým řetězcem od C₁₆ po C₁₂. Nejvyšší účinnost proti oběma kmenům prokázaly látky **3bb** a **3ac** ze série **3** obsahující dva dlouhé alkylové řetězce na kvartérním dusíku. Tyto látky byly dokonce účinnější než referenční látky Ajatin a **S5** a srovnatelně účinné se Sanytolem. Směsný dezinfekční přípravek z látek ze série **3** by tak mohl být potenciálně velice účinným novým dezinfekčním přípravkem.

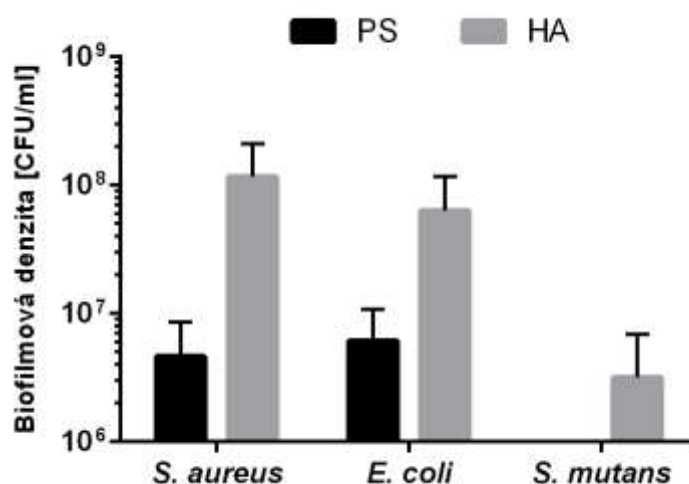


Obrázek 15 - Výsledky kvantitativní suspenzní zkoušky pro bakteriální kmeny *S. aureus* a *P. aeruginosa*

Výsledky zobrazují stanovenou nejnižší efektivní koncentraci (%) testovaných látek dle kvantitativní suspenzní zkoušky ČSN EN 1276 u bakteriálních kmenů *S. aureus* 6538 (**horní graf**) a *P. aeruginosa* 15442 (**dolní graf**). Černé sloupce odpovídají referenčním látkám, oranžové látkám ze série 3 se dvěma alkylovými řetězci, růžové C_{12} derivátům, fialové C_{14} derivátům a zelené C_{16} derivátů látek ze sérií 1, 2 a 4. Červené šrafování značí, že látka nebyla účinná ani při nejvyšší testované koncentraci zobrazené v grafu. Stanovení probíhalo při nízkém znečištění a expoziční čas byl nastaven na 2 minuty.

5.6. Calgary biofilm device

Antibiofilmová účinnost byla stanovena pomocí metodiky CBD pro biofilmy kmenů *S. aureus*, *E. coli* a *S. mutans* formované na plastovém (PS) a hydroxyapatitem (HA) potaženém povrchu. Všechny tři kmeny formovaly výrazně mohutnější biofilm na HA povrchu. Z uvedených kmenů se jako nejslabší biofilmový producent prokázal kmen *S. mutans*, který na PS povrchu neformoval reprodukovatelný a stabilní biofilm, proto nebyl tento model zařazen do testování. Stanovené množství bakterií v jednotlivých biofilmových modelech je uvedeno na **obrázku 16**.



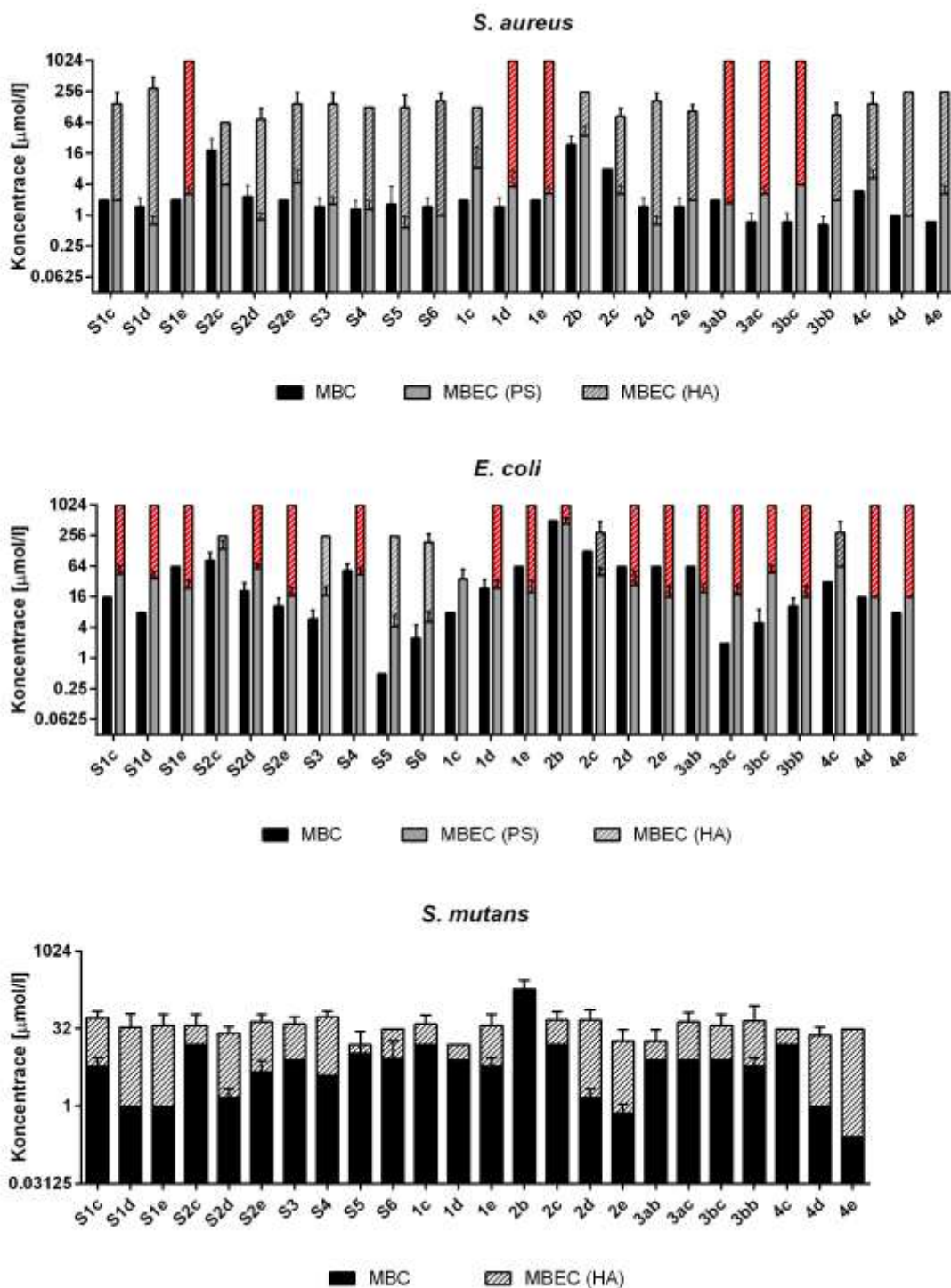
Obrázek 16 - Biofilmový nárůst na Calgary biofilm device

Biofilm tvořený kmeny *S. aureus*, *E. coli* a *S. mutans* na plastovém (PS) a hydroxyapatitem (HA) potaženém povrchu Calgary biofilm device byl kvantifikován pomocí plotnové metody. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota \pm SD; $n = 16$.

Všeobecně byla biofilmová forma testovaných kmenů k antimikrobním látkám méně citlivá než forma planktonní. Nejvýraznější rozdíl byl sledován na mohutněji narostlém biofilmu *E. coli* a *S. aureus* formovaném na HA povrchu. V případě *E. coli* byla potřebná průměrně 370× vyšší koncentrace testovaných KAS a u *S. aureus* 140× vyšší koncentrace i přesto, že biofilm *E. coli* obsahoval pouze 17× více bakterií a biofilm *S. aureus* 11× více bakterií než testovaná bakteriální suspenze v mikrodiluční bujónové metodě. K eradikaci biofilmu formovaném na PS povrchu byla u kmene *S. aureus* potřebná pouze 2,68× vyšší koncentrace testovaných KAS, u kmene *E. coli* pouze 3,54× vyšší koncentrace a u biofilmu kmene *S. mutans* formovaném na HA povrchu byla potřebná pouze 6× vyšší koncentrace. Menší rozdíl v citlivosti oproti planktonní formě

Ize v těchto případech vysvětlit obdobným množstvím bakterií tvořících biofilm jako v bakteriálních suspenzích použitých při mikrodiluční bujónové metodě. Biofilm *S. aureus*, *E. coli* a *S. mutans* v těchto případech obsahoval ve skutečnosti 1,6× (*S. aureus*), 1,2× (*E. coli*) a 2,4× (*S. mutans*) méně bakterií než suspenze pro stanovení MBC. Proto je zřejmé, že bakterie ve formě biofilmu byly i v těchto případech méně citlivé k testovaným látkám, jelikož i přes menší množství bakterií byly zapotřebí vyšší koncentrace testovaných látek. Dle literatury bychom přesto mohli očekávat mnohonásobně vyšší rozdíl v účinných koncentracích ve prospěch biofilmu.^{136,137} U antibiotické léčby byla např. pozorována až 1000× vyšší rezistence u biofilmové formy *P. aeruginosa*.¹³⁸ V případě KAS byl také pozorován více než 100násobný pokles v účinnosti při eliminaci *Legionella pneumophila* v biofilmové formě oproti formě planktonní.¹³⁹ Obdobné výsledky byly pozorovány ve studii Si Yeon a spol. při screeningu izolátů orálních streptokoků, kdy byly naměřené MIC v planktonních kulturách přibližně 100× nižší než minimální biofilm-inhibiční koncentrace.¹⁴⁰

U námi testovaných látek byl zároveň znovu pozorován nárůst v aktivitě vůči G⁺ biofilmu kmene *S. aureus* v závislosti na zkracujícím se alkylovém řetězci od C₁₆ po C₁₂. Naopak v případě G⁻ biofilmu kmene *E. coli* se schopnost eradikace zvyšovala s prodlužujícím se alkylovým řetězcem od C₁₂ po C₁₆. Tyto výsledky odpovídají zjištěnému vlivu délky alkylového řetězce na aktivitu vůči planktonní formě G⁺ a G⁻ kmenů a zároveň více korespondují se závěry již dříve zmíněných studií Daouda a kol.²³ a Gilberta a Moora¹⁸, podle kterých by na G⁺ bakterie měly maximálně působit látky s alkylovým řetězcem C₁₄²³ či C₁₂₋₁₄¹⁸ a na G⁻ bakterie především látky s C₁₆²³ či C₁₄₋₁₆¹⁸. Nejvýraznější antibiofilmová aktivita byla pozorována u referenčních látek **S2c-e**, **S3bb**, **S4**, **S5**, **S6** a nových pyridiniových (série **2**) a imidazoliových (série **4**) typů KAS. Z testovaných látek prokázala série **3** obecně nejnižší antibiofilmovou aktivitu na mohutněji narostlém biofilmu (*S. aureus* a *E. coli* na HA povrchu), přestože při testování v suspenzi vykazovaly velmi dobrý antimikrobiální efekt. Velice dobrou, s ostatními látkami srovnatelnou účinnost nicméně prokázaly na méně narostlém biofilmu (*S. aureus*, *E. coli* na PS a *S. mutans* na HA). Struktura KAS se dvěma kratšími alkylovými řetězci na kvartérním dusíku pravděpodobně znesnadňuje přístup látek do nitra biofilmu. Výsledné hodnoty MBEC jsou uvedeny na **obrázku 17**. Antibiofilmová účinnost nebyla stanovena u derivátů s C₁₀ a C₁₈, jelikož neprokázaly významnou antimikrobiální aktivitu v rámci mikrodiluční bujónové metody.



Obrázek 17 - Stanovené hodnoty MBEC a MBC pro porovnání aktivity KAS vůči biofilmové a planktonní formě bakterií

Minimální biofilm eradikující koncentrace (MBEC; $\mu\text{mol/l}$) byla stanovena metodikou Calgary biofilm device po 24hodinové expozici testovaným látkám. Hodnoty minimální baktericidní koncentrace (MBC; $\mu\text{mol/l}$) byly stanoveny mikrodiluční bujónovou metodou po 24hodinové expozici testovaným látkám. Červené šrafování značí, že látka nebyla účinná ani při nejvyšší

testované koncentraci zobrazené v grafu. **Horní graf:** MBEC pro biofilm *S. aureus* formovaný na plastovém (PS) a hydroxyapatitem (HA) potaženém povrchu. **Prostřední graf:** MBEC pro biofilm *E. coli* formovaný na PS a HA povrchu. **Spodní graf:** MBEC pro biofilm *S. mutans* formovaný na HA povrchu. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty \pm SD ($n = 3-5$).

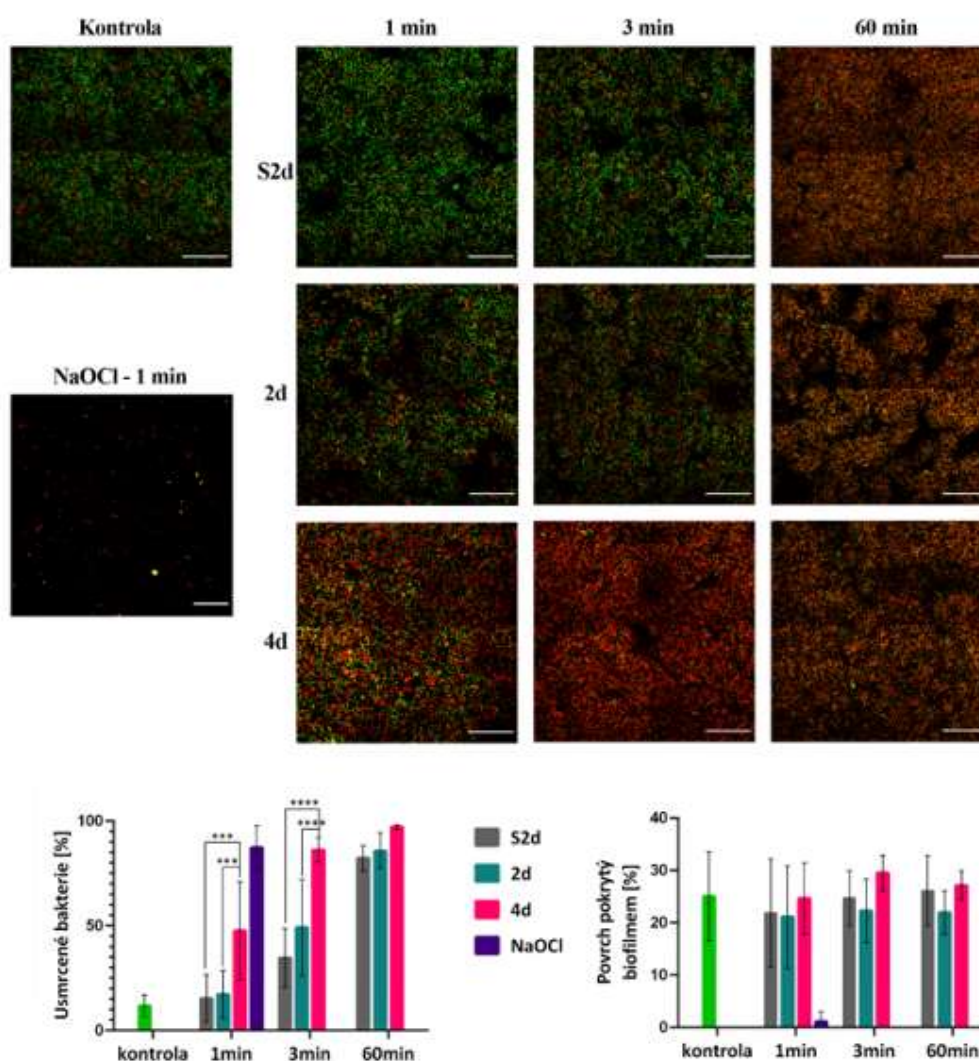
5.7. Biofilmový model *E. faecalis*

U vybraných nových a referenčních látek byla ve spolupráci s výzkumnou skupinou prof. D. Stopara z Biotechnologické fakulty Univerzity v Lublani stanovena antibiofilmová aktivita na pokročilém biofilmovém modelu *E. faecalis*. Zároveň byl otestován potenciál kombinace chemického působení vybraných KAS s mechanickým působením Er:YAG laseru. Získané výsledky byly publikovány viz. **příloha D**.

5.7.1. Efekt KAS

S ohledem na výsledky stanovení aktivity vůči bakteriím v planktonním stavu a antibiofilmové aktivity na základním biofilmovém CBD modelu byly pro stanovení antibiofilmové účinnosti na pokročilém biofilmovém modelu *E. faecalis* vybrány látky ze série **2** a **4**, a to konkrétně deriváty C₁₄ (**2d** a **4d**). Jako referenční látka byl pro následné porovnání vlivu jednoduché strukturní modifikace zvolen taktéž derivát C₁₄ (**S2d**), který je strukturně nejbližší testované látce **2d**. Antibiofilmová aktivita byla stanovena po 1, 3 a 60minutové expozici a efektivita látek byla hodnocena pomocí 2 parametrů: podíl usmrcených a vitálních bakterií a procentuální pokrytí povrchu biofilmem před a po expozici. Před expozicí byla většina bakteriálních buněk v biofilmu (88 ± 6 %) vitální a s prodlužující se dobou inkubace s testovanými látkami se zvyšovala frakce mrtvých (na **obrázku 18** červeně značených) bakterií v biofilmu. Po 60 minutách byla většina bakterií usmrcena (82, 86 a 97 % po expozici látkami **S2d**, **2d** a **4d**). Nejúčinnější sloučeninou proti biofilmu *E. faecalis* byl imidazolový derivát **4d**, který při kratších expozičních časech (1 a 3 minuty) usmrcoval významně větší množství bakterií v biofilmu než látky **2d** a **S2d**. Z praktického hlediska po relativně krátkém 3minutovém působení způsobil smrt většiny bakterií (86 ± 4 %) v biofilmu. Při porovnání účinnosti pyridinových derivátů **2d** a **S2d** nebyl na planktonní formě bakterií pozorován významný rozdíl v aktivitě, nyní ale vykazoval chlorovaný derivát na základě stanoveného průměru podílu usmrcených a vitálních bakterií při všech expozičních časech vyšší účinnost. Pozitivní kontrola reprezentovaná roztokem chlornanu sodného (NaOCl) v koncentraci běžně používané

v klinické praxi při čištění zubních kanálků (3% V/V) snížila pokrytí substrátu biofilmem po 1minutovém působení pod 1 %. Nicméně aplikovaná koncentrace NaOCl byla přibližně 150× vyšší než koncentrace KAS použitá v této studii. Je zajímavé, že expozice KAS výrazně neovlivnila pokrytí povrchu substrátu biofilmem, což naznačuje, že KAS v testované koncentraci pouze usmrcovala bakteriální buňky v biofilmu, ale neodstraňovala je z povrchu. Podobný výsledek byl již dříve pozorován ve studii Luis E. Chávez de Paz a spol. u chlorhexidinu, kdy byly bakterie v biofilmu usmrceny, ale nikoliv odstraněny z povrchu dentinu.¹⁴¹



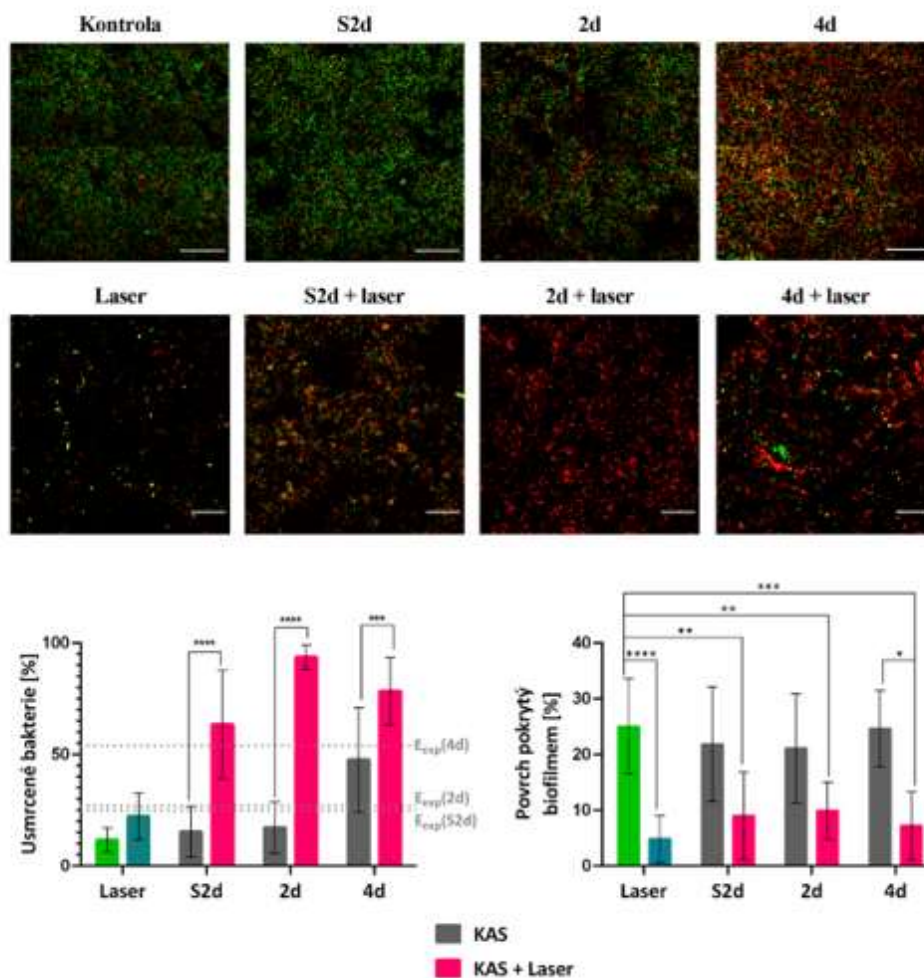
Obrázek 18 - Efekt KAS na biofilmový model *E. faecalis*

Horní část obrázku: Snímky biofilmů *E. faecalis* formovaných na titanovém povrchu po dobu 72 hodin při 37 °C obarvených fluorescenčními sondami pro rozlišení usmrcených a vitálních bakterií pořízených konfokální mikroskopií. V levém sloupci nahoře je zobrazena negativní kontrola, kdy byl biofilm exponován 0,9% roztoku NaCl po dobu 1 minuty. V levém sloupci dole je zobrazena pozitivní kontrola, kdy byl biofilm exponován 3% roztoku NaOCl po dobu 1 minuty. V dalších

sloupcích jsou zobrazeny biofilmy exponované látkám **S2b**, **2c** a **4b** o koncentraci 250 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 1, 3 a 60 minut. Vitální bakterie jsou zobrazeny zeleně, usmrcené červeně. Pro každou testovanou látku a délku expozice jsou na panelu zobrazeny reprezentativní zorná pole. Měřítka na mikrografu představuje 50 μm . **Levý spodní graf:** Vliv testovaných KAS na podíl usmrcených buněk v biofilmu (%). **Pravý spodní graf:** Vliv testovaných KAS na eradikaci bakterií z povrchu (%). Skupinové sloupcové grafy sdružují na ose x výsledky jednotlivých testování s ohledem na dobu expozice a barevně jsou odlišeny jednotlivé testované látky (zelená – negativní kontrola; fialová – NaOCl; šedá – **S2d**; tyrkysová – **2d**; růžová – **4d**). Výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty \pm SD ($n = 9\text{--}27$). Hladina významnosti *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$).

5.7.2. Kombinace KAS s Er:YAG laserem

I přestože byly testované KAS schopné usmrtit většinu bakterií v biofilmu, nezanedbatelná část (např. 18 % u **S2d**) zůstala vitální i po 60minutové expozici. A vzhledem k tomu, že 60 minut je pro klinické použití (např. v zubním lékařství) velmi nepraktický čas, rozhodli jsme se otestovat možné zesílení efektu KAS pomocí kombinace s Er:YAG laserem. Biofilmy byly nejprve vystaveny KAS po dobu 1 minuty a následně laseru po dobu 10 sekund. Kontrolní biofilmy byly vystaveny fyziologickému roztoku (0,9% NaCl) a následně ošetřeny laserem. Výsledné hodnoty podílu usmrcených a vitálních bakterií a schopnost eradikace bakterií z povrchu po fotoakustické irigaci Er:YAG laserem a po kombinované expozici KAS a laseru jsou uvedeny na **obrázku 19**. Samotné působení laseru významně snížilo pokrytí povrchu biofilmem, ale podíl usmrcených a vitálních bakterií nebyl výrazně ovlivněn. U vzorků, které byly nejprve ošetřeny KAS a následně vystaveny působení laseru se podíl mrtvých bakterií významně zvýšil a zároveň se zachoval mechanický efekt laseru odstraňující bakterie z povrchu. Zjevná pozitivní interakce KAS a Er:YAG laseru byla ověřena a přesněji charakterizována jako synergická pomocí Bliss independence modelu. Nejvýraznější synergický účinek byl prokázán u látky **2d**. Výsledky tak poukázaly na případné výhodné využití kombinace laserové terapie s KAS či jinými chemickými látkami, která by mohla v klinické praxi zkrátit expoziční čas a snížit koncentraci chemické látky.



Obrázek 19 - Efekt KAS a Er:YAG laseru na biofilmový model *E. faecalis*

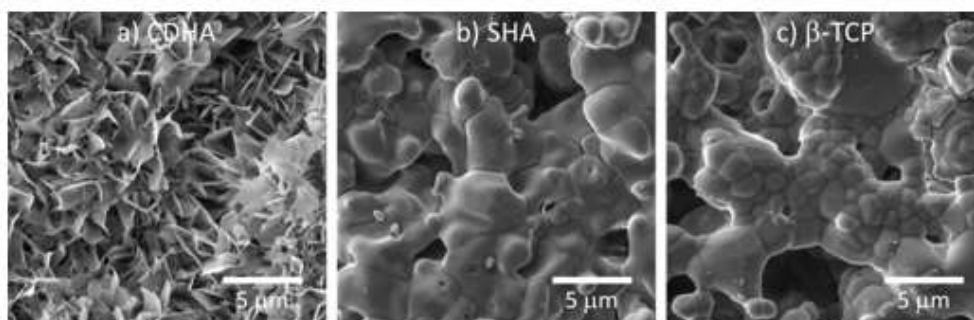
Horní část obrázku: Snímky biofilmů *E. faecalis* formovaných na titanovém povrchu po dobu 72 hodin při 37 °C obarvených fluorescenčními sondami pro rozlišení usmrcených a vitálních bakterií pořizovaných konfokální mikroskopií. Na prvním snímku zleva v horním řádku je zobrazena negativní kontrola, kdy byl biofilm vystaven 0,9% roztoku NaCl po dobu 1 minuty. Na prvním snímku zleva ve druhém řádku je zobrazena pozitivní kontrola, kdy byl biofilm exponován 3% roztoku NaOCl po dobu 1 minuty a následně Er:YAG laseru po dobu 10 sekund. Další snímky v horním řádku zobrazují biofilm ošetřený pouze KAS (**S2b**, **2c**, **4b**) o koncentraci 250 μmol/l) po dobu 1 minuty. V dolním řádku je zobrazen biofilm ošetřený KAS (**S2b**, **2c**, **4b** o koncentraci 250 μmol/l) po dobu 1 minuty a následně Er:YAG laseru po dobu 10 sekund. Vitální bakterie jsou zobrazeny zeleně, usmrcené červeně. Měřítka na mikrografu představuje 50 μm. **Levý spodní graf:** Vliv Er:YAG laseru, testovaných KAS a jejich kombinace na podíl usmrcených buněk v biofilmu (%). V grafu je zároveň vyznačen předpokládaný kombinovaný účinek (E_{exp}) KAS a laseru vypočtený podle Bliss independence modelu. **Pravý spodní graf:** Vliv Er:YAG laseru, testovaných KAS a jejich kombinace na eradikaci bakterií z povrchu (%). Skupinové sloupcové grafy sdružují na ose x výsledky jednotlivých testování s ohledem na dobu expozice a barevně jsou odlišeny jednotlivé testované látky (zelená – negativní kontrola; fialová – NaOCl; šedá – **S2d**;

tyrkysová – **2d**; růžová – **4d**). Výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty \pm SD ($n = 9-27$). Hladina významnosti * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$).

5.8. Model biofilmu na biokompatibilním povrchu

Charakterizace hydroxyapatitových disků

Obrázek 20a ukazuje, že mikrostruktura disků CDHA odpovídá propletené síti deskovitých nanokrystalů s vnitřním povrchem $13 \text{ m}^2/\text{g}$ a pórovitostí v submikrometrovém měřítku 49 %. Výsledkem spékání byla mikrostruktura polyedrických krystalů s hladkým povrchem a póry o velikosti kolem $1 \mu\text{m}$ (**obrázek 20b** a **20c**), jejichž vnitřní povrch je menší než $1 \text{ m}^2/\text{g}$. U SHA se vyvinula větší $4,0 \mu\text{m}$ zrna s mírně nižší 38% pórovitostí oproti $1,5 \mu\text{m}$ zrn s 41% pórovitostí u β -TCP.



Obrázek 20 - Mikrostruktura kalcium-fosfátových materiálů

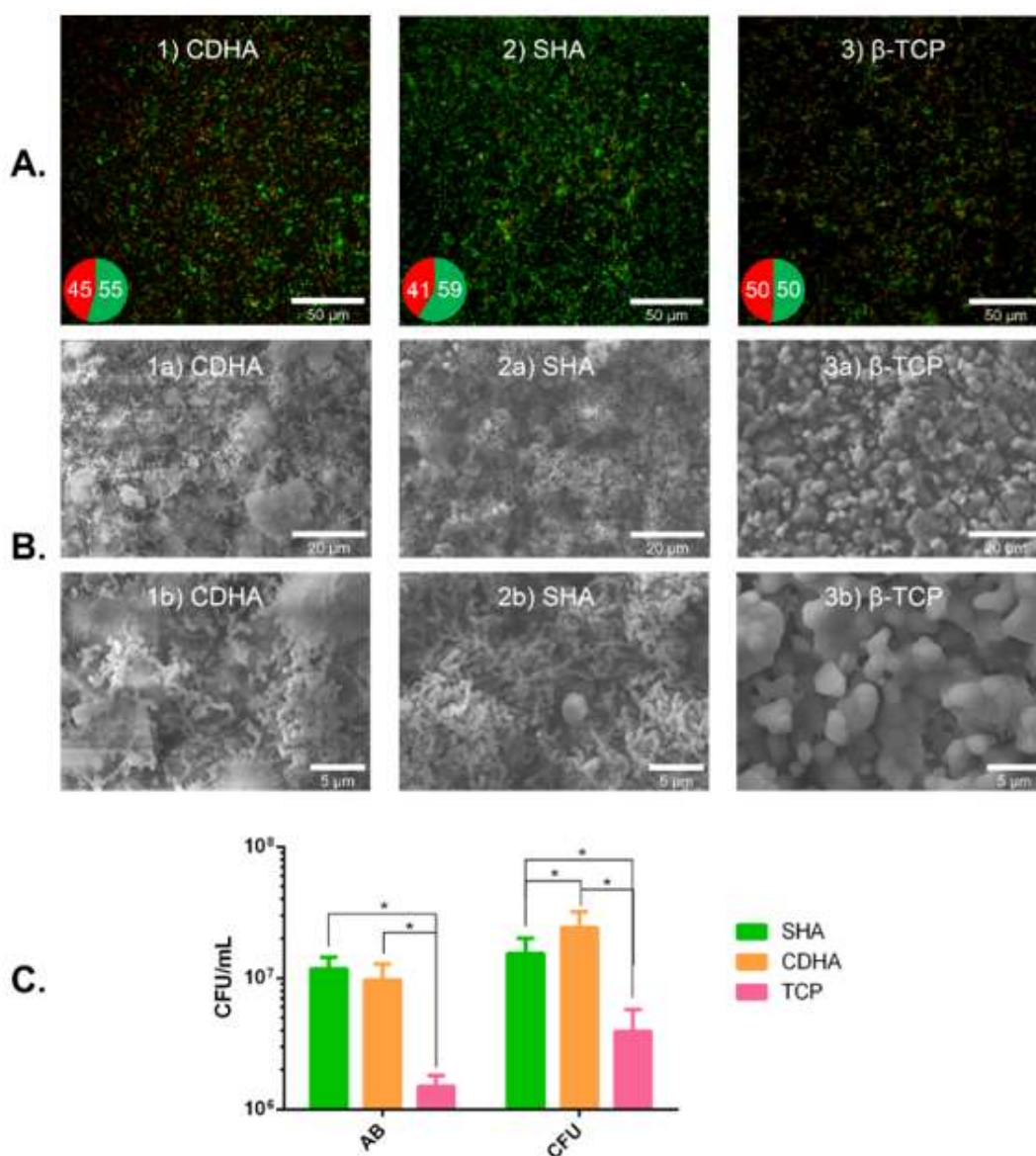
Snímky z rastrovací elektronové mikroskopie: a) kalcium-deficientní hydroxyapatit (CDHA); b) spékaný hydroxyapatit (SHA) a c) β -trikalcium fosfát (β -TCP).

Charakterizace biofilmového modelu

CLSM analýza ukázala, že biofilm formovaný na všech typech disků obsahoval přibližně 50–60 % vitálních bakterií bez významného rozdílu mezi jednotlivými testovanými materiály (**obrázek 21A**). Bakteriální hustota bohužel nebyla kvantifikována pro silnou fluorescenci v pozadí způsobenou adsorpcí fluorescenčních barviv v pórech testovaných materiálů. Subjektivně lze zhodnotit, že na β -TCP bylo pozorováno menší množství bakterií než na CDHA a SHA. Vizuální charakterizace biofilmu pomocí SEM byla ve shodě s CLSM analýzou, tj. SHA a CDHA byly mnohem masivněji pokryty

bakteriemi a tvořily velmi hustě osídlené shluky, zatímco β -TCP byl osídlen mnohem menším množstvím převážně jednotlivých bakterií, které se nacházely přednostně uvnitř pórů. Reprezentativní snímky jsou zobrazeny níže (**obrázek 21B**).

Kvantita vitálního biofilmu byla sledována pomocí metabolismu AB, kdy stanovený počet bakterií v biofilmu byl $1,18 \times 10^7 \pm 2,60 \times 10^6$ CFU/ml na SHA, $9,68 \times 10^6 \pm 3,11 \times 10^6$ CFU/ml na CDHA a $1,50 \times 10^6 \pm 3,22 \times 10^5$ CFU/ml na β -TCP. Počet životaschopných bakterií byl dále potvrzen stanovením CFU/ml sériového ředění bakteriální suspenze, získané ultrazvukovým rozrušením biofilmu a pomocí počítání kolonií na plotnách po inkubaci přes noc. Stanovené CFU/ml odpovídalo $1,55 \times 10^7 \pm 4,73 \times 10^6$ CFU/ml pro SHA, $2,43 \times 10^7 \pm 7,64 \times 10^6$ CFU/ml pro CDHA a $3,92 \times 10^6 \pm 1,87 \times 10^6$ CFU/ml pro β -TCP. Výsledky získané z AB stanovení a výpočtu CFU/ml vykazovaly podle Pearsonova dvoustranného korelačního koeficientu vynikající korelaci ($r_{\text{SHA}} = 0,96$; $r_{\text{CDHA}} = 0,97$; $r_{\beta\text{-TCP}} = 0,99$). Obě stanovení prokázaly významně větší adhezi kmene *S. mutans* a následnou tvorbu biofilmu na površích SHA a CDHA, na rozdíl od β -TCP. AB test neprokázal rozdíly v tvorbě biofilmu mezi SHA a CDHA, ale plotnová metoda ukázala významně větší přítomnost bakterií na CDHA než na SHA povrchu (**obrázek 21C**).



Obrázek 21 - CLSM a SEM analýza biofilmu *S. mutans*

Biofilm byl formován 72 hodin při 35 °C na spékaném hydroxyapatitu (SHA), kalcium-deficientním hydroxyapatitu (CDHA) a β -trikalcium fosfátu (β -TCP). **A. CLSM analýza:** 1) CDHA, 2) SHA a 3) β -TCP. Vitální bakterie jsou zelené, mrtvé červené. Měřítka představuje 50 μ m. Koláčový graf v levém dolním rohu představuje poměr vitálních/neživých bakterií v příslušném biofilmu (průměrné hodnoty). **B. SEM analýza:** 1a-b) CDHA, 2a-b) SHA a 3a-b) β -TCP. Měřítka představuje 20 μ m (a) a 5 μ m (b). **C. Kvantifikace biofilmu pomocí AB stanovení a plotnovou metodou.** Výsledky jsou udány jako průměrné hodnoty \pm SD ($n = 12-14$). Hladina významnosti * ($p < 0,0001$).

Využití modelu pro antimikrobiální testování

Na vytvořeném modelu biofilmu byla pomocí AB metodiky hodnocena antibiofilmová aktivita referenční látky **S5** a **70% ethanolu**. Za úspěšnou antibiofilmovou aktivitu byla považována redukce AB menší než 10 % po 24 hodinách inkubace. Výsledky jsou uvedeny v **tabulce 7**. Kontrolní biofilm zredukoval více než 50 % AB již po 3hodinové inkubaci. Tato rychlá metabolizace AB odpovídá výše kvantifikovanému množství bakterií v biofilmu, tj. cca 10^7 CFU/ml. Za účinné antibiofilmové agens lze považovat z testovaných látek pouze **S5** v koncentraci $\geq 0,1$ %. Při nižší koncentraci (0,01 %) neprokázala látka **S5** dostatečnou antibiofilmovou aktivitu, jelikož již po 3 hodinách inkubace došlo k metabolizaci více než 25 % AB. Množství vitálních bakterií bylo tak 0,01% roztokem **S5** pouze částečně zredukováno oproti kontrolnímu biofilmu. Ethanol vykazoval na biofilm letargický účinek, kdy stanovení po 3 a 5 hodinách neprokázalo významný metabolismus AB. Nicméně po 24 hodinách inkubace se prokázal určitý menší počet přežívajících bakterií, kdy byla stanovena $47 \pm 12\%$ metabolizace AB. V rámci rozsahu disertační práce byl tento nový model pouze zaveden a v současné době je využíván pro testování dalších nových i referenční látek.

Tabulka 7 - Citlivost biofilmu k vybraným standardním dezinfekčním látkám

Dezinfekční látka / Doba inkubace	3h	5h	24h
Kontrolní biofilm	+++	+++	+++
S5 0,2%	-	-	-
S5 0,1%	-	-	-
S5 0,01%	++	++	+++
EtOH 70%	-	-	++

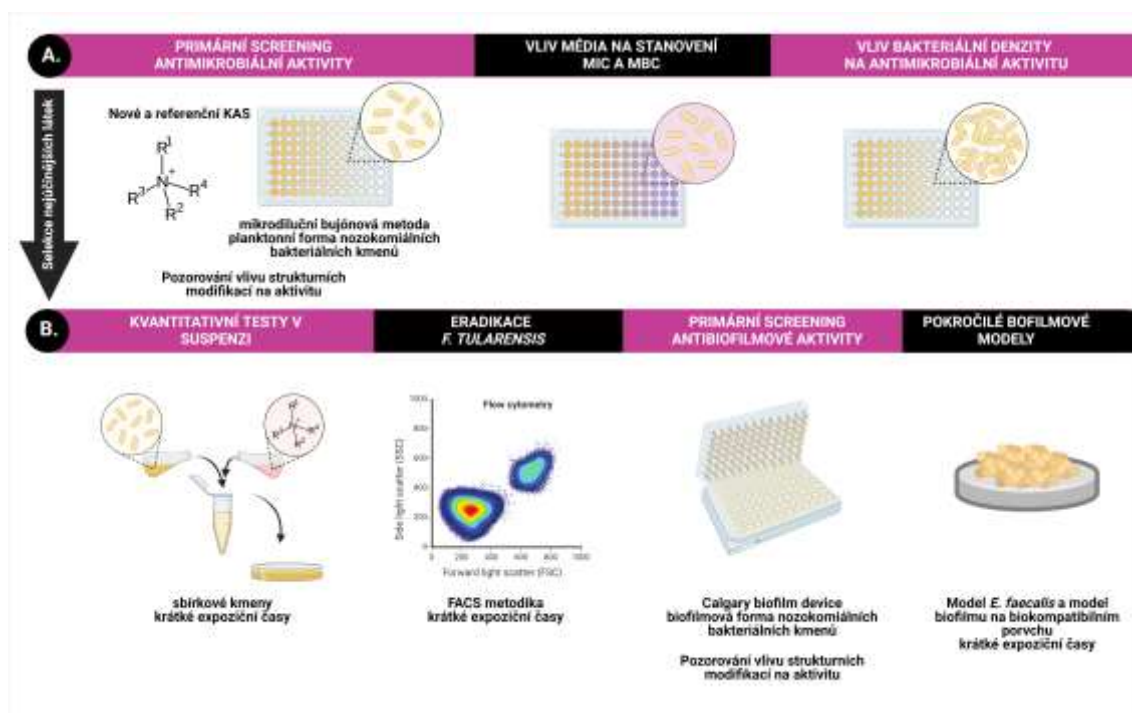
+++ tzn. >50%; ++ tzn. >25–50%; + tzn. >10–25%; - tzn. <10% redukce Alamar Blue

6. ZÁVĚR

V souladu s cíli této disertační práce bylo v rámci postgraduálního studia pomocí mikrodiluční bujónové metody otestováno více než 80 nových látek typu kvartérních amoniových solí. V rámci disertační práce jsou uvedeny nejvýznamnější výsledky 28 látek včetně zvolených standardů. Z nových látek pak několik nejlepších podstoupilo následné testování pomocí kvantitativní suspenzní zkoušky ČSN EN 1276. V rámci této legislativní zkoušky byly použity sbírkové kmeny pro jednodušší porovnatelnost výsledků a krátké expoziční časy pro přiblížení experimentálních podmínek ke klinické praxi. Dále byla u nejlepších látek stanovena účinnost proti *F. tularensis* pomocí metodiky FACS zavedené a optimalizované na pracovišti FVZ UO, která simulovala testování látek na modelu biologicky zneužitelného kmene jako zbraně hromadného ničení. Navíc byla u nejlepších látek stanovena účinnost proti biofilmu *S. aureus*, *E. coli* a *S. mutans* pomocí CBD metodiky, která byla na pracovišti FVZ UO rovněž zavedena a optimalizována. V návaznosti na získané výsledky byla v rámci zahraniční stáže na Univerzitě v Lublani u vybraných látek hodnocena antibiofilmová aktivita a efekt kombinované léčby KAS a Er:YAG laseru na pokročilejším modelu biofilmu *E. faecalis*. A v neposlední řadě byl na základě získaných zkušeností zaveden na domácím pracovišti model biofilmu na biokompatibilním povrchu fosforečnanu vápenatého, jakožto modelu zubního biofilmu. Souhrn experimentálního plánu je zobrazen na **obrázku 22**.

Veškerá stanovení probíhala zároveň s referenčními látkami pro následné porovnání účinnosti nových látek. Úspěšně byly popsány vztahy struktury a antimikrobiální aktivity, kde byl primárně sledován vliv hydrofobní části molekuly (délka dlouhého lipofilního řetězce), který významně ovlivňoval antimikrobní účinnost. Vliv změny ostatních substituentů byl významný spíše z hlediska fyzikálně-chemických vlastností testovaných látek, tedy k praktické použitelnosti. Výsledky disertační práce tak částečně potvrdily, doplnily, a především obohatily tyto strukturálně závislé studie v rámci dlouhodobého horizontu a stále se rozvíjející databáze nových látek.

Výsledky získané v rámci této disertační práce byly součástí odborných publikací, patentových přihlášek a významně posloužily pro splnění cílů grantových projektů uvedených na začátku práce a rozšířily metodické portfolio pracoviště. Všechny zmíněné výsledky tak posouvají některé látky z oblasti základního do aplikovaného výzkumu a zvyšují tak možnost uplatnění v praxi.



Obrázek 22 - Experimentální plán

A: Primární screening antimikrobiální aktivity na planktonní formě bakterií a následná selekce neúčinnějších látek pro **B:** stanovení antimikrobiální aktivity pomocí kvantitativní zkoušky dle ČSN EN 1276, stanovení aktivity vůči *F. tularensis* a antibiofilmové aktivity. Obrázek byl vytvořen pomocí BioRender.com.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Miethke, M. *et al.* Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nat. Rev. Chem.* **5**, 726–749 (2021).
2. Menschutkin, N. Beiträge zur Kenntnis der Affinitätskoeffizienten der Alkylhaloide und der organischen Amine. *Z. Für Phys. Chem.* **5U**, 589–600 (1890).
3. Jacobs, W. A. The bactericidal properties of the quaternary salts of hexamethylenetetramine. *J. Exp. Med.* **23**, 563–568 (1916).
4. Schmidt, T. M. *Encyclopedia of microbiology*. (Elsevier, 2019).
5. McDonnell, G. & Russell, A. D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 147–179 (1999).
6. Hegstad, K. *et al.* Does the Wide Use of Quaternary Ammonium Compounds Enhance the Selection and Spread of Antimicrobial Resistance and Thus Threaten Our Health? *Microb. Drug Resist.* **16**, 91–104 (2010).
7. Soukup, O. *et al.* Synthesis, antimicrobial evaluation and molecular modeling of 5-hydroxyisoquinolinium salt series; the effect of the hydroxyl moiety. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 841–848 (2016).
8. Aupoix, A., Pégot, B. & Vo-Thanh, G. Synthesis of imidazolium and pyridinium-based ionic liquids and application of 1-alkyl-3-methylimidazolium salts as pre-catalysts for the benzoin condensation using solvent-free and microwave activation. *Tetrahedron* **66**, 1352–1356 (2010).
9. Sandle, T., Vijayakumar, R., Saleh Al Aboody, M. & Saravanakumar, S. In vitro fungicidal activity of biocides against pharmaceutical environmental fungal isolates. *J. Appl. Microbiol.* **117**, 1267–1273 (2014).
10. Marek, J. *et al.* Synthesis, Antimicrobial Effect and Surface Properties of Hydroxymethylsubstituted Pyridinium Salts. *Lett. Drug Des. Discov.* **15**, 828–842 (2018).
11. Marek, J. *et al.* Preparation of Quinolinium Salts Differing in the Length of the Alkyl Side Chain. *Molecules* **17**, 6386–6394 (2012).

12. Marek, J. *et al.* Synthesis and Disinfection Effect of the Pyridine-4-aldoxime Based Salts. *Molecules* **20**, 3681–3696 (2015).
13. Bajpai, P. *Recycling and deinking of recovered paper*. (Elsevier, 2014).
14. Rahn, O. & Van Eseltine, W. P. Quaternary ammonium compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* **1**, 173–192 (1947).
15. Marek, J. *Příprava a testování látek obsahujících kvartérní dusík*. (Diplomová práce, Hradec Králové, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, 2012).
16. Bartovská, L. & Sisková, M. *Fyzikální chemie povrchu a koloidních soustav*. (Vysoká škola chemicko-technologická, 1999).
17. Gilbert, P. & McBain, A. J. Potential Impact of Increased Use of Biocides in Consumer Products on Prevalence of Antibiotic Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 189–208 (2003).
18. Gilbert, P. & Moore, L. E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 703–715 (2005).
19. Shah, A. *et al.* Micelles as Soil and Water Decontamination Agents. *Chem. Rev.* **116**, 6042–6074 (2016).
20. Gerba, C. P. Quaternary Ammonium Biocides: Efficacy in Application. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 464–469 (2015).
21. Tischer, M., Pradel, G., Ohlsen, K. & Holzgrabe, U. Quaternary ammonium salts and their antimicrobial potential: targets or nonspecific interactions? *ChemMedChem* **7**, 22–31 (2012).
22. Salt, W. G. & Wiseman, D. The relation between the uptake of cetyltrimethylammonium bromide by *Escherichia coli* and its effects on cell/growth and viability. *J. Pharm. Pharmacol.* **22**, 261–264 (2011).
23. Daoud, N. N., Dickinson, N. A. & Gilbert, P. Antimicrobial activity and physico-chemical properties of some alkyldimethylbenzylammonium chlorides. *Microbios* **37**, 73–85 (1983).

24. Dolezal, R. *et al.* Towards understanding the mechanism of action of antibacterial N-alkyl-3-hydroxypyridinium salts: Biological activities, molecular modeling and QSAR studies. *Eur. J. Med. Chem.* **121**, 699–711 (2016).
25. Benkova, M. *et al.* Synthesis, Antimicrobial Effect and Lipophilicity-Activity Dependence of Three Series of Dichained N-Alkylammonium Salts. *ChemistrySelect* **4**, 12076–12084 (2019).
26. Obłąk, E., Futoma-Kołodziej, B. & Wieczyńska, A. Biological activity of quaternary ammonium salts and resistance of microorganisms to these compounds. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 22 (2021).
27. Hympanova, M. *et al.* The Antibacterial Effects of New N-Alkylpyridinium Salts on Planktonic and Biofilm Bacteria. *Front. Microbiol.* **11**, 573951 (2020).
28. Markova, A. *et al.* Synthesis and Decontamination Effect on Chemical and Biological Agents of Benzoxonium-Like Salts. *Toxics* **9**, 222 (2021).
29. Jennings, M. C., Ator, L. E., Paniak, T. J., Minbiole, K. P. C. & Wuest, W. M. Biofilm-Eradicating Properties of Quaternary Ammonium Amphiphiles: Simple Mimics of Antimicrobial Peptides. *ChemBioChem* **15**, 2211–2215 (2014).
30. Labena, A., Hegazy, M. A., Sami, R. M. & Hozzein, W. N. Multiple Applications of a Novel Cationic Gemini Surfactant: Anti-Microbial, Anti-Biofilm, Biocide, Salinity Corrosion Inhibitor, and Biofilm Dispersion (Part II). *Molecules* **25**, 1348 (2020).
31. Rasmussen, T. B. & Givskov, M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**, 149–161 (2006).
32. Houari, A. & Di Martino, P. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**, 652–656 (2007).
33. Paluch, E., Piecuch, A., Obłąk, E., Lamch, Ł. & Wilk, K. A. Antifungal activity of newly synthesized chemodegradable dicephalic-type cationic surfactants. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **164**, 34–41 (2018).
34. Eleršek, T., Kosi, G., Turk, T., Pohleven, F. & Sepčić, K. Influence of polymeric 3-alkylpyridinium salts from the marine sponge *Reniera sarai* on the growth of algae and wood decay fungi. *Biofouling* **24**, 137–143 (2008).

35. Imazato, S., Torii, M., Tsuchitani, Y., McCabe, J. F. & Russell, R. R. B. Incorporation of Bacterial Inhibitor into Resin Composite. *J. Dent. Res.* **73**, 1437–1443 (1994).
36. Regis, R. R. *et al.* Physical Properties of an Acrylic Resin after Incorporation of an Antimicrobial Monomer: Physical Features of Acrylic Resin Containing MUPB. *J. Prosthodont.* **20**, 372–379 (2011).
37. Schallenhammer, S. A. *et al.* Hybrid BisQACs: Potent Biscationic Quaternary Ammonium Compounds Merging the Structures of Two Commercial Antiseptics. *ChemMedChem* **12**, 1931–1934 (2017).
38. Rasmussen, C. A., Kaufman, P. L. & Kiland, J. A. Benzalkonium Chloride and Glaucoma. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **30**, 163–169 (2014).
39. Denyer, S. P. Mechanisms of action of antibacterial biocides. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **36**, 227–245 (1995).
40. Baigelman, W. & Chodosh, S. Bronchodilator Action of the Anticholinergic Drug, Ipratropium Bromide (Sch 1000), as an Aerosol in Chronic Bronchitis and Asthma. *Chest* **71**, 324–328 (1977).
41. Clancy, M. In patients with head injuries who undergo rapid sequence intubation using succinylcholine, does pretreatment with a competitive neuromuscular blocking agent improve outcome? A literature review. *Emerg. Med. J.* **18**, 373–375 (2001).
42. Zayed, S. I. M. Flow Injection Potentiometric Determination of Pancuronium Bromide in Pharmaceutical Preparation and Urine Samples Using Modified Carbon Paste Electrodes. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **59**, 254–259 (2011).
43. Makvandi, P., Jamaledin, R., Jabbari, M., Nikfarjam, N. & Borzacchiello, A. Antibacterial quaternary ammonium compounds in dental materials: A systematic review. *Dent. Mater.* **34**, 851–867 (2018).
44. Morrison, K. R., Allen, R. A., Minbiole, K. P. C. & Wuest, W. M. More QACs, more questions: Recent advances in structure activity relationships and hurdles in understanding resistance mechanisms. *Tetrahedron Lett.* **60**, 150935 (2019).

45. Swartjes, J. J. T. M. *et al.* Current Developments in Antimicrobial Surface Coatings for Biomedical Applications. *Curr. Med. Chem.* **22**, 2116–2129 (2015).
46. Paiva, S. S. M. *et al.* Molecular Microbiological Evaluation of Passive Ultrasonic Activation as a Supplementary Disinfecting Step: A Clinical Study. *J. Endod.* **39**, 190–194 (2013).
47. Rôças, I. N., Lima, K. C. & Siqueira Jr, J. F. Reduction in bacterial counts in infected root canals after rotary or hand nickel-titanium instrumentation - a clinical study. *Int. Endod. J.* **46**, 681–687 (2013).
48. Nair, P. N. R., Henry, S., Cano, V. & Vera, J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology* **99**, 231–252 (2005).
49. Vera, J. *et al.* One- versus Two-visit Endodontic Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: A Histobacteriologic Study. *J. Endod.* **38**, 1040–1052 (2012).
50. Ricucci, D., Siqueira, J. F., Bate, A. L. & Pitt Ford, T. R. Histologic Investigation of Root Canal-treated Teeth with Apical Periodontitis: A Retrospective Study from Twenty-four Patients. *J. Endod.* **35**, 493–502 (2009).
51. Zhang, Y., Chen, Y., Hu, Y., Huang, F. & Xiao, Y. Quaternary ammonium compounds in dental restorative materials. *Dent. Mater. J.* **37**, 183–191 (2018).
52. Drummond, J. L. Degradation, Fatigue, and Failure of Resin Dental Composite Materials. *J. Dent. Res.* **87**, 710–719 (2008).
53. Ferracane, J. L. Resin composite—State of the art. *Dent. Mater.* **27**, 29–38 (2011).
54. Samuel, S. P. *et al.* Mechanical properties of experimental dental composites containing a combination of mesoporous and nonporous spherical silica as fillers. *Dent. Mater.* **25**, 296–301 (2009).
55. Kidd, E. A., Toffenetti, F. & Mjör, I. A. Secondary caries. *Int. Dent. J.* **42**, 127–138 (1992).

56. Li, F., Weir, M. D., Chen, J. & Xu, H. H. K. Comparison of quaternary ammonium-containing with nano-silver-containing adhesive in antibacterial properties and cytotoxicity. *Dent. Mater.* **29**, 450–461 (2013).
57. Papagiannoulis, L., Kakaboura, A. & Eliades, G. In vivo vs in vitro anticariogenic behavior of glass-ionomer and resin composite restorative materials. *Dent. Mater.* **18**, 561–569 (2002).
58. Imazato, S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent. Mater.* **19**, 449–457 (2003).
59. Beyth, N., Domb, A. J. & Weiss, E. I. An in vitro quantitative antibacterial analysis of amalgam and composite resins. *J. Dent.* **35**, 201–206 (2007).
60. Cheng, L. *et al.* Dental plaque microcosm biofilm behavior on calcium phosphate nanocomposite with quaternary ammonium. *Dent. Mater.* **28**, 853–862 (2012).
61. Cheng, L. *et al.* Antibacterial Nanocomposite with Calcium Phosphate and Quaternary Ammonium. *J. Dent. Res.* **91**, 460–466 (2012).
62. He, J., Söderling, E., Lassila, L. V. J. & Vallittu, P. K. Incorporation of an antibacterial and radiopaque monomer in to dental resin system. *Dent. Mater.* **28**, e110–e117 (2012).
63. He, J., Söderling, E., Vallittu, P. K. & Lassila, L. V. J. Investigation of double bond conversion, mechanical properties, and antibacterial activity of dental resins with different alkyl chain length quaternary ammonium methacrylate monomers (QAM). *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **24**, 565–573 (2013).
64. Zhang, N. *et al.* A novel protein-repellent dental composite containing 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. *Int. J. Oral Sci.* **7**, 103–109 (2015).
65. Zhang, K. *et al.* Effect of Antibacterial Dental Adhesive on Multispecies Biofilms Formation. *J. Dent. Res.* **94**, 622–629 (2015).
66. Wang, S. *et al.* Antibacterial Effect of Dental Adhesive Containing Dimethylaminododecyl Methacrylate on the Development of *Streptococcus mutans* Biofilm. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 12791–12806 (2014).

67. Pupo, Y. *et al.* Effect of a Novel Quaternary Ammonium Methacrylate Polymer (QAMP) on Adhesion and Antibacterial Properties of Dental Adhesives. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 8998–9015 (2014).
68. Pupo, Y. M. *et al.* An innovative quaternary ammonium methacrylate polymer can provide improved antimicrobial properties for a dental adhesive system. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **24**, 1443–1458 (2013).
69. Xiao, Y.-H. *et al.* Antibacterial activity and bonding ability of an adhesive incorporating an antibacterial monomer DMAE-CB. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **90B**, 813–817 (2009).
70. Li, F. *et al.* Anti-biofilm Effect of Dental Adhesive with Cationic Monomer. *J. Dent. Res.* **88**, 372–376 (2009).
71. Sabatini, C. & Pashley, D. H. Aging of adhesive interfaces treated with benzalkonium chloride and benzalkonium methacrylate. *Eur. J. Oral Sci.* **123**, 102–107 (2015).
72. Diaz-Arnold, A. M., Vargas, M. A., Shaull, K. L., Laffoon, J. E. & Qian, F. Flexural and fatigue strengths of denture base resin. *J. Prosthet. Dent.* **100**, 47–51 (2008).
73. Gendreau, L. & Loewy, Z. G. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis: Denture Stomatitis. *J. Prosthodont.* **20**, 251–260 (2011).
74. Hoshi, N. *et al.* Management of oral candidiasis in denture wearers. *J. Prosthodont. Res.* **55**, 48–52 (2011).
75. Takahashi, N. *et al.* Evaluation of the durability and antiadhesive action of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine grafting on an acrylic resin denture base material. *J. Prosthet. Dent.* **112**, 194–203 (2014).
76. Pesci-Bardon, C., Fosse, T., Serre, D. & Madinier, I. In vitro antiseptic properties of an ammonium compound combined with denture base acrylic resin. *Gerodontology* **23**, 111–116 (2006).
77. Pesci-Bardon, C., Fosse, T., Madinier, I. & Serre, D. In vitro new dialysis protocol to assay the antiseptic properties of a quaternary ammonium compound polymerized with denture acrylic resin. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**, 226–231 (2004).

78. Massara, M. L. A., Alves, J. B. & Brandão, P. R. G. Atraumatic restorative treatment: clinical, ultrastructural and chemical analysis. *Caries Res.* **36**, 430–436 (2002).
79. Taifour, D., Frencken, J. E., Beiruti, N., van't Hof, M. A. & Truin, G. J. Effectiveness of Glass-Ionomer (ART) and Amalgam Restorations in the Deciduous Dentition: Results after 3 Years. *Caries Res.* **36**, 437–444 (2002).
80. Francci, C. *et al.* Fluoride Release from Restorative Materials and Its Effects on Dentin Demineralization. *J. Dent. Res.* **78**, 1647–1654 (1999).
81. Smales, R. J. & Gao, W. In vitro caries inhibition at the enamel margins of glass ionomer restoratives developed for the ART approach. *J. Dent.* **28**, 249–256 (2000).
82. Carvalho, C. K. S. & Bezerra, A. C. B. Microbiological assessment of saliva from children subsequent to atraumatic restorative treatment (ART): Microbiological Assessment of saliva after ART. *Int. J. Paediatr. Dent.* **13**, 186–192 (2003).
83. Weerheijm, K. L. & Groen, H. J. The residual caries dilemma. *Community Dent. Oral Epidemiol.* **27**, 436–441 (1999).
84. Weerheijm, K. L., Kreulen, C. M., de Soet, J. J., Groen, H. J. & van Amerongen, W. E. Bacterial Counts in Carious Dentine under Restorations: 2-Year in vivo Effects. *Caries Res.* **33**, 130–134 (1999).
85. Dimkov, A., Nicholson, W. J., Gjorgievska, E. & Booth, S. Compressive strength and setting time determination of glass-ionomer cements incorporated with cetylpyridinium chloride and benzalkonium chloride. *Prilozi* **33**, 243–263 (2012).
86. Deepalakshmi, M., Porni, S., Miglani, R., Rajamani, I. & Ramachandran, S. Evaluation of the antibacterial and physical properties of glass ionomer cements containing chlorhexidine and cetrimide: An in-vitro study. *Indian J. Dent. Res.* **21**, 552 (2010).
87. Tüzüner, T. *et al.* Antibacterial Activity and Physical Properties of Conventional Glass-ionomer Cements Containing Chlorhexidine Diacetate/Cetrimide Mixtures. *J. Esthet. Restor. Dent.* **23**, 46–55 (2011).

88. Zilberman, M. & Elsner, J. Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *J. Control Release* **130**, 202–215 (2008).
89. Hendriks, J. G. E., van Horn, J. R., van der Mei, H. C. & Busscher, H. J. Backgrounds of antibiotic-loaded bone cement and prosthesis-related infection. *Biomaterials* **25**, 545–556 (2004).
90. Deb, S., Doiron, R., DiSilvio, L., Punyani, S. & Singh, H. PMMA bone cement containing a quaternary amine comonomer with potential antibacterial properties. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **85B**, 130–139 (2008).
91. Punyani, S., Deb, S. & Singh, H. Contact killing antimicrobial acrylic bone cements: preparation and characterization. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **18**, 131–145 (2007).
92. Abid, C. K. V. Z., Jain, S., Jackeray, R., Chattopadhyay, S. & Singh, H. Formulation and characterization of antimicrobial quaternary ammonium dendrimer in poly(methyl methacrylate) bone cement: antimicrobial quaternary ammonium dendrimer in PMMA bone cement. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **105**, 521–530 (2017).
93. Tan, H., Guo, S., Yang, S., Xu, X. & Tang, T. Physical characterization and osteogenic activity of the quaternized chitosan-loaded PMMA bone cement. *Acta Biomater.* **8**, 2166–2174 (2012).
94. Tan, H. *et al.* The use of quaternised chitosan-loaded PMMA to inhibit biofilm formation and downregulate the virulence-associated gene expression of antibiotic-resistant staphylococcus. *Biomaterials* **33**, 365–377 (2012).
95. Shi, Z., Neoh, K. G., Kang, E. T. & Wang, W. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials* **27**, 2440–2449 (2006).
96. Beyth, S. *et al.* Antibacterial activity of bone cement containing quaternary ammonium polyethyleneimine nanoparticles. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 854–855 (2014).

97. Peng, Z., Ao, H., Wang, L., Guo, S. & Tang, T. Quaternised chitosan coating on titanium provides a self-protective surface that prevents bacterial colonisation and implant-associated infections. *RSC Adv.* **5**, 54304–54311 (2015).
98. Masini, B. D., Stinner, D. J., Waterman, S. M. & Wenke, J. C. Bacterial Adherence to Suture Materials. *J. Surg. Educ.* **68**, 101–104 (2011).
99. Dastjerdi, R. & Montazer, M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **79**, 5–18 (2010).
100. Windler, L., Height, M. & Nowack, B. Comparative evaluation of antimicrobials for textile applications. *Environ. Int.* **53**, 62–73 (2013).
101. Yu, D., Cai, J. Y., Liu, X., Church, J. S. & Wang, L. Novel immobilization of a quaternary ammonium moiety on keratin fibers for medical applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **70**, 236–240 (2014).
102. Meghil, M. M. *et al.* Novel Coating of Surgical Suture Confers Antimicrobial Activity Against *Porphyromonas gingivalis* and *Enterococcus faecalis*. *J. Periodontol.* **86**, 788–794 (2015).
103. Kang, C. K. *et al.* Antibacterial cotton fibers treated with silver nanoparticles and quaternary ammonium salts. *Carbohydr. Polym.* **151**, 1012–1018 (2016).
104. Tran, P. L. *et al.* A study on the ability of quaternary ammonium groups attached to a polyurethane foam wound dressing to inhibit bacterial attachment and biofilm formation: pDADMAC-PU biofilm inhibition. *Wound Repair Regen.* **23**, 74–81 (2015).
105. Yari, A., Yeganeh, H. & Bakhshi, H. Synthesis and evaluation of novel absorptive and antibacterial polyurethane membranes as wound dressing. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **23**, 2187–2202 (2012).
106. DeForest, C. A. & Anseth, K. S. Advances in Bioactive Hydrogels to Probe and Direct Cell Fate. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **3**, 421–444 (2012).
107. Pilakasiri, K. *et al.* Efficacy of chitin-PAA-GTMAC gel in promoting wound healing: animal study. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **22**, 2497–2504 (2011).

108. Li, J., Sha, Z., Zhang, W., Tao, F. & Yang, P. Preparation and antibacterial properties of gelatin grafted with an epoxy silicone quaternary ammonium salt. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **27**, 1017–1028 (2016).
109. Costerton, Stewart & Greenberg. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318–1322 (1999).
110. Flemming, Neu & Wozniak. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *J. Bacteriol.* **189**, 7945–7947 (2007).
111. Nealson, K. H., Platt, T. & Hastings, J. W. Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *J. Bacteriol.* **104**, 313–322 (1970).
112. Zhou, L., Zhang, Y., Ge, Y., Zhu, X. & Pan, J. Regulatory Mechanisms and Promising Applications of Quorum Sensing-Inhibiting Agents in Control of Bacterial Biofilm Formation. *Front. Microbiol.* **11**, 589640 (2020).
113. Nealson, K. H. & Hastings, J. W. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* **43**, 496–518 (1979).
114. Engebrecht, J. & Silverman, M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 4154–4158 (1984).
115. Sturme, M. H. J. *et al.* Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **81**, 233–243 (2002).
116. Paczkowski, J. E. *et al.* Flavonoids Suppress *Pseudomonas aeruginosa* Virulence through Allosteric Inhibition of Quorum-sensing Receptors. *J. Biol. Chem.* **292**, 4064-4076 (2017).
117. Soukup, O. *et al.* The wide-spectrum antimicrobial effect of novel N-alkyl monoquaternary ammonium salts and their mixtures; the QSAR study against bacteria. *Eur. J. Med. Chem.* **206**, 112584 (2020).
118. Kuca, K. *et al.* Preparation of Benzalkonium Salts Differing in the Length of a Side Alkyl Chain. *Molecules* **12**, 2341–2347 (2007).

119. Marek, J. *et al.* Preparation of the Pyridinium Salts Differing in the Length of the N-Alkyl Substituent. *Molecules* **15**, 1967–1972 (2010).
120. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 11th ed. CLSI standard M07. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA. 2018.
121. Pettit, R. K. *et al.* Microplate Alamar Blue Assay for Staphylococcus epidermidis Biofilm Susceptibility Testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2612–2617 (2005).
122. Pettit, R. K., Weber, C. A. & Pettit, G. R. Application of a high throughput Alamar blue biofilm susceptibility assay to Staphylococcus aureus biofilms. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **8**, 28 (2009).
123. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
124. Bliss, C. I. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* **26**, 585–615 (1939).
125. Foucquier, J. & Guedj, M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol. Res. Perspect.* **3**, e00149 (2015).
126. Montufar, E. B., Vojtova, L., Celko, L. & Ginebra, M.-P. Calcium Phosphate Foams: Potential Scaffolds for Bone Tissue Modeling in Three Dimensions. *Methods Mol. Biol.* **1612**, 79–94 (2017).
127. Chen, L. *et al.* Application Booklet: Leica EM CPD300 Automated Critical Point Dryer. (Leica Mikrosysteme GmbH, 2014).
128. Russell, A. D. & Gould, G. W. Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* **17**, 167S-195S (1988).
129. Kadry, A. A., Serry, F. M., El-Ganiny, A. M. & El-Baz, A. M. Integron occurrence is linked to reduced biocide susceptibility in multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa. *Br. J. Biomed. Sci.* **74**, 78–84 (2017).

130. Morita, Y., Tomida, J. & Kawamura, Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front. Microbiol.* **4**, (2014).
131. Benkova, M. *Testování antimikrobiální účinnosti nově syntetizovaných látek* (Disertační práce, Hradec Králové, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, 2020).
132. Obląg, E., Piecuch, A., Rewak-Soroczyńska, J. & Paluch, E. Activity of gemini quaternary ammonium salts against microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 625–632 (2019).
133. Obląg, E., Piecuch, A., Guz-Regner, K. & Dworniczek, E. Antibacterial activity of gemini quaternary ammonium salts. *FEMS Microbiol. Lett.* **350**, 190–198 (2014).
134. Zhang, S. *et al.* Antibacterial Activity, in Vitro Cytotoxicity, and Cell Cycle Arrest of Gemini Quaternary Ammonium Surfactants. *Langmuir* **31**, 12161–12169 (2015).
135. Rémy, B. *et al.* Interference in Bacterial Quorum Sensing: A Biopharmaceutical Perspective. *Front. Pharmacol.* **9**, 203 (2018).
136. Morck, D. W. *et al.* Comparative evaluation of fleroxacin, ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and gentamicin as treatments of catheter-associated urinary tract infection in a rabbit model. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **4**, S21–S27 (1994).
137. Uruén, C., Chopo-Escuin, G., Tommassen, J., Mainar-Jaime, R. C. & Arenas, J. Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. *Antibiotics.* **10**, 3 (2020).
138. Nickel, J. C., Ruseska, I., Wright, J. B. & Costerton, J. W. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**, 619–624 (1985).
139. Kimiran-Erdem, A., Sanli-Yurudu, N. O. & Cotuk, A. Efficacy of a quaternary ammonium compound against planktonic and sessile populations of different *Legionella pneumophila* strains. *Ann. Microbiol.* **57**, 121–125 (2007).
140. So Yeon, L. & Si Young, L. Susceptibility of Oral Streptococci to Chlorhexidine and Cetylpyridinium Chloride. *Biocontrol Sci.* **24**, 13–21 (2019).

141. Paz, L. E. C. de, Bergenholtz, G. & Svensäter, G. The Effects of Antimicrobials on Endodontic Biofilm Bacteria. *J. Endod.* **36**, 70–77 (2010).

8. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha A - Postupy přípravy reagensů pro kvantitativní suspenzní zkoušku

Příloha B - Tabulka minimálních inhibičních a baktericidních koncentrací nově připravených látek

Příloha C - Tabulka minimálních inhibičních a baktericidních koncentrací nově připravených látek

Příloha D - Vybraná publikace I.

Příloha E - Vybraná publikace II.

Příloha F - Vybraná publikace III.

Příloha A - Postupy přípravy reagensů pro kvantitativní suspenzní zkoušku

1. Zředovací roztok

V 1000 ml vody se rozpustí 1 g tryptonu (pankreatického hydrolyzátu kaseinu) a 8,5 g NaCl. Roztok se vysterilizuje v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Po sterilizaci se zkontroluje pH 7,0±0,2.

2. Roztok interferující látky (pro nízké znečištění)

0,30 g bovinního albuminu frakce V se rozpustí ve 100 ml zředovacího roztoku. Roztok se sterilizuje membránovou filtrací. Roztok se skladuje při 4 °C, použitelnost je 1 měsíc. Připravený roztok je 10× koncentrovanější, než je finální koncentrace při zkoušce. Konečná koncentrace albuminu při zkoušce je 0,3 g/l.

3. Neutralizační činidlo pro KAS

Ve 100 ml fyziologického roztoku se za stálého míchání a mírného zahřívání rozpustí 3 g Tweenu-80, 300 mg lecitinu a 400 mg dodecylsírany sodného. Po rozpuštění se roztok nechá vychladnout a sterilizuje se membránovou filtrací.

4. Tvrdá voda pro ředění roztoků

Roztok A: V 1000 ml vody se rozpustí 19,84 g MgCl₂ a 46,24 g CaCl₂. Roztok je sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut a následně skladován při 4 °C max. 1 měsíc.

Roztok B: V 1000 ml vody se rozpustí 35,02 g NaHCO₃. Roztok je sterilizován membránovou filtrací a skladován při 4 °C max. 1 týden.

Do 1000 ml vody se přidá 6 ml roztoku A a 8 ml roztoku B, promíchá se a zkontroluje se pH 7,0±0,2 (popř. lze upravit roztokem NaOH (40 g/l, přibližně 1M) nebo HCl (36,5 g/l, přibližně 1M). Tvrdá voda musí být čerstvě připravena za aseptických podmínek a použita během 12 hodin.

Příloha B - Tabulka minimálních inhibičních a baktericidních koncentrací nově připravených látek

Minimální inhibiční koncentrace po 24 hodinách (μmol/l)								
Minimální inhibiční koncentrace po 48 hodinách (μmol/l)								
Minimální baktericidní koncentrace po 24 hodinách (μmol/l)								
Označení	STAU	MRSA	STEP	VRE	ESCO	KLPN -	KLPN +	PSAE MR
1b	5,86	11,72	46,88	125,00	250,00	375,00	500,00	> 500
	5,86	11,72	46,88	125,00	250,00	375,00	500,00	> 500
	5,86	23,44	62,50	125,00	250,00	375,00	500,00	> 500
1c	1,95	15,63	11,72	15,63	7,81	31,25	31,25	125,00
	1,95	15,63	15,63	23,44	7,81	31,25	31,25	125,00
	1,95	15,63	15,63	23,44	7,81	31,25	31,25	125,00
1d	0,49	4,88	2,93	7,81	23,44	31,25	31,25	> 62,5
	0,98	5,86	5,86	15,63	23,44	31,25	31,25	> 62,5
	1,47	11,72	5,86	15,63	23,44	31,25	31,25	> 62,5
1e	0,98	4,88	2,93	11,72	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
	1,47	5,86	5,86	11,72	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
	1,95	11,72	5,86	11,72	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
1f	2,20	15,63	9,77	15,63	23,44	>31,25	>31,25	>31,25
	2,45	15,63	11,72	15,63	23,44	>31,25	>31,25	>31,25
	2,45	15,63	>31,25	23,44	23,44	>31,25	>31,25	>31,25
2b	15,63	31,25	250,00	500,00	500,00	500,00	500,00	500,00
	15,63	46,88	250,00	500,00	500,00	500,00	500,00	> 500
	23,44	93,75	250,00	500,00	500,00	500,00	500,00	> 500
2c	2,93	11,72	31,25	62,50	125,00	187,50	250,00	250,00
	3,91	19,53	46,88	93,75	125,00	187,50	375,00	250,00
	7,81	23,44	46,88	93,75	125,00	187,50	375,00	250,00
2d	0,49	3,91	5,86	15,63	62,50	125,00	125,00	> 125
	1,47	3,91	7,81	31,25	62,50	125,00	125,00	> 125
	1,47	11,72	11,72	31,25	62,50	125,00	125,00	> 125
2e	0,49	2,93	3,91	31,25	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
	1,47	3,91	7,81	31,25	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
	1,47	11,72	7,81	46,88	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
2f	0,49	2,45	5,86	31,25	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
	0,74	2,93	5,86	46,88	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
	1,47	5,86	7,81	62,50	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5
3ab	1,47	5,86	2,93	7,81	5,86	15,63	31,25	93,75
	1,95	5,86	2,93	11,72	5,86	15,63	31,25	93,75
	1,95	7,81	2,93	11,72	7,81	31,25	31,25	187,50
3ac	0,74	3,91	3,91	3,91	1,95	15,63	15,63	> 125
	0,74	3,91	3,91	3,91	1,95	15,63	15,63	> 125
	0,74	3,91	3,91	7,81	1,95	15,63	23,44	> 125
3bc	0,74	1,95	7,81	3,91	4,88	31,25	46,88	> 125
	0,74	1,95	7,81	3,91	4,88	31,25	46,88	> 125
	0,74	1,95	7,81	3,91	4,88	31,25	46,88	> 125
3bb	0,65	1,95	1,95	3,26	7,81	5,21	10,42	31,25
	0,65	1,95	2,60	3,91	7,81	5,21	15,62	>250
	0,65	3,90	4,56	7,82	10,42	7,81	15,62	>250
3cc	0,49	1,95	2,93	2,93	62,50	23,44	11,72	> 62,5
	0,49	1,95	2,93	2,93	62,50	46,88	15,63	> 62,5
	0,49	1,95	2,93	4,88	62,50	46,88	15,63	> 62,5
4c	2,93	9,77	NA	46,88	31,25	62,50	125,00	> 500
	2,93	9,77	NA	46,88	31,25	62,50	125,00	> 500
	2,93	32,25	NA	46,88	31,25	62,50	125,00	> 500
4d	0,98	2,93	NA	11,72	15,63	15,63	31,25	500,00
	0,98	5,86	NA	11,72	15,63	15,63	31,25	500,00
	0,98	7,81	NA	11,72	15,63	15,63	31,25	500,00
4e	0,74	1,47	NA	3,91	3,91	7,81	15,63	> 500
	0,74	1,47	NA	3,91	3,91	7,81	15,63	> 500
	0,74	2,93	NA	3,91	7,81	7,81	15,63	> 500

*Zeleně jsou označeny nejúčinnější látky, které svým antibakteriálním účinkem předčily průměrné hodnoty referenčních látek alespoň v šesti případech, tzn. proti třem různým G⁺ či G⁻ bakteriálním kmenům. Tučně jsou zvýrazněny právě ty hodnoty MIC a MBC, které jsou nižší než odpovídající průměrné hodnoty referenčních látek.

V případě, že látka ani při nejvyšší testované koncentraci neúčinkovala na konkrétní kmen, výsledek byl označen jako > nejvyšší testovaná koncentrace.

NA značí, že daná látka nebyla na daný kmen testována.

S. aureus (STAU), meticilin-rezistentní S. aureus (MRSA), S. epidermidis (STEP), vankomycin-rezistentní E. faecium (VRE), E. coli (ESCO), K. pneumoniae (KLPN -), K. pneumoniae produkující širokospektré β-laktamázy (KLPN +), multirezistentní P. aeruginosa (PSAE MR)

Příloha C - Tabulka minimálních inhibičních a baktericidních koncentrací nově připravených látek

	Minimální inhibiční koncentrace po 24 hodinách ($\mu\text{mol/l}$) Minimální inhibiční koncentrace po 48 hodinách ($\mu\text{mol/l}$) Minimální baktericidní koncentrace po 24 hodinách ($\mu\text{mol/l}$)							
Označení	STAU	MRSA	STEP	VRE	ESCO	KLPN -	KLPN +	PSAE MR
S1c	1,95	15,63	15,63	31,25	15,63	7,81	15,63	250,00
	1,95	15,63	15,63	31,25	15,63	7,81	15,63	375,00
	1,95	15,63	31,25	62,5	15,63	7,81	15,63	375,00
S1d	0,98	3,91	2,93	15,63	7,81	15,63	7,81	19,53
	1,47	3,91	2,93	15,63	7,81	15,63	7,81	23,44
	1,47	3,91	3,91	23,43	7,81	15,63	7,81	23,44
S1e	0,98	3,91	2,93	15,63	31,25	62,50	62,50	66,41
	0,98	7,81	3,91	15,63	62,50	62,50	62,50	125,00
	1,98	7,81	7,81	23,43	62,50	62,50	93,75	187,50
S2c	5,21	31,25	31,25	52,08	62,50	125,00	208,33	500,00
	9,12	31,25	62,50	52,08	62,50	125,00	208,33	500,00
	18,23	52,08	62,50	104,17	83,33	166,67	208,33	500,00
S2d	1,14	2,93	3,91	6,51	20,84	26,04	62,50	500,00
	1,30	2,93	3,91	7,81	20,84	26,04	145,83	500,00
	2,28	6,51	5,21	7,81	20,84	26,04	208,33	500,00
S2e	0,65	13,02	2,60	3,26	10,42	15,63	15,63	> 250
	1,30	36,46	2,60	5,21	10,42	15,63	15,63	> 250
	1,95	46,88	3,26	5,21	10,42	20,84	15,63	> 250
S3bb	0,49	1,95	3,91	3,91	5,86	15,63	15,63	156,25
	0,49	1,95	3,91	3,91	5,86	15,63	15,63	156,25
	1,47	1,95	3,91	3,91	5,86	15,63	15,63	156,25
S4	0,98	4,56	15,63	9,77	41,67	31,25	52,08	> 250
	0,98	5,21	15,63	11,72	41,67	31,25	52,08	> 250
	1,30	10,42	15,63	15,63	52,08	31,25	52,08	> 250
S5	0,41	0,90	NA	3,91	0,37	NA	13,02	15,63
	0,41	0,90	NA	3,91	0,37	NA	18,23	23,44
	1,63	3,58	NA	19,53	0,49	NA	54,69	187,50
S6	0,49	0,49	0,49	0,69	0,74	0,98	2,45	2,20
	0,74	0,98	0,49	0,98	0,98	0,98	2,45	2,45
	4,40	2,45	2,20	6,84	4,40	4,40	5,86	5,86

V případě, že látka ani při nejvyšší testované koncentraci neúčinkovala na konkrétní kmen, výsledek byl označen jako > nejvyšší testovaná koncentrace.

NA značí, že daná látka nebyla na daný kmen testována.

S. aureus (STAU), meticilin-rezistentní S. aureus (MRSA), S. epidermidis (STEP), vankomycin-rezistentní E. faecium (VRE), E. coli (ESCO), K. pneumoniae (KLPN -), K. pneumoniae produkující širokospektré β -laktamázy (KLPN +), multirezistentní P. aeruginosa (PSAE MR)

Příloha D - Vybraná publikace I.

Hympanova, M., S. Terlep, A. Markova, L. Prchal, I. Dogša, L. Pulkrabkova, M. Benkova, J. Marek a D. Stopar. The Antibacterial Effects of New N-Alkylpyridinium Salts on Planktonic and Biofilm Bacteria. *Front. Microbiol.* **11**, 573951 (2020). doi:10.3389/fmicb.2020.573951.

IF₍₂₀₂₀₎ 5,64



The Antibacterial Effects of New N-Alkylpyridinium Salts on Planktonic and Biofilm Bacteria

Michaela Hympanova^{1,2}, Saša Terlep³, Aneta Markova^{1,4}, Lukáš Prchal¹, Iztok Dogša⁵, Lenka Pulkrabkova^{1,4}, Marketa Benkova¹, Jan Marek^{1,2} and David Stopar^{5*}

¹ Biomedical Research Centre, University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czechia, ² Department of Epidemiology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence in Brno, Brno, Czechia, ³ Fotona d.o.o., Ljubljana, Slovenia, ⁴ Department of Toxicology and Military Pharmacy, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence in Brno, Brno, Czechia, ⁵ Department of Microbiology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

OPEN ACCESS

Edited by:

Fabian Cepik,
University Medical Center
Regensburg, Germany

Reviewed by:

Biao Ren,
Sichuan University, China
Cesar de la Fuente-Nunez,
University of Pennsylvania,
United States

*Correspondence:

David Stopar
david.stopar@bf.uni-lj.si

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobiotics, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 18 June 2020

Accepted: 28 September 2020

Published: 20 October 2020

Citation:

Hympanova M, Terlep S,
Markova A, Prchal L, Dogša I,
Pulkrabkova L, Benkova M, Marek J
and Stopar D (2020) The Antibacterial
Effects of New N-Alkylpyridinium Salts
on Planktonic and Biofilm Bacteria.
Front. Microbiol. 11:573951.
doi: 10.3389/fmicb.2020.573951

An increasing microbial resistance to known antibiotics raises a demand for new antimicrobials. In this study the antimicrobial properties of a series of new N-Alkylpyridinium quaternary ammonium compounds (QACs) with varying alkyl chain lengths were evaluated for several nosocomial pathogens. The chemical identities of the new QACs were determined by NMR, LC-MS, and HRMS. All the planktonic bacteria tested were susceptible to the new QACs as evaluated by MIC and MBC assays. The antimicrobial effect was most pronounced against *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Live/dead staining CLSM was used to test the effectiveness of the QACs in biofilms. The effectiveness was up to 10-fold lower than in the plankton. When QACs were used as irrigants in Er:YAG – SSP photoacoustic steaming, their effectiveness significantly increased. The combined use of irrigants and photoacoustic streaming increased biofilm removal from the surface and increased the killing rate of the cells remaining on the surface. This may allow for a shorter chemical exposure time and lower dosage of QACs used in applications. The results demonstrate that the new QACs have potential to be applied as antibacterial compounds effective against planktonic and biofilm bacteria as well as irrigants in removal of difficult-to-reach biofilms.

Keywords: antimicrobial activity, quaternary ammonium salts, bacteria, biofilm, photoacoustic irrigation

INTRODUCTION

Infectious diseases caused by pathogenic bacteria are a threat to public health all over the world (Courvalin, 2016; Watkins, 2018). A high prevalence of resistance against known antibacterial agents aggravates the situation. For instance, many nosocomial pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterococcus faecalis* are resistant to known antimicrobials and are difficult to treat (Khan et al., 2017). There is an urgent need to develop new antibacterial agents that will replace those to which bacteria have developed resistance. In particular the new antibacterial agents should have good activity against biofilm bacteria which are typically more resistant and are more difficult to remove from surfaces (Ceri et al., 1999; Olson et al., 2002).

Quaternary ammonium compounds (QACs), are widely used in medicine. They have proven antimicrobial properties, have low toxicity, and are minimally irritating (Gerba, 2015). They are most effective against Gram positive bacteria, but are also effective against Gram negative bacteria, viruses and biofilms (Jennings et al., 2014; Gerba, 2015). QACs can be used in antibacterial formulations or incorporated into medical products, such as composite materials or acrylic resins, or adhesive systems and endodontic dental materials, where their antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, *E. faecalis* or other bacteria decreases the occurrence of secondary caries infection (Zhang et al., 2018).

In difficult-to-reach biofilm infections chemical treatments are sometimes combined with physical or mechanical co-treatment methods to increase their effectiveness. For example, in a dental root canal procedure chemical antibacterial treatment (i.e., sodium hypochlorite) is combined with root irrigation. However, sodium hypochlorite is toxic and is not suitable for certain medical applications (i.e., in dental implant related peri-implant mucositis and peri-implantitis). The traditional method of irrigation using a syringe with a needle often fails because of the limited irrigant flow and its ability to reach distant areas (Boutsioukis et al., 2010). Various new irrigant activation techniques have been suggested to improve biofilm removal (Kurzmam et al., 2019). The non-contact Er:YAG photoacoustic streaming with Super Short Pulses (SSP, 50 μ s) has been a very successful method of removing biofilms from the dental root system for many years (Olivi et al., 2014; Akcay et al., 2017; Lukač and Jezeršek, 2018; Kurzmam et al., 2019). Er:YAG photoacoustic irrigation causes biofilm mechanical debridement by turbulent movement of fluid irrigant, and at the same time the chemical action of the irrigant itself significantly improves biofilm removal. The problem with irrigation techniques is that many of currently used irrigants in dentistry are toxic in high concentrations (Clarkson and Moule, 1998; Zehnder, 2006). It would therefore be beneficial if new antibacterial irrigants (e.g., QACs) with lower toxicity were available, especially for irrigation in presence of vital tissue. The use of QACs for photoinduced irrigation treatment of biofilms has not been tested yet.

In this study new QACs were evaluated for their efficiency as irrigant and antibacterial compounds against plankton and biofilm. Antibacterial effects were tested on clinical isolates of nosocomial pathogens including *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli*, and *K. pneumoniae*. For laboratory testing and irrigation experiments non-pathogenic strain of *E. faecalis* was used. The antibacterial effect was probed either by chemical treatment or a combination of chemical and Er:YAG irrigation methods. The chemical identity of the new QACs was determined by NMR, LC-MS, HRMS. The antibacterial activity of QACs was measured with MIC and MBC assays. The results suggest that new QACs have a good potential as antibacterial compounds effective against planktonic and biofilm bacteria, and also as irrigants in laser-assisted removal of biofilms.

MATERIALS AND METHODS

Chemistry

General Information

The preparation of 1-Alkylpyridinium derivatives (**A**₁₂, **A**₁₄, **A**₁₆) and 3-alkyl-1-(2-hydroxyethyl)imidazolium (**C**₁₂, **C**₁₄, **C**₁₆) derivatives with appropriate alkyl chain length ($-C_{12}H_{25}$; $-C_{14}H_{29}$; $-C_{16}H_{33}$) has been described previously (Marek et al., 2010; Soukup et al., 2020). The series of 1-alkyl-3-chloropyridinium derivatives (**B**₁₂, **B**₁₄, **B**₁₆) was prepared for the first time in this study by refluxing 3-chloropyridine (18 mM) with the appropriate alkyl bromide (45 mM) in acetonitrile (50 ml) for 96 h. The acetonitrile was evaporated and the crude product purified by recrystallization several times from diethyl ether. Alkyl bromides and 3-chloropyridine were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czechia) and used without further purification. Acetonitrile was purchased from VWR (Prague, Czechia). The reaction progress was monitored by thin layer chromatography (TLC) on aluminum sheets with silica gel 60 F₂₅₄ purchased from Merck (Prague, Czechia) in a mobile phase of methanol: ethyl acetate: ammonia solution = 3: 1: 0.1. Detection was carried out with ultraviolet light (254 nm) or with KMnO₄ solution (1% aq. sol.). ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded in CDCl₃ at ambient temperature on a Varian S500 spectrometer (499.87 MHz for ¹H and 125.71 MHz for ¹³C). Chemical shifts, δ , are given in parts per million (ppm), and spin multiplicities are given as s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublets), dt (doublets of triplets), t (triplet) or m (multiplet). Coupling constants, *J*, are expressed in hertz (Hz). For ¹H, δ is relative to CDCl₃ (δ = 7.26) and for ¹³C relative to CDCl₃ (δ = 77.00). Melting points were determined by melting point apparatus – Stuart SMP30 (Eaton, United Kingdom) – and were uncorrected.

LC-MS Analysis

High performance liquid chromatography (HPLC) coupled with mass spectrometry (MS) detection was performed to determine the identity and purity of the prepared compounds. The system used in this study was a Dionex Ultimate 3000 UHPLC: RS Pump, RS Column Compartment, RS Autosampler, Diode Array Detector, Chromeleon (version 7.2.9 build 11323) software (Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany) with Q Exactive Plus Orbitrap mass spectrometer with Thermo Xcalibur (version 3.1.66.10.) software (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Detection was performed by mass spectrometry in positive mode. The settings for the heated electrospray source were: spray voltage 3.5 kV; capillary temperature: 300°C; sheath gas: 55 arbitrary units; auxiliary gas: 15 arbitrary units; spare gas: 3 arbitrary units; probe heater temperature: 250°C; max spray current: 100 μ A; S-lens RF Level: 50. High resolution mass spectra (HRMS) and sample purities were obtained by HPLC-MS gradient method. A C18 column was used (Phenomenex Kinetex EVO C18, 3 \times 150 mm, 2.6 μ m, Phenomenex, Japan). Mobile phase A was ultrapure water of ASTM 1 type (resistivity 18.2 M Ω .cm at 25°C) prepared by Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF apparatus (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) with 0.1% (v/v) formic acid;

mobile phase B was acetonitrile (MS grade, Honeywell Sigma-Aldrich, Germany) with 0.1% (v/v) of formic acid. The flow was constant at 0.4 mL/min. The method began with 1 min of isocratic flow of 5% B, followed by gradient flow of B rising to 100% B in 3 min, followed by constant flow of 100% B for 1 min. The composition then went back to 5% B and equilibrated for 5 min. Total run time was 10 min. The samples were dissolved in methanol (LC-MS grade, Fluka Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) at a concentration of 1 mg/mL and sample injection was 1 μ L. Purity was determined by UV at 254 nm. HRMS was determined by total ion current spectra from the mass spectrometer.

NMR and HRMS Data

1-dodecyl-3-chloropyridinium bromide (B₁₂)

¹H NMR (500 MHz, methanol-d₄) δ 9.37 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, ArH), 9.06 (dt, *J* = 6.0, 1.2 Hz, 1H, ArH), 8.73–8.67 (m, 1H, ArH), 8.14 (dd, *J* = 8.5, 6.1 Hz, 1H, ArH), 4.71–4.64 (m, 2H, CH₂), 2.10–2.01 (m, 2H, CH₂), 1.48–1.24 (m, 18H, 9 \times CH₂), 0.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 146.67, 145.53, 144.72, 137.01, 130.04, 63.61, 33.05, 32.42, 30.71, 30.61, 30.47, 30.44, 30.09, 27.16, 23.71, 14.43.

ESI-MS: *m/z* 282.20 [M⁺] (calc. for [C₁₇H₂₉ClN⁺]) 282.20).

1-tetradecyl-3-chloropyridinium bromide (B₁₄)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-d) δ 9.70–9.65 (m, 2H, ArH), 8.48 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 1H, ArH), 8.25 (dd, *J* = 8.5, 6.0 Hz, 1H, ArH), 5.10 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 2.09–1.99 (m, 2H, CH₂), 1.45–1.14 (m, 22H, 11 \times CH₂), 0.86 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 144.97, 144.12, 143.75, 135.65, 129.16, 62.35, 31.98, 31.82, 29.58, 29.54, 29.51, 29.44, 29.27, 29.25, 29.01, 25.97, 22.59, 14.03.

ESI-MS: *m/z* 310.23 [M⁺] (calc. for [C₁₉H₃₃ClN⁺]) 310.23).

1-hexadecyl-3-chloropyridinium bromide (B₁₆)

¹H NMR (500 MHz, chloroform-d) δ 9.68 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, ArH), 9.63 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H, ArH), 8.48 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H, ArH), 8.24 (dd, *J* = 8.5, 6.0 Hz, 1H, ArH), 5.11 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 2.09–1.99 (m, 2H, CH₂), 1.46–1.11 (m, 26H, 13 \times CH₂), 0.86 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 144.98, 144.16, 143.70, 135.67, 129.15, 62.41, 31.98, 31.85, 29.63, 29.58, 29.54, 29.46, 29.29, 29.03, 25.99, 22.61, 14.05.

ESI-MS: *m/z* 338.26 [M⁺] (calc. for [C₂₁H₃₇ClN⁺]) 338.26).

Bacterial Strains

The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. All the strains, apart from *E. faecalis*, were stored at the Department of Epidemiology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence in Brno (Czechia) using ITEST CRYOBANK B cryotubes (ITEST plus s.r.o., Hradec Králové, Czechia) in a freeze box at -70°C . Before MIC/MBC testing by broth microdilution method, all strains were cultivated on Mueller-Hinton agar (HiMedia, Caderny-Envitek, Prague, Czechia). *Enterococcus faecalis* DSM 16431 (kindly donated by SymbioGruppe GmbH & Co KG SymbioPharm GmbH) was stored in cryovials at the Department of Microbiology, Biotechnical Faculty, University of

TABLE 1 | Bacterial strains used in this study.

Strain	Abb. ^a	Source	
G+	Staphylococcus aureus C1947	STAU	Clinical isolate ^b
	methicillin-resistant S. aureus C1926	MRSA	Clinical isolate ^b
	Staphylococcus epidermidis C1936	STEP	Clinical isolate ^b
	Enterococcus faecalis DSM 16431	EFAE	SymbioGruppe GmbH & Co KG SymbioPharm GmbH
G-	Escherichia coli A1235	ESCO	Clinical isolate ^b
	Klebsiella pneumoniae C1950 extended-spectrum β -lactamase-producing	KLPN-	Clinical isolate ^b
	K. pneumoniae C1934	KLPN+	Clinical isolate ^b

^aabbreviations for Figures and Tables in this publication. ^bclinical isolates of patients from the University Hospital Hradec Králové.

Ljubljana (Slovenia) and was grown on Tryptic Soy Agar (Biolife, Italiana S.r.l., Milan, Italy).

Planktonic Bacteria Susceptibility Assay

The antibacterial susceptibility of planktonic bacteria was determined by the broth microdilution method according to the standard M07-A1 (CLSI, 2018) and optimized as described previously (Marek et al., 2015; Dolezal et al., 2016). All antibacterial compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO p.a., Sigma-Aldrich, Prague, Czechia). The wells of the 96-well microtiter plates contained 200 μ L of Mueller-Hinton broth (MHB, HiMedia, Caderny-Envitek, Prague, Czechia) with two-fold serial dilutions of the QACs (500–0.49 μ mol/L) and were inoculated with 10 μ L of exponentially grown bacterial suspension adjusted densitometrically to match 0.5 McFarland scale. The final concentrations of DMSO in broth did not exceed 1%. The MIC values, defined as inhibition of bacterial growth, were determined visually after 24 and 48 h of incubation at $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. The MBCs were determined for all prepared compounds as the concentrations that provided $\geq 99.9\%$ decrease in the bacterial number after subculture of 10 μ L aliquots from each microtiter well in a corresponding new microtiter plate where each well contained 200 μ L of fresh MHB. The MBC was determined as the lowest concentration which corresponded to a well without visible bacterial growth after a further 24 h of incubation at $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$. To ensure that no bacteria had survived, the content of the well was inoculated on an agar plate to confirm the absence of bacterial growth.

To evaluate the effect of bacterial density on the antibacterial activity of the QACs, *E. faecalis* suspensions from an overnight culture were prepared in the range from 10^6 to 10^{10} CFU/mL in Brain Heart Infusion broth (BHI, VWR International BVBA, Leuven, Belgium) by either diluting or concentrating bacterial suspensions. The MBCs corresponding to *E. faecalis* suspensions with different initial bacterial densities were determined only for the compound A₁₄ in the concentration range between 500 and 0.49 μ M prepared by 2-fold serial dilutions. The MBCs were evaluated as described above after the bacteria were exposed to

the QACs for 3 min, 60 min or 24 h. The growth rate of tested *E. faecalis* suspensions at different initial bacterial densities was monitored every 30 min during 7 h of incubation by measuring the optical density (OD_{600}). The values were fitted with the logistic equation

$$N(t) = \frac{KN_0}{(K - N_0)e^{-rt} + N_0}$$

where N_0 is the initial OD_{600} , K is the carrying capacity (maximal OD_{600} in the stationary growth phase), t is the length of time of incubation, and r is the growth rate constant.

Biofilm Susceptibility Assay

To grow the biofilms, an overnight culture of *E. faecalis* (average viable bacterial concentration of 1×10^8 CFU/ml) was diluted 100-fold in BHI. *E. faecalis* biofilms were formed on titanium radial disks (commercially pure titanium, grade 2) with 7 mm diameter and 1 mm thickness. Prior to the experiments all disks were sandblasted (FerroEcoBlast Europe; Microblast ceramic beads B120) to expose fresh titanium surface, cleaned in 70% ethanol and autoclaved at 134°C for 20 min. The biofilms were grown for 3 days at 37°C \pm 1°C without shaking or changing of media to achieve a surface coverage of approximately 25% and a surface bacterial density of $\sim 1.5 \times 10^{11}$ bacteria per mL. Biofilms grown on a titanium surface were exposed to 1.5 ml of A₁₄, B₁₄, and C₁₄ dissolved in BHI for 1, 3, and 60 min. After treatment the individual disks were rinsed with saline solution to remove QACs as well as unattached bacteria. In laser treated biofilms samples were treated with QACs for 1 min followed by 10 s of Er:YAG – SSP laser treatment. The LightWalker Er:YAG (Fotona, Ljubljana, Slovenia) was set with the following parameters: laser wavelength 2940 nm; contact handpiece H14, Flat Sweeps fiber tip 400/14 positioned 5 mm above the biofilm disk, energy 20 mJ, frequency 15 Hz, water off, air off, single pulse modality – SSP (super short pulse – 50 μ s). The titanium disks with their biofilm were positioned at the bottom of cylindrical irrigation system (7.5 mm diameter and 2 cm high) in the presence of 1.5 ml of either saline or the QAC dissolved in BHI. The antibacterial concentration was 250 μ M which was the highest soluble QAC concentration in BHI broth. The rinsed biofilms were stained with 5 μ L of premixed saline-diluted Syto 9 and propidium iodide stock solutions (1: 300) from LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit L7012 (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, United States). After 5 min of incubation in the dark the samples were observed by fluorescence microscope Zeiss Axio Observer Z1 equipped with confocal unit LSM 800 (CLSM). Z-stacks and tiles were taken at 100 \times or 20 \times magnification at three randomly selected view fields. Image acquisition and control of the microscope were performed with ZEN 2.3 (ZEISS GmbH, Germany). For the 100 \times magnification, blue 488 nm and yellow 561 nm lasers were set to 1% intensity, GaAsP PMT detectors to 700 V, pinhole to 71 μ m, and the size of the acquired 8-bit images was 3476 \times 3476 pixels. For the 20 \times magnification, blue 488 nm and yellow 561 nm lasers were set to 0.85% intensity, GaAsP PMT detectors to 700 V, pinhole to 50 μ m and the size of acquired 8-bit images was 1306 \times 1306 pixels. The typical Z-step of the Z-stack was 1 μ m for 100 \times magnification and 3.26 μ m for

20 \times magnification. The images were composed of four different view fields. A custom script was written (Image J) and used to evaluate the effect of treatment on the fraction of dead cells and biofilm surface coverage.

The Bliss independence model was used for the evaluation of interactions of the combined QACs and laser treatment (Bliss, 1939). The model assumes that a single agent acts independently but contributes to the final outcome (Bliss, 1939; Foucquier and Guedj, 2015). The observed combined effect (E_{obs}) is compared to the expected combined effect (E_{exp}) which is calculated as $E_{exp} = 1 - (1 - E_1) \times (1 - E_2)$, where E_1 and E_2 are the effects of the single treatments. The difference between the E_{obs} and E_{exp} is the Excess over Bliss (*eob*). Positive *eob* values indicate synergistic interaction, whereas negative *eob* values indicate antagonistic behavior. Null *eob* value implies no interaction.

Cell Viability Evaluation

Standard MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich, Prague, Czechia) was used according to the manufacturer's protocol on the CHO-K1 (Chinese hamster ovary, ECACC, Salisbury, United Kingdom) in order to compare the effect of different compounds within the series. The cells were cultured according to ECACC recommended conditions and seeded in a density of 8000 per well as described previously (Soukup et al., 2020). Briefly, the tested compounds (series A, B, C) were dissolved in DMSO (Sigma-Aldrich, Prague, Czechia) and subsequently diluted in the Nutrient Mixture F-12 Ham growth medium (Sigma-Aldrich, Prague, Czechia) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum and 1% Penicillin-Streptomycin (both Sigma-Aldrich, Prague, Czechia) so that the final concentration of DMSO did not exceed 0.5% (v/v). In the case of sodium hypochlorite, the commercially available detergent called Savo containing this active compound was diluted to the initial half concentration (i.e., 2.35%) with the supplemented growth medium mentioned above. Thereafter, CHO-K1 cells were exposed to two-fold diluted series A, B, C or ten-fold diluted sodium hypochlorite for 24 h. Then the medium was replaced by a medium containing 0.5 mg/ml of MTT and the cells were allowed to produce formazan for approximately 3 h under surveillance. Thereafter, the medium with MTT was removed and crystals of formazan were dissolved in DMSO (100 μ L/well). Cell viability was assessed spectrophotometrically by the amount of formazan produced. The absorbance was measured at 570 nm on Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, United States). IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) was then calculated from the control – subtracted triplicates using non-linear regression (four parameters) by GraphPad Prism 5.03 or 7.03 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, United States). Final IC_{50} and SEM (standard error of the mean) values were obtained as a mean of three independent measurements.

Statistical Analysis

All biological experiments were independently performed at least three times with three replicates for each sample. The results for the biofilm susceptibility were analyzed by Shapiro–Wilk normality test. Tukey's multiple comparison test was used to

evaluate the live/dead ratio (we have assumed that the data are normally distributed), whereas Dunn's multiple comparison test was used for surface coverage, where the results were not normally distributed. *P*-values of <0.05 were considered to be significant. GraphPad Prism 7.03 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, United States) was used for statistical analysis and graphical representation.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry

The chemical structures of 1-Alkylpyridinium derivatives (**A**₁₂, **A**₁₄, **A**₁₆); 1-alkyl-3-chloropyridinium derivatives (**B**₁₂, **B**₁₄, **B**₁₆); and 3-alkyl-1-(2-hydroxyethyl)imidazolium derivatives (**C**₁₂, **C**₁₄, **C**₁₆) are shown in **Figure 1**.

We have prepared 9 quaternary ammonium salts containing pyridine or imidazole heterocyclic rings. The compounds of group A and C were synthesized as described previously and served as reference QACs (Marek et al., 2010; Soukup et al., 2020). The novel antibacterial compounds (B group) were prepared by Menshutkin reaction, where the tertiary amine was converted into a quaternary ammonium salt by reaction with an alkyl halide (nucleophilic substitution-type reaction). Each homologous group consisted of three *N*-alkyl derivatives with either 12, 14 or 16 carbon atoms in the alkyl chain. The structures of the new compounds were confirmed by ¹H and ¹³C NMR and HRMS analysis. The purity of all the compounds was ≥95%. The yields, melting points, purities and Clog *P* (calculated logarithm of the partition coefficient) of different antibacterial compounds are given in **Table 2**. Clog *P* was calculated with MarvinSketch (version 14.9.8.0) software. As expected, the melting points of the new compounds and Clog *P* values increased with increasing alkyl chain length.

In vitro Antibacterial Activity

Susceptibility of QACs Against Planktonic Bacteria

The series of synthesized QACs were evaluated for their antibacterial activity against selected nosocomial planktonic

bacteria using broth microdilution assay. The antibacterial effect of the new chlorine-substituted *N*-Alkylpyridiniums (**B**_{12–16}) and reference *N*-Alkylpyridiniums (**A**_{12–16}) on planktonic bacterial strains is shown in **Figure 2**. All the compounds were effective against the tested bacterial strains. Higher antibacterial activity, as indicated by lower MIC value, was found against the G+ bacteria *E. faecalis* (EFAE), *S. aureus* (STAU), methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), and *S. epidermidis* (STEP). The lowest MIC and MBC values were obtained for *S. aureus*. The observed higher susceptibility of the G+ bacteria to QACs compared to G– bacteria is in agreement with the literature (Tischer et al., 2012; Shtyrlin et al., 2016). There is a general trend of decreasing MIC values with increasing alkyl chain length for all antibacterial compounds tested. The exception is **A**₁₄ which was more efficient against MRSA than **A**₁₆. Such increasing antimicrobial activity with increasing alkyl chain length has been reported previously (Li et al., 2013; Zhang et al., 2016). When an *N*-Alkylpyridinium QAC was compared with a chlorine-substituted *N*-alkylpyridinium or *N*-Alkylimidazolium at a given alkyl chain length (i.e., **A**₁₄, **B**₁₄, and **C**₁₄ in **Figure 2**), there was no significant difference in the antimicrobial activity for G+ bacteria. In the case of the G– bacteria *E. coli* (ESCO), *K. pneumoniae* (KLPN–), and extended-spectrum β-lactamase-producing *K. pneumoniae* (KLPN+), the most effective were imidazolium compounds. Our results are consistent with previous observations that small changes in the structure of QACs such as introduction of electronegative atom allow for fine-tunability of surfactant properties (Brown et al., 2017; Fuente-Nunez et al., 2018).

The Effect of the Initial Bacterial Density on Planktonic Antimicrobial Effectiveness

The effect of different initial bacterial densities on the MBC are given in **Figure 3**. The MBC was determined after 3 min, 60 min, and 24 h of bacterial exposure to the antibacterial compound. The MBC increased with the initial bacterial density. This is usually interpreted as an increased resistance to the antibiotic due to the induction of quorum sensing pathways [i.e., by increasing the number of persistent cells in the population, the expression

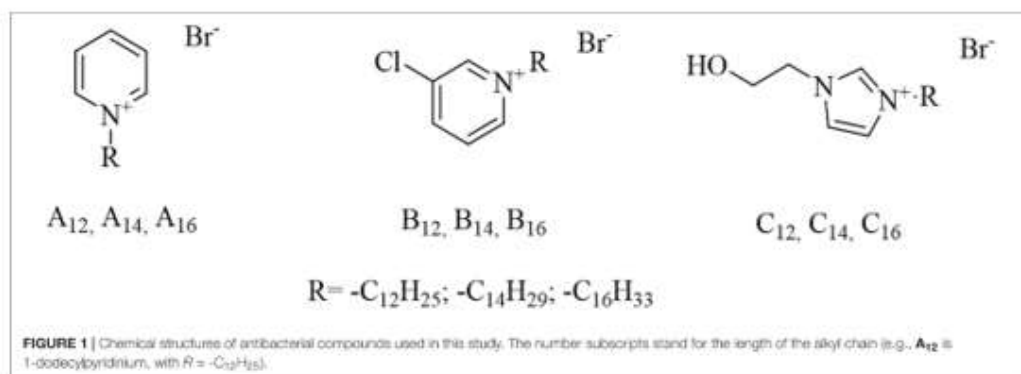
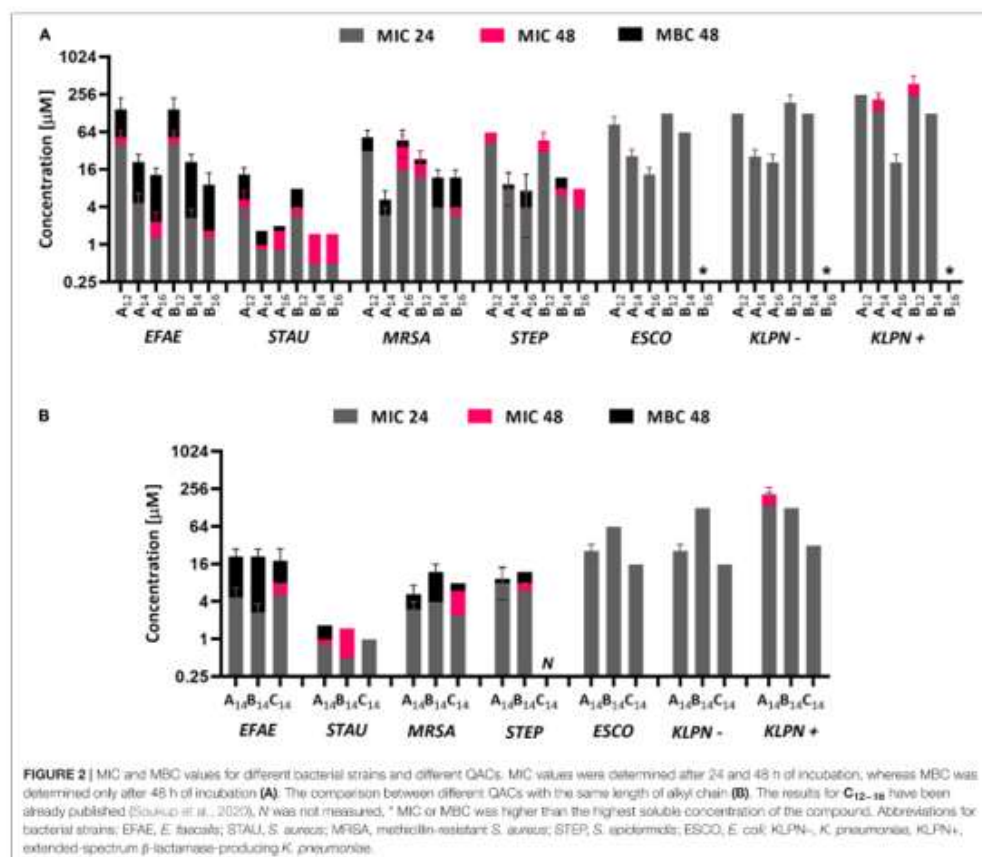


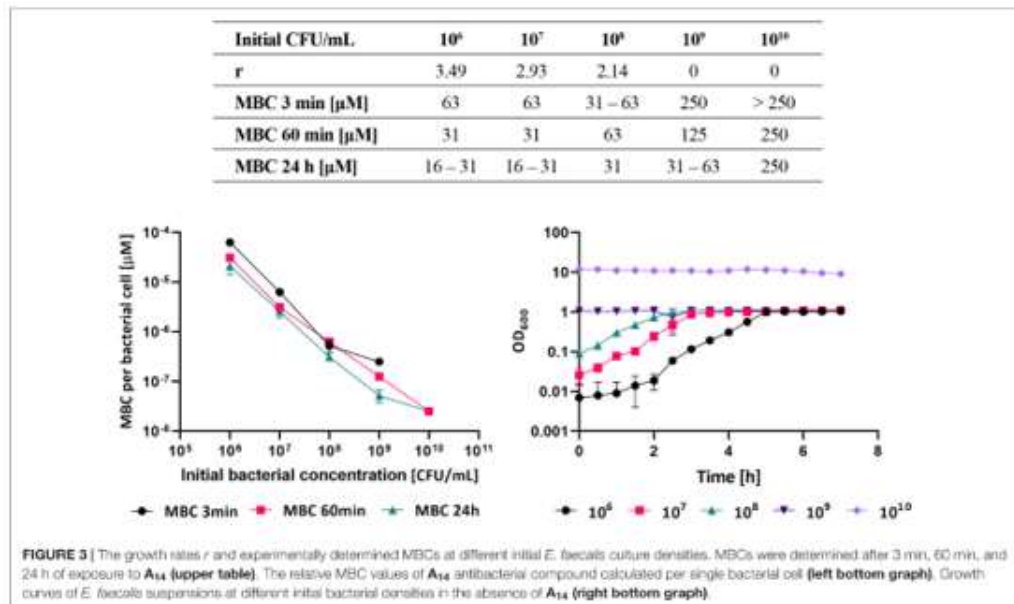
TABLE 2 | Yields, melting points, purity and Clog P of antibacterial QACs used in this study.

Compound	Alkyl chain	Yield (%)	Purity (%)	Melting point (°C)	Clog P
A ₁₂	12	82.13	95	73.0–75.0	1.693
A ₁₄	14	75.61	96	68.0–69.0	2.562
A ₁₆	16	98.76	96	63.0–64.0	3.471
B ₁₂	12	82.84	95	68.5–69.2	2.297
B ₁₄	14	69.27	99	64.0–64.6	3.186
B ₁₆	16	76.53	100	91.4–92.2	4.075
C ₁₂	12	77.76	95	Oil	0.720
C ₁₄	14	83.69	95	44.0–46.0	1.610
C ₁₆	16	17.20	95	49.2–50.1	2.499



of peroxidases which provide protection against reactive oxygen species, or the overexpression of an efflux pump (Rémy et al., 2018)]. The increase in MBC with cell density, however, was

much less than the increase in the number of bacterial cells. If one calculates the relative MBC value per bacterial cell the effective MBC in fact significantly decreases with cell densities (Figure 3).



The required MBC after 24 h at 10⁶ CFU/ml initial bacterial density was 2.1×10^{-5} μM and decreased to 2.7×10^{-8} μM at the initial bacterial density of 10¹⁰ CFU/ml. This is more than three orders of magnitude. The results imply that the denser the initial bacterial suspension the more the individual bacterial cell is susceptible to the antibacterial compound. This is surprising and could be due to an increased level of stress experienced by the individual cell in a more crowded environment. Although at high cell densities bacteria may collectively adapt their behavior and increase antibiotic resistance the results of this study suggest that the individual cells of *E. faecalis* become more stressed and susceptible to the antibiotic at higher initial bacterial concentrations. This could be due to reduced availability of nutrients and reduced growth rate. To check this we have grown bacteria at different initial densities in fresh medium. As illustrated in Figure 3, the optical density increased during incubation for the dilute initial bacterial suspensions (i.e., from 10⁶ to 10⁸ CFU/ml), but remained unchanged if the initial bacterial concentration was 10⁹ CFU/ml or higher. The growth rate, which is a general indicator of cell well-being, decreased significantly with increasing initial cell density.

Effectiveness of QACs Against Biofilm

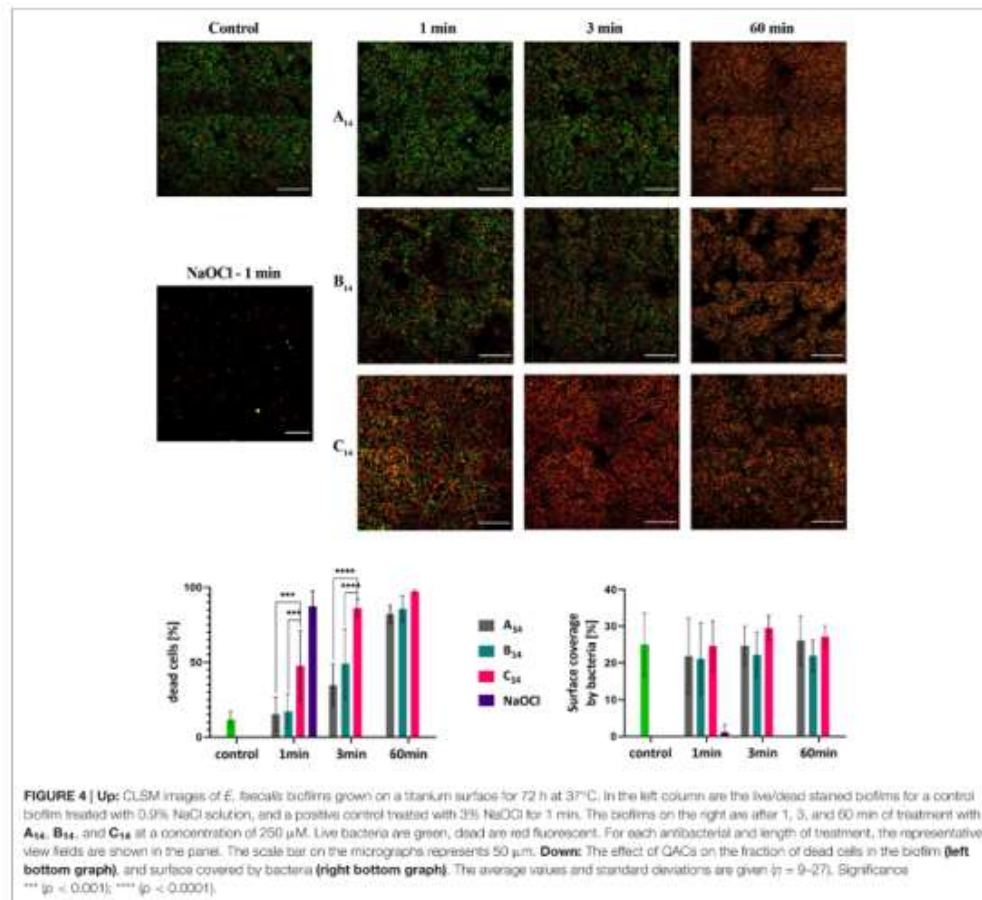
The effectiveness of different QACs against *E. faecalis* biofilms was determined with **A₁₄**, **B₁₄**, and **C₁₄** compounds as shown in Figure 4. All tested QACs were effective against *E. faecalis* biofilms after 60 min of treatment. The fraction of dead (red) cells increased with the time of incubation. The increase was most pronounced for **C₁₄**, where the majority of cells in the biofilm

were dead already after 1 min of treatment. The effectiveness of **B₁₄** was higher than that of **A₁₄**. As a positive control we have used Sodium hypochlorite solution applied at the concentration commonly used in clinical practice (3% V/V). After 1 min of exposure the biofilm coverage decreased below 1%. The applied NaOCl concentration was approximately 150 times higher than QACs' concentrations used in this study.

To quantify the effect of different QACs on *E. faecalis* biofilms we have determined the fraction of dead cells and the biofilm surface coverage prior to and after the treatment (Figure 4). Prior to treatment, most of the bacterial cells in a biofilm ($88 \pm 6\%$) were alive. After 60 min of treatment, the proportions of live cells decreased dramatically and were 18, 14, and 3% for **A₁₄**, **B₁₄**, and **C₁₄**, respectively. The most effective compound against biofilm bacteria was **C₁₄**, where after 3 min of treatment the fraction of dead bacteria was already $86 \pm 4\%$. **B₁₄** was more effective than **A₁₄**. It is interesting to note that surface coverage did not change significantly during the treatment, suggesting that **A₁₄**, **B₁₄**, and **C₁₄** kill bacterial cells in a biofilm, but do not remove them from the surface. Similar behavior has been observed for chlorhexidine treatment, where the bacteria in the biofilm were killed, but not removed from the dentin surface (Paz et al., 2010).

Comparison of the Effectiveness of QACs Against Planktonic and Biofilm Cells

In plankton suspensions we were able to reach bactericidal concentration for all tested QACs. The situation was quite different in biofilms. The concentrations that work in plankton were not sufficient to kill all bacteria in the biofilm. It is



usually assumed that antibacterials are significantly less effective in biofilms compared to plankton and up to 1000-fold higher concentrations were reported for biofilms compared to plankton (Ceri et al., 1999; Olson et al., 2002; ASTM International, 2017). Unfortunately, due to the solubility limit, it was not possible to increase the concentration of the QACs to concentrations that would kill all bacteria in the biofilm. Nevertheless, we can compare the effectiveness in plankton and biofilm if we decrease the concentration of biocide in the plankton to match the fraction of the dead cells in the biofilm. The less we have to dilute the concentration of biocide in plankton to match the fraction of dead bacteria in biofilm the more potent the compound is as a biocide in the biofilm. The experiment was performed at high density *E. faecalis* suspensions (2.4×10^9 CFU/mL) to mimic the high density of bacteria in a biofilm. By comparing

QACs effectiveness at high initial planktonic densities we have largely eliminated the effect of the bacterial density and estimated the effect of biofilm induced changes on QACs sensitivity. One has to be careful, however, as bacterial cells in plankton differ from biofilm not only in cell density but also in cell metabolism and extracellular matrix viscoelasticity. To match the fraction of dead cells in the biofilm, the 10-fold dilution of compounds **A₁₄** and **B₁₄** were needed, whereas only 4-fold dilution of compound **C₁₄** was required. This indicates that **C₁₄** has a better activity in the biofilm compared to **A₁₄** and **B₁₄**. The activity of QACs in biofilms relative to plankton was two orders of magnitude lower than usually reported in the literature. Although our biofilms were mature, they were relatively thin (up to 10 μm) which may explain the relatively high efficiency of the QACs against biofilms. Similar observations have been

made for *S. mutans* biofilms, where biofilm cells were only 8 times less susceptible to QACs compared to plankton bacteria (López Pérez et al., 2017).

Er:YAG Photoacoustic Irrigation With QACs in Biofilm Treatment

Although treatment with QACs killed most of the bacteria in biofilms, a significant fraction survived (e.g., 18% with the A₁₄ compound after 60 min of treatment). Since 60 min is far too long for many applications (e.g., in dentistry), we tested if laser treatment could potentiate the effect of QACs. To check this we pretreated the biofilms chemically with the QAC for 1 min followed by Er:YAG photoacoustic streaming treatment for 10 s (Figure 5). As a control, biofilms were pretreated with 0.9% NaCl saline solution followed by laser treatment. In the control samples the Er:YAG photoacoustic streaming substantially decreased the biofilm surface coverage, but did not change the fraction of dead bacteria in the biofilms. It is important to note that in photoacoustic streaming with short laser pulses the laser is not acting directly on the surface but it induces cavitation and consequently increases streaming in the fluid, which removes bacteria from the surface but does not change the ratio of live/dead bacteria. On the other hand, when samples were pretreated with QACs followed by laser treatment the fraction of dead cells increased noticeably.

To quantify the data, the proportion of dead cells and the surface coverage after Er:YAG photoacoustic irrigation were determined and are shown in Figure 5. If the cells were in saline solution the laser treatment significantly decreased the surface coverage, but did not significantly change the ratio of live/dead bacteria which remained on the surface. Although the surface coverage decreased more in saline solution compared to QACs the difference was not significant. On the other hand, when biofilms were chemically pretreated with QACs the fraction of dead cells increased significantly after laser treatment, for all tested QACs. To check if the potentiation provided by laser treatment is synergistic or additive, we have determined the Bliss independence index. In all cases it was positive indicating a synergistic action of QACs and laser treatment. The synergistic effect was most pronounced with the novel B₁₄. Taken together, these data imply that short laser treatment dramatically improves the effectiveness of QACs by removing bacteria from the surface and by increasing the killing rate. This may allow a shorter chemical exposure time and lower dosage of QACs used in applications.

Cytotoxicity of QACs

In vitro cytotoxicity evaluation of QACs on mammalian CHO-K1 (Chinese hamster ovary) cell line is given in Table 3. With the increase in the alkyl chain length the cytotoxic potential of the drugs increased. This effect is probably caused due to the increasing lipophilicity expressed as the Clog *P* (Table 2) and correlates most likely with the ability to penetrate into cells more easily (Marek et al., 2013; Soukup et al., 2020).

TABLE 3 | The effect of the tested compounds on the CHO-K1 cell viability.

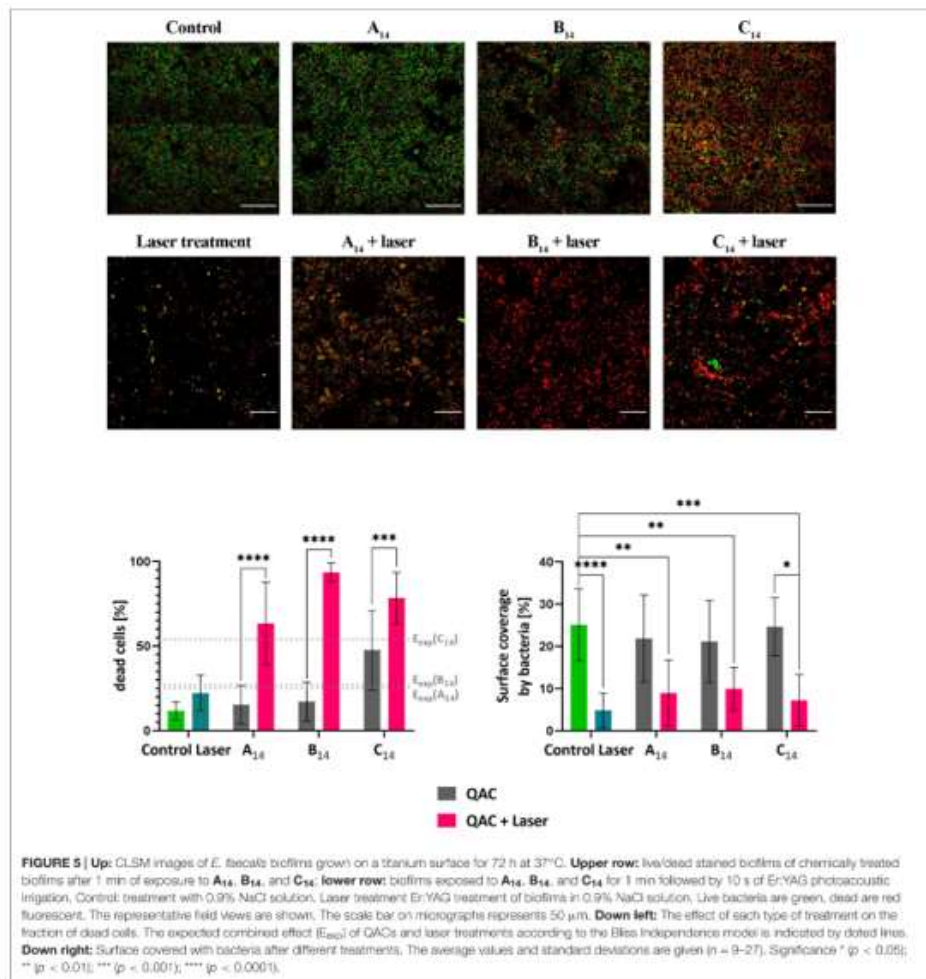
Compound	IC ₅₀ ± SEM (μM)
A ₁₂ ^a	38.90 ± 0.9
A ₁₄ ^a	24.70 ± 0.2
A ₁₆ ^a	16.70 ± 0.2
B ₁₂	25.50 ± 2.5
B ₁₄	17.17 ± 1.3
B ₁₆	12.54 ± 1.1
C ₁₂ ^b	1.43 ± 3.0
C ₁₄ ^b	1.19 ± 0.9
C ₁₆ ^b	1.03 ± 1.0
Sodium hypochlorite	6.45 ± 1.1

Values are expressed as the IC₅₀: Mean ± SEM (n = 3). ^aThe preparation of A_{12–16} has been described elsewhere (Marák et al., 2010). ^bThe preparation and the biological assessment of C_{12–16} have been described elsewhere (Soukup et al., 2020).

The highest cytotoxicity was determined in the series C which is most likely due to the hydroxyethyl group in the structure. The chlorine substituent in the meta position within the series B caused higher cytotoxicity in comparison to series A. The sodium hypochlorite was more cytotoxic than A and B compounds. The cytotoxicity of commonly used or structure modified QACs was already studied several times. However, the comparison of the obtained values with already published is limited due to the assays' differences, especially regarding to the type of the cells used in experiments. Nevertheless, the cytotoxicity of the well-known QACs representative, benzalkonium chloride, is frequently established in similar range as our QACs [EC₅₀ ~ 12.42 μM for human hepatoma cell line (Christen et al., 2017); IC₅₀ ~ 14.8 μM for Human alveolar cells (Kwon et al., 2019); IC₅₀ ~ 22.8 μM for osteosarcoma cybrid cells (Datta et al., 2017)]. On the other hand, lower toxicity was previously described for QAC-like magnetic and non-magnetic ionic liquid surfactants and their polymeric analogs (~50 μM for human embryonic kidney cells) (Fuente-Nunez et al., 2018).

CONCLUSION

All the selected nosocomial bacterial species were susceptible to the tested QACs in the planktonic state. The novel chlorine substituted *N*-alkylpyridinium (B_{12–16}) compounds were most effective against planktonic *S. aureus* with MIC values between 0.5 and 4 μM. The new QACs have an effect comparable to the effect of the non-chlorinated derivatives of *N*-alkylpyridinium and *N*-alkylimidazolium. The activity of QACs on planktonic bacteria was dependent on the initial bacterial concentration in the suspension. By increasing the initial bacterial concentration, which leads to increased bacterial density during the growth, the level of stress experienced by individual cell was increased. This resulted in lowering the effective QAC concentration needed to kill a bacterial cell. All evaluated QACs demonstrate anti-biofilm activity against *E. faecalis* biofilms grown on a titanium



surface. The best anti-biofilm compound was 3-tetradecyl-1-(2-hydroxyethyl)imidazolium bromide (C₁₄) which was the most cytotoxic. Compared to planktonic bacteria, the biofilm bacteria were only 4-fold more resistant to C₁₄. The most significant finding of this study is that a short 10 s treatment of Er:YAG - SSP photoacoustic steaming irrigation in the presence of new *N*-alkylpyridinium improved significantly its anti-biofilm action. In particular, it decreased the surface coverage of the biofilm and significantly increased the fraction of dead

bacteria. The application of QACs supported by photoacoustic irrigation could be a promising new strategy in combating biofilm-related problems.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

This study uses strains that were isolated from the samples obtained in the clinical laboratory at the University Hospital Hradec Kralove. The University Hospital Hradec Kralove did not require the study to be reviewed or approved by an Ethics Committee because the clinical strains used in this study come from the routine procedures in the clinical laboratory.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MH performed biological experiments, result analysis, conducted the work and was involved in the designing of the work, writing and interpretation of the data. ST was participating on biological experiments, designing of the work, writing and interpretation of the data. AM performed synthesis and participated in writing. LPr performed NMR and HPLC analysis. LPu performed cytotoxicity experiments. MB participate in writing and interpretation of the data. ID was involved in CSLM imagining, data analysis and writing. JM participated in synthesis, writing and interpretation of the data. DS was involved in designing of the work, writing, interpretation of the data and submission of the manuscript.

REFERENCES

Akçay, M., Arslan, H., Mese, M., Durmus, N., and Capar, I. D. (2017). Effect of photon-initiated photoacoustic streaming, passive ultrasonic, and sonic irrigation techniques on dentinal tubule penetration of irrigation solution: a confocal microscopic study. *Clin. Oral Investig.* 21, 2205–2212. doi: 10.1007/s00784-016-2013-y

ASTM International (2017). *ASTM E2799-17, Standard Test Method for Testing Disinfectant Efficacy Against Pseudomonas aeruginosa Biofilm using the MBEC Assay*. West Conshohocken, PA: ASTM International.

Bliss, C. I. (1939). The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26, 585–615. doi: 10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x

Boutsoukis, C., Verhaagen, B., Vershuis, M., Kastrinakis, E., Wesselink, P. R., and van der Sluis, L. W. M. (2010). Evaluation of irrigant flow in the root canal using different needle types by an unsteady computational fluid dynamics model. *J. Endod.* 36, 875–879. doi: 10.1016/j.joen.2009.12.026

Brown, P., Sresht, V., Eral, B. H., Fiore, A., Fuente-Núñez, C., O'Mahony, M., et al. (2017). CO₂-reactive ionic liquid surfactants for the control of colloidal morphology. *Langmuir* 33, 7633–7641. doi: 10.1021/acs.langmuir.7b00679

Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., and Buret, A. (1999). The calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1771–1776. doi: 10.1128/jcm.37.6.1771-1776.1999

Christen, V., Faltermann, S., Bean, N. R., Kunz, P. Y., and Fent, K. (2017). Cytotoxicity and molecular effects of biocidal disinfectants (quaternary ammonia, glutaraldehyde, poly(hexamethylene biguanide) hydrochloride PHMB) and their mixtures in vitro and in zebrafish cleuthero-embryos. *Sci. Total Environ.* 586, 1204–1218. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.114

Clarkson, R. M., and Moule, A. J. (1998). Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. *Aust. Dent. J.* 43, 250–256. doi: 10.1111/j.1834-7819.1998.tb00173.x

CLSI (2018). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: CLSI Standard M07*, 11th Edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Courvalin, P. (2016). Why is antibiotic resistance a deadly emerging disease? *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 405–407. doi: 10.1016/j.cmi.2016.01.012

FUNDING

This work was supported by the Lifelong Learning Programme/ERASMUS of the European Commission, which allowed a working collaboration between the research groups at the University of Defence in Brno and the University of Ljubljana. We would like to acknowledge the financial support from the Slovenian Research Agency (research core funding P4-0116) and Ministry of Health of the Czech Republic (project NV 19-09-00198), Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project SV/FVZ201905), and Faculty of Military Health Sciences (Long-term development plan). The *E. faecalis* DSM 16431 was provided by SymbioGruppe GmbH & Co KG SymbioPharm GmbH). The titanium disks and Er:YAG laser system was provided by Fotona d.o.o., Ljubljana. The microscopy was supported by the University infrastructural center "Microscopy of biological samples" located in Biotechnical Faculty, University of Ljubljana.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Ian McColl MD, Ph.D. for assistance with the manuscript.

Datta, S., Baudouin, C., Brignole-Bandouin, F., Denoyer, A., and Cottopassi, G. A. (2017). The eye drop preservative benzalkonium chloride potently induces mitochondrial dysfunction and preferentially affects LHON mutant cells. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 58:2406. doi: 10.1167/iov.16-20903

Dolezal, R., Soukup, O., Malinák, D., Svedra, R. M. L., Marek, J., Dolezalova, M., et al. (2016). Towards understanding the mechanism of action of antibacterial N-alkyl-3-hydroxypyridinium salts: biological activities, molecular modeling and QSAR studies. *Eur. J. Med. Chem.* 121, 699–711. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.05.058

Fouquier, J., and Guedj, M. (2015). Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol. Res. Perspect.* 3:e00149. doi: 10.1002/prp2.149

Fuente-Núñez, C., Brown, P., Torres, M. D. T., Cao, J., and Lu, T. K. (2018). Magnetic surfactant ionic liquids and polymers with tetrahaloferrate (III) anions as antimicrobial agents with low cytotoxicity. *Colloid Interface Sci. Commun.* 22, 11–13. doi: 10.1016/j.colcom.2017.11.002

Gerba, C. P. (2015). Quaternary ammonium biocides: efficacy in application. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 464–469. doi: 10.1128/AEM.02633-14

Jennings, M. C., Ator, L. E., Pania, T. J., Minbiole, K. P. C., and Wuest, W. M. (2014). Biofilm-eradicating properties of quaternary ammonium amphiphiles: simple mimics of antimicrobial peptides. *ChemBioChem* 15, 2211–2215. doi: 10.1002/cbic.201402254

Khan, H. A., Baig, F. K., and Mehboob, R. (2017). Nosocomial infections: epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 7, 478–482. doi: 10.1016/j.apitb.2017.01.019

Kurzmann, C., Meire, M. A., Lettner, S., Farmakis, E. T. R., Moritz, A., and De Moot, R. J. G. (2019). The efficacy of ultrasonic and PIPS (photon-induced acoustic streaming) irrigation to remove artificially placed dentine debris plugs out of an artificial and natural root model. *Lasers Med. Sci.* 35, 719–728. doi: 10.1007/s10103-019-02912-3

Kwon, D., Lim, Y., Kwon, J., Shim, I., Kim, E., Lee, D., et al. (2019). Evaluation of pulmonary toxicity of benzalkonium chloride and triethylene glycol mixtures using in vitro and in vivo systems. *Environ. Toxicol.* 34, 561–572. doi: 10.1002/tox.22722

Li, F., Weir, M. D., and Xu, H. H. K. (2013). Effects of quaternary ammonium chain length on antibacterial bonding agents. *J. Dent. Res.* 92, 932–938. doi: 10.1177/0022034513502053

- López Pérez, D., Baker, P. J., Pintar, A. L., Sun, J., Lin, N. J., and Lin-Gibson, S. (2017). Experimental and statistical methods to evaluate antibacterial activity of a quaternary pyridinium salt on planktonic, biofilm-forming, and biofilm states. *Biofouling* 33, 222–234. doi: 10.1080/08927014.2017.1286476
- Lukač, N., and Jereček, M. (2018). Amplification of pressure waves in laser-assisted endodontics with synchronized delivery of Er:YAG laser pulses. *Lasers Med. Sci.* 33, 823–833. doi: 10.1007/s10103-017-2435-z
- Marek, J., Malinák, D., Dolezal, R., Soukup, O., Pasdiorova, M., Dolezal, M., et al. (2015). Synthesis and disinfection effect of the pyridine-4-aldoxime based salts. *Molecules* 20, 3681–3696. doi: 10.3390/molecules20033681
- Marek, J., Studulka, P., Cabal, I., Soukup, O., Pohanka, M., Korabecny, I., et al. (2010). Preparation of the pyridinium salts differing in the length of the N-Alkyl substituent. *Molecules* 15, 1967–1972. doi: 10.3390/molecules15031967
- Oliv, G., DiVito, E., Peters, O., Kaitzas, V., Angiero, F., Signore, A., et al. (2014). Disinfection efficacy of photon-induced photoacoustic streaming on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *J. Am. Dent. Assoc.* 145, 843–848. doi: 10.14219/jada.2014.46
- Olson, M. E., Ceri, H., Moreck, D. W., Buret, A. G., and Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 66, 86–92.
- Paz, I. E. C., Bergenholtz, G., and Svensäter, G. (2010). The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J. Endod.* 36, 70–77. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.017
- Rémy, B., Mison, S., Pfenner, L., Elkas, M., Chabrière, E., and Daudé, D. (2018). Interference in bacterial quorum sensing: a biopharmaceutical perspective. *Front. Pharmacol.* 9, 203. doi: 10.3389/fphar.2018.00203
- Shtyrlin, N. V., Sapozhnikov, S. V., Gallullina, A. S., Kayumov, A. R., Bondar, O. V., Mirchink, E. P., et al. (2016). Synthesis and antibacterial activity of quaternary ammonium 4-deoxypyridoxine derivatives. *BioMed Res. Int.* 2016.3864193. doi: 10.1155/2016/3864193
- Soukup, O., Benkova, M., Dolezal, R., Sleha, R., Malinák, D., Salajkova, S., et al. (2020). The wide-spectrum antimicrobial effect of novel N-alkyl monoquaternary ammonium salts and their mixtures: the QSAR study against bacteria. *Eur. J. Med. Chem.* 206:112584. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112584
- Tischer, M., Pradel, G., Ohlsen, K., and Holzgrabe, U. (2012). Quaternary ammonium salts and their antimicrobial potential: targets or nonspecific interactions? *ChemMedChem* 7, 22–31. doi: 10.1002/cmdc.201100404
- Watkins, K. (2018). Emerging infectious diseases: a review. *Curr. Emerg. Hosp. Med. Rep.* 6, 86–93. doi: 10.1007/s40138-018-0162-9
- Zehnder, M. (2006). Root canal irrigants. *J. Endod.* 32, 389–398. doi: 10.1016/j.joen.2005.09.014
- Zhang, K., Cheng, L., Weir, M. D., Bai, Y.-X., and Xu, H. H. (2016). Effects of quaternary ammonium chain length on the antibacterial and remineralizing effects of a calcium phosphate nanocomposite. *Int. J. Oral Sci.* 8, 43–53. doi: 10.1038/ijos.2015.33
- Zhang, Y., Chen, Y., Hu, Y., Huang, F., and Xiao, Y. (2018). Quaternary ammonium compounds in dental restorative materials. *Dent. Mater. J.* 37, 183–191. doi: 10.4012/dmj.2017-096

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Hympanova, Terlep, Markova, Prehal, Dogša, Pulkrabkova, Benkova, Marek and Štopar. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Příloha E – Vybraná publikace II.

Hympanova, M., Oliver-Urrutia, C., Vojta, M., Macháček, M., Krupka, P., Kukla, R., Celko, L., Montufar, E.B., Marek, J. Assessment of *Streptococcus mutans* biofilm formation on calcium phosphate ceramics: The role of crystalline composition and microstructure. *Biomater. Adv.* **135**, 212750 (2022). doi:10.1016/j.bioadv.2022.212750.

IF₍₂₀₂₀₎ = 7,328



Assessment of *Streptococcus mutans* biofilm formation on calcium phosphate ceramics: The role of crystalline composition and microstructure

Michaela Hympanova^{a,b}, Carolina Oliver-Urrutia^c, Marek Vojta^d, Miloslav Macháček^e, Pavel Krupka^f, Rudolf Kukla^g, Ladislav Celko^c, Edgar B. Montufar^{c,*}, Jan Marek^{a,b,h,i}

^a Biomedical Research Centre, University Hospital Hradec Kralove, Sokolaka 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

^b Department of Epidemiology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebovka 1575, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

^c Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Parkynova 123, 61200 Brno, Czech Republic

^d Department of Biology, Faculty of Science, University of Hradec Kralove, Rokitanského 62, 500 03 Hradec Kralove, Czech Republic

^e Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University, Heyrovského 120/1, Hradec Kralove 500 05, Czech Republic

^f Department of Dentistry, University Hospital Hradec Kralove, Sokolaka 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

^g Department of Clinical Microbiology, University Hospital Hradec Kralove, Sokolaka 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Calcium phosphate
Oral biofilm model
Streptococcus mutans
Biofilm
Bacteria

ABSTRACT

Streptococcus mutans is one of the bacteria that initiates the colonization of the pellicle at the tooth surface. It forms a plaque, together with other bacteria, which gradually dissolves the pellicle and leaves the tooth surface unprotected against the acidic oral environment. Calcium phosphate ceramics are excellent synthetic materials for the study of biofilm formation in dentistry because they are comparable to teeth in chemical composition and structure. Calcium phosphates can be processed to achieve a variety of crystalline compounds with biologically relevant ionic substitutions and structures that allow study of the effect of the surface chemistry and the topography independently. In this article, we describe the preparation and characterization of three types of calcium phosphate-based materials as a suitable surface for the formation of the *S. mutans* biofilm: beta-tricalcium phosphate (β -TCP); sintered hydroxyapatite (SHA); and calcium-deficient hydroxyapatite (CDHA). The densest biofilms were formed on the surfaces of SHA and CDHA, with no significant differences due to the stoichiometry or microstructure. In contrast, β -TCP showed a lower susceptibility to *S. mutans* biofilm formation, suggesting that the crystalline structure is the controlling parameter. Subsequently, SHA was selected to develop a dental biofilm model that allowed study of *S. mutans* biofilm susceptibility to chlorhexidine and ethanol.

1. Introduction

Dental caries together with periodontal and oral mucosal diseases are causing significant oral health issues all over the world [1]. The metabolism of sugars and carbohydrates from food creates an acidic oral environment in which the quantity of carbohydrates in the diet and the frequency of their intake are essential factors in caries etiology. Currently, frequent teeth brushing is the best preventive measure against caries. After brushing, the tooth surface begins to be covered almost immediately with a layer of saliva, glycoproteins, and phosphoproteins. These substances form a protecting pellicle on the tooth surface against food and acids produced by bacteria. However, the pellicle is also convenient for bacterial adhesion and subsequent plaque

formation. Over time, bacteria attach to the tooth and produce enzymes that dissolve the pellicle and leave the tooth surface unprotected [2]. Subsequently, the acidic oral environment causes hydroxyapatite demineralization and dentin destruction [3,4]. One of the bacteria which initiates the colonization is *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) [5]. *S. mutans* can adhere directly to the pellicle, or can colonize an already formed plaque. Moreover, the extracellular matrix formed by *S. mutans*, increases the virulence and contributes to plaque formation, making these bacteria the main target when fighting against tooth decay. However, the complexity of the environment of the oral cavity and polymicrobial interactions make difficult to understand comprehensively all the factors involved in biofilm formation and caries progression [6,7]. Therefore, the development of an *in vitro* dental biofilm

* Correspondence to: E.B. Montufar, Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Parkynova 123, 61200 Brno, Czech Republic.

** Correspondence to: J. Marek, Biomedical Research Centre, University Hospital Hradec Kralove, Sokolaka 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic.
E-mail addresses: eb.montufar@ceitec.vutbr.cz (E.B. Montufar), jan.marek@uhh.cz (J. Marek).

<https://doi.org/10.1016/j.biomadv.2022.212750>

Received 2 December 2021; Received in revised form 14 February 2022; Accepted 4 March 2022

Available online 18 March 2022

2772-9508/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

model is an attractive approach for studying the complex nature of oral microbial diseases in a simplified, reproducible and controlled way. Most of the dental biofilm models so far developed have focused on imitating the diversity of the oral microbiome, whilst almost no attention has been devoted to mimicking the surface of the teeth [8].

Calcium phosphate ceramics are excellent synthetic materials for the study of dental biofilm formation because they have a chemical composition and structure similar to those of teeth [9]. Moreover, calcium phosphates can be processed to achieve a variety of crystalline compounds with biologically relevant ionic substitutions and structures that facilitate the study of the effect of each material variable independently. Due to the similarity with bone, calcium phosphate ceramics are used as bone grafts and as coatings to improve the osseointegration of dental implants [10–14], and as may be expected, some works have also studied biofilm formation on calcium phosphates using strains of bacteria commonly causing surgical site bone infections [15–20]. Hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate (β -TCP) have been the predominant materials studied because they are the calcium phosphates most frequently used in bone repair [9]. In the oral field, hydroxyapatite and β -TCP in the form of particles and nanoparticles are used as teeth remineralizers in products to improve oral hygiene (toothpaste and mouthwash) [21,22].

Several works have studied adhesion, biofilm formation, protein interactions, and adherence inhibitors of *S. mutans* on hydroxyapatite [23–28]. Such works provide limited information of the physicochemical properties of the hydroxyapatite used, and therefore neglect the diversity of different apatites that exist [29]. In fact, hydroxyapatite may exist as stoichiometric (Ca/P ratio of 1.67) and non-stoichiometric (Ca/P ratio from 1.50 to <1.67) compound, each in a wide range of grain size, porosity and specific surface area (SSA). Furthermore, the crystalline lattice of hydroxyapatite allows several ionic substitutions, including replacement of calcium by monovalent and divalent cations, the most relevant being magnesium, substitution of phosphate groups by acidic phosphates and carbonate, and substitution of hydroxyls by fluorine and carbonate, among others [30]. Such diversity in composition and structure has a paramount effect on reactivity in the biological environment, and consequently not all types of apatites have the same activity, their osteogenic capacity being the most studied [31].

Among the variants, high temperature sintered hydroxyapatite (SHA) and biomimetic calcium-deficient hydroxyapatite (CDHA; Ca/P ratio of 1.50) are the most attractive synthetic apatites for mimicking the surface of the teeth and studying formation of the *S. mutans* biofilm. In general, SHA has a low SSA, large grain size, and high degree of crystallinity, whereas biomimetic CDHA consists of an entangled network of non-stoichiometric nanocrystals with high SSA. Thus, SHA and CDHA deserve to be studied in a first stage to observe whether differences exist between these two dissimilar materials with the same crystalline lattice. In addition, there is an interest to study the biofilm formation on β -TCP because it is used as often as hydroxyapatite as a bone graft and tooth remineralizer, and can be obtained with microstructural features equivalent to those of SHA. Moreover, it has been reported that β -TCP is able to reduce biofilm formation in comparison to CDHA [19].

Hence, in this study three types of calcium phosphate-based materials have been prepared and characterized as suitable materials for *S. mutans* biofilm formation. SHA, CDHA and β -TCP were compared in terms of stoichiometry, crystalline composition, and microstructure for selection of a suitable surface for a basic dental biofilm model. Confocal laser scanning microscopy, scanning electron microscopy and CFU (colony forming units) counting have been used for the imaging, analysis, and characterization of the *S. mutans* biofilm. SHA has been utilized as the most suitable surface for studying the susceptibility of the biofilm to chlorhexidine and ethanol.

2. Materials and methods

2.1. Processing of calcium phosphates

α -tricalcium phosphate (α -TCP) powder (produced in-house by solid state reaction [32], particle size between 32 and 45 μ m) was mixed with a 2.5 wt% aqueous solution of disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4 ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA) at a liquid to powder ratio of 0.60 ml/g. The paste was placed in Teflon moulds to shape disks (11 mm diameter and 2 mm thickness), that were immersed in water for 10 days at 37 °C to ensure complete hydrolysis of the α -TCP powder into CDHA. CDHA disks were subsequently immersed in a 20 wt% suspension of sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3 ; LachNer, Czech Republic) for 24 h at 190 °C for carbonation. Sintering of CDHA and carbonated-CDHA disks for 9 h at 1100 °C resulted in β -TCP and SHA disks, respectively.

2.2. Characterization of calcium phosphates

The crystalline phase composition of the materials was determined by X-ray diffraction (XRD; Rigaku; SmartLab, 3 kW CF2, Japan). Scans were performed in Bragg-Brentano geometry, using Cu K α radiation (40 kV, 30 mA), scanning the 2-theta range between 10° and 90°, at a scanning rate of 3°/min. The diffraction patterns were compared with the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD) for phase identification, including structural models for α -TCP (ICSD No. 923), β -TCP (ICSD No. 6191) and HA (ICSD No. 024240). The microstructure of the samples was observed using scanning electron microscopy (SEM; TESCAN; Lyra3, Czech Republic) at an acceleration voltage of 5 kV after the surface was coated with a nanometric carbon layer. The specific surface area (SSA) was determined by nitrogen adsorption (NOVA 3200; Quantachrome Instruments) using the Brunauer-Emmett-Teller method. The porosity was measured by the Archimedes method, assuming that the theoretical density corresponded to the skeletal density measured by helium pycnometry (Micromeritics; AccuPyc II 1340).

2.3. Biofilm growth

S. mutans was isolated from (dental) supragingival plaque during routine procedures in the clinical laboratory at the University Hospital in Hradec Kralove. The isolate was identified using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS system, Bruker Daltonik GmbH, Germany). The culture was stored in stocks using ITEST CRYOBANK B cryotubes (IATEST plus s.r.o., Hradec Kralove, Czech Republic) in a freeze box at -70 °C. Prior to experiments, 100 μ l of stock was transferred into 10 ml of Trypticase soya broth (TBS; HiMedia, Caderny-Envitek, Prague, Czech Republic) and grown overnight in the dark under aerobic conditions at 37 °C, 120 rpm. For the disk inoculation, the overnight culture was diluted 1:100 in brain heart infusion broth (BHI; HiMedia, Caderny-Envitek, Prague, Czech Republic). Disks were disinfected with 70% EtOH in H₂O for 30 min and placed individually into wells of a 24-well plate. Each disk was immersed in 2 ml of the inoculum. The biofilm was formed for 72 h at 37 °C without shaking.

2.4. CLSM biofilm imaging

The confocal laser scanning microscopy (CLSM) imaging was optimized from the procedure described for *Enterococcus faecalis* [33,34]. The biofilms formed on the disks were rinsed with saline (0.9% NaCl in H₂O) and stained with 10 μ l of premixed saline-diluted Syto 9 and propidium iodide stock solutions (1:100) from LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit L7012 (Thermo Fisher Scientific, Oregon, USA). After 5 min of incubation in the dark the samples were investigated by Nikon A1+ confocal microscope system (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with 488 and 561 nm lasers for FITC and Cy3 channels, respectively. Photomicrographs were taken with 40 \times lens (Nikon CFI

Plan Apochromat Lambda 40×, N.A. 0.95) at three randomly selected fields of view (FOV). The typical Z-step of the Z-stack was 1 μm with pinhole diameter set at 33 μm and 7–15 focal planes were chosen to cover the whole volume of the sample in the selected FOV. Image acquisition and operation of the microscope were performed using NIS Elements AR 4.20.01. A custom script was written (Image J) and used to evaluate two parameters of the formed biofilm: the fraction of dead cells and the bacterial density on the surface.

2.5. SEM biofilm imaging

The biofilms formed on the disks were rinsed with saline (0.9% NaCl in H₂O) and fixed before SEM imaging according to the Leica sample preparation protocol. Briefly, all specimens were fixed with 3% glutaraldehyde in H₂O (glutaraldehyde Grade I; Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) for 16 h at 4 °C. Next, the samples were washed three times with distilled water and post-fixed with 1% aqueous OsO₄ (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) for 16 h at 4 °C. Next, the samples were washed three times with distilled water and dehydrated in a graded ethanol series (30, 50, 70, 85, 96, and 100% for 10 min each at 25 °C). The specimens were then dehydrated in a graded acetone series (30, 50, and 100% for 10 min each at 25 °C), dried by critical point drying in Leica EM CPD 300 (Leica microsystems, Illinois, USA), mounted on carbon stubs, and sputter-coated with an 8 nm gold layer using an ion coater Leica EM ACE200 (Leica microsystems, Illinois, USA). The microstructure of the samples was observed by Hitachi FlexSEM 1000 (Hitachi, Tokyo, Japan) at an acceleration voltage of 15 kV.

2.6. Biofilm analysis by CFU counting

Each disk with biofilm was rinsed with saline and transferred to sterile wells of a 24-well plate containing 1 ml of fresh BHI broth. The plate was sealed with parafilm and sonicated for 10 min. Serial dilutions of the broth with the disrupted and released biofilm were inoculated on BHI agar plates. The bacteria in the biofilm were then quantified by CFU counting after plate incubation at 37 °C for 24 h.

2.7. Biofilm analysis by alamar blue assay

The alamar blue (AB) biofilm assay and calculation of the percent reduction of AB were performed as previously described in the literature [35,36]. The blue-colored oxidized state of AB is reduced in metabolically-active cells to the pink-colored resorufin. AlamarBlue™ Cell viability reagent (Invitrogen, ThermoFisher) was aliquoted and stored at 4 °C. Exposure of AB to light was minimized throughout the experiments. Each disk with biofilm was rinsed with saline and transferred to sterile wells of a 24-well plate containing a mixture of 900 μl BHI broth and 100 μl AB. The plate was covered with aluminum foil and incubated in the dark for 24 h at 37 °C. After 24 h of incubation, absorbances at 570 nm and 600 nm were obtained by spectrophotometer (Synergy™ HT, Bio-Tek Instruments, Vermont, USA). Controls included media alone and media plus AB. Percent reduction of AB was calculated using the manufacturer's formula:

$$\frac{(e_{ox})\lambda_2 A'_1 - (e_{ox})\lambda_1 A'_2}{(e_{red})\lambda_1 A'_1 - (e_{red})\lambda_2 A'_2} \times 100$$

where,

e_{ox} = molar extinction coefficient of AB oxidized form (blue).

e_{red} = molar extinction coefficient of AB reduced form (pink).

A' = absorbance of test wells.

A' = absorbance of negative control well.

λ_1 = 570 nm.

λ_2 = 600 nm.

2.8. Alamar blue planktonic assay

The overnight culture of *S. mutans* prepared as described above in the biofilm growth section was serially diluted in BHI broth to obtain suspensions of *S. mutans* containing approximately 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ and 10⁹ CFU/ml. Serial dilutions of all prepared suspensions were plated on BHI agars to control the obtained CFU/ml. In addition, 90 μl of prepared suspension and 10 μl of AB were transferred to wells of a sterile 96-well plate and mixed thoroughly. The plate was covered with aluminum foil and incubated in the dark for 24 h at 37 °C. The absorbances at 570 nm and 600 nm were obtained after 24 h of incubation. Controls included media alone and media plus AB. Percent reduction of AB was calculated as described above in the AB biofilm assay section. The results were used to create a standard curve to express the results of AB reduction in CFU/ml.

2.9. Correlation of Alamar blue reduction and CFU counting

For correlation experiments, AB assay and CFU counting were performed on the same day using a single inoculum. Experiments were repeated at least three times. Pearson's two tailed correlations were calculated with Prism 6.04 software (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) using averaged data from all the experiments.

2.10. Biofilm susceptibility by alamar blue assay

Chlorhexidine at 0.2, 0.1 and 0.01% (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) and ethanol at 70% (VWR International s.r.o., Prague, Czech Republic) dissolved in saline solution were used for the biofilm susceptibility experiments. Disks with biofilm were exposed to the chemicals for 2 min by immersing the disks in 1 ml of the chemical solution. After the exposure time, the disks were rinsed with saline and transferred to sterile wells of a 24-well plate containing a mixture of 900 μl BHI broth and 100 μl AB. The next steps and the calculation of the percent reduction of AB were performed as described above in the AB biofilm assay after 3, 5 and 24 h of incubation. Plates were kept in an incubator at 37 °C between absorbance readings. The negative control included media plus AB plus drug dilution and disinfected disk.

2.11. Changes of pH and ion concentrations in the culture medium

Changes of pH as well as P and Ca concentration in the BHI broth were evaluated after biofilm formation. In addition, the pH and these ions concentrations were measured in the broth after incubation of the materials without bacteria in the same conditions (i.e. 72 h at 37 °C) as reference. The pH was measured by pH meter EDGE (Hanna Instruments Czech s.r.o., Praha, Czech Republic) using 2 ml of medium. The ion concentrations were quantified by phosphorus and calcium kits (Erba Lachema s.r.o., Brno, Czech Republic) according to manufacture protocol. Briefly, the concentration of P was established by titration with ammonium molybdate 1.00 mmol/l and sulphuric acid 336 mmol/l, whereas titration with phosphate buffer (pH 7.8 ± 0.1) 50 mmol/l and Arsenazo III 0.10 mmol/l was used for Ca concentration determination. In each case 2 μl of BHI broth were transferred to 200 μl of appropriate reagent and incubated for 1 or 5 min at 35 °C for Ca and P, respectively. The absorbance was measured after incubation at 650 nm and 340 nm for Ca and P, respectively. The concentration of ions was calculated with the formula:

$$C_{\text{sample}} = \Delta A_{\text{sample}} / \Delta A_{\text{standard}} \times C_{\text{standard}}$$

where C_{sample} is the concentration of P or Ca in the sample; ΔA_{sample} is the absorbance of the sample; $\Delta A_{\text{standard}}$ is the absorbance of the standard with known concentration of ions; and C_{standard} is the concentration of P or Ca in the standard. Lyonorm Calibrator (Erba Lachema s.r.o., Brno, Czech Republic) was used as standard.

2.12. Statistical analysis

All experiments were independently performed at least 3 times with 1 disk per group. Moreover, 3 randomly selected scanned areas per disk were observed by CLSM or SEM. All results were analysed by Shapiro-Wilk normality test. Since the data were normally distributed, the Tukey's multiple comparison test was used to analyze the dead/live ratio, AB reduction, and CFU results, where P -values of <0.05 were considered to be significant. All statistical analyses and corresponding graphical representation were performed by GraphPad Prism 6.04 software (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA).

3. Results

3.1. Characterization of calcium phosphate materials

Fig. 1a shows that the microstructure of CDHA disks corresponded to an entangled network of plate-like nanocrystals with a SSA of $13 \text{ m}^2/\text{g}$ and porosity in the submicrometer scale of 49%. The crystalline composition corresponded with hydroxyapatite with broad diffraction peaks (Fig. 2) as a consequence of the small crystal size and calcium deficiency in the crystalline lattice. A small quantity of unreacted α -TCP was detected in the XRD pattern of CDHA.

Sintering resulted in a microstructure of polyhedral crystals with smooth surfaces and pores around $1 \mu\text{m}$ in size (Fig. 1b and c), having SSA below $1 \text{ m}^2/\text{g}$. XRD shows that CDHA transformed into phase-pure β -TCP upon sintering, whereas carbonated-CDHA retained the apatitic crystalline structure (Fig. 2). Both β -TCP and SHA showed sharp XRD peaks characteristic of large and defect-free crystalline domains. In addition, SHA showed small intensity diffractions of β -TCP, NaCaPO_4 (ICSD No. 35629) and no signals of CaO. SHA developed larger grains ($4.0 \mu\text{m}$ vs. $1.5 \mu\text{m}$) and slightly lower porosity (38% vs. 41%) than β -TCP.

3.2. Biofilm analysis

The AB-based assay examined the metabolic activity within the biofilm and estimated the proportion of viable biofilm mass (Fig. 3). The estimated number of *S. mutans* cells growing in the biofilm on SHA, CDHA and β -TCP were $11.8 \times 10^6 \pm 2.60 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$; $9.68 \times 10^6 \pm 3.11 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$; and $1.50 \times 10^6 \pm 3.22 \times 10^5 \text{ CFU/ml}$ (mean \pm SD), respectively. The number of viable bacteria was confirmed by CFU counting after ultrasound disruption of the biofilm (Fig. 3), resulting in $1.55 \times 10^7 \pm 4.73 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ on SHA, $2.43 \times 10^7 \pm 7.64 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ on CDHA and $3.92 \times 10^6 \pm 1.87 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$ on β -TCP. Moreover, the results obtained from AB assay and CFU counting had excellent correlation according to Pearson's two-tailed correlation coefficient (r (HA) = 0.96; r (CDHA) = 0.97; r (TCP) = 0.99). Thus, it was demonstrated that SHA and CDHA were significantly more suitable for

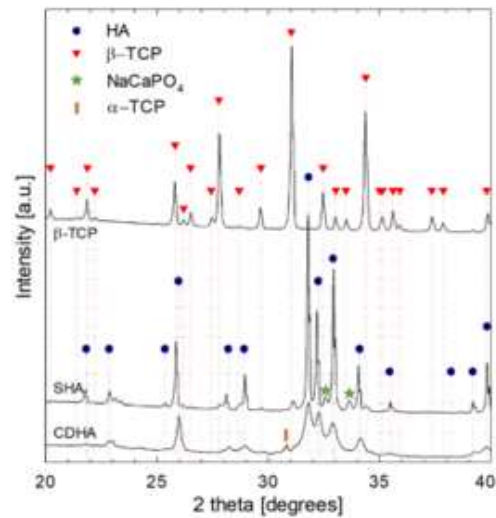


Fig. 2. XRD patterns of the calcium phosphate materials before (CDHA) and after (SHA and β -TCP) sintering.

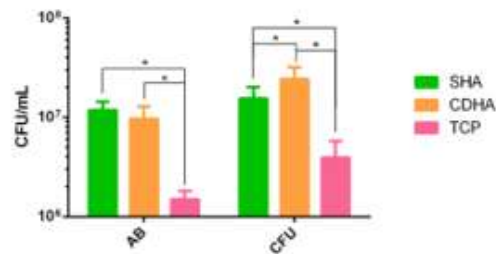


Fig. 3. Number of viable *S. mutans* cells in the biofilms after 72 h at 37°C determined by direct AB assay and CFU counting after disruption of biofilm. The average values and standard deviations are given ($n = 12$ to 14). Significance * ($p < 0.0001$).

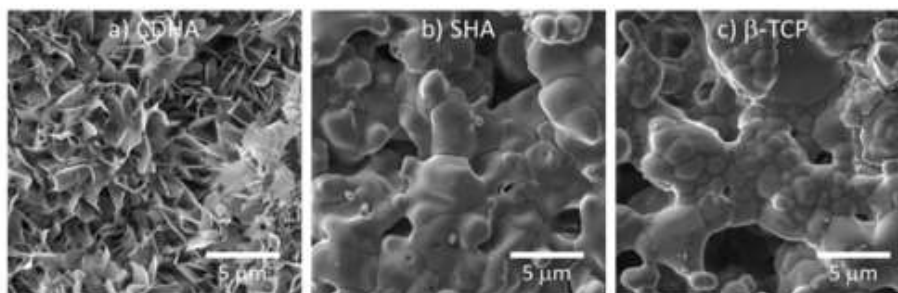


Fig. 1. Microstructure of the calcium phosphate materials a) before sintering (CDHA) and after sintering, i.e. b) SHA and c) β -TCP.

S. mutans adhesion and subsequent biofilm formation compared with β -TCP. AB assay did not show differences in biofilm formation between SHA and CDHA, but CFU counting showed a significantly greater presence of bacteria on CDHA than on SHA (Fig. 3).

Live/dead analysis results showed that approximately 50–60% of living bacteria were constructing the biofilm mass (Fig. 4). A significant difference between all the tested materials was not discovered. Unfortunately, the bacterial density could not be quantified due to a strong fluorescent background caused by adsorption of fluorescent dyes in the porosity of the materials, but fewer bacteria were observed on β -TCP than on CDHA and SHA.

The visual characterization of biofilms was performed by SEM imaging and the obtained images (Fig. 5) were in concordance with the above-described results, i.e. SHA and CDHA were much more massively covered by bacterial cells, forming highly densely populated clusters, whereas β -TCP was colonized by a considerably lower amount of mostly individual bacteria, located predominantly inside the pores.

3.3. Biofilm susceptibility to chlorhexidine and ethanol

The antibacterial effectiveness of chlorhexidine and ethanol was evaluated by observing the capacity of the treated biofilm to reduce the AB reagent. Successful antimicrobial activity was deemed when the biofilm generated a reduction of AB of less than 10% after 24 h of incubation. Obtained results are shown in Table 1. It is clear that the untreated biofilm generated a reduction of AB of more than 50% shortly after 3 h of incubation. Chlorhexidine at a concentration $\geq 0.1\%$ was an effective antibacterial chemical. At lower concentration (0.01%), chlorhexidine did not provide sufficient antimicrobial activity, since the biofilm caused more than 25% of AB reduction already after 3 h of incubation. Ethanol exhibited a lethargic effect on the biofilm with less than 10% of AB reduction during 5 h. However, at 24 h a certain number of surviving bacteria generated a percentage reduction of AB of more than 25%.

3.4. Measurements of the pH and ion concentrations in culture medium

P concentration at the end of incubation of the materials without *S. mutans* was nearly the same than the initial concentration in the BHI broth (Fig. 6a). In contrast, the concentration of Ca increased (Fig. 6b), probably due to the low initial concentration of Ca in the broth. Less Ca release and minor changes in P concentration were observed in the case of β -TCP. SHA and β -TCP did not change the pH without bacteria, whereas CDHA slightly acidified the culture medium (Fig. 6c). The growth of *S. mutans* biofilm clearly reduced the pH from 7.39 ± 0.04 to 5.59 ± 0.09 , without differences between the three materials (Fig. 6c). The acidification of the broth caused in turn the release of P and booster

the release of Ca, significantly increasing the concentration of these ions concerning the initial concentrations (Fig. 6a and b).

4. Discussion

The development of dental caries is a multifactorial process that begins with bacterial adhesion and progresses forming a bacterial biofilm. Bacterial adhesion and biofilm formation are influenced by surface features (wettability, surface charge, roughness, phase composition) [15] and environmental conditions (temperature, availability of nutrients, osmolarity, ion concentration) [37]. The study of all these variables and susceptibility testing require a dental biofilm-like model. Driven by the search for solutions to ongoing difficulties in studying biofilm-associated infections in the human body, several models have already been developed, such as the universal Calgary biofilm device [38] and the more sophisticated Zürich biofilm model [39]. However, no model has yet been defined as the gold standard for the investigation of biofilm formation and susceptibility testing during caries formation. The aim of this study was to make one step forward towards the development of such model by exploring *in vitro* the effects of the composition and microstructure of calcium phosphate materials on *S. mutans* biofilm formation.

Three types of calcium phosphates were prepared, analysed, and used for biofilm formation. SHA and CDHA are equivalent in crystalline structure (both belong to the same hexagonal lattice system, Fig. 2) and have the same chemical composition, but differ in chemical stoichiometry and microstructure (Fig. 1), which had previously been demonstrated to influence reactivity in the biological environment [40]. Surprisingly, no differences in bacterial number in the biofilm were detected by AB assay, with only slightly higher CFU counts observed on CDHA than on SHA, despite the considerably larger SSA and roughness of CDHA. This observation reflects the high specialization of *S. mutans* to adhere and growth on apatites, making that stoichiometry (calcium deficiency) and surface texture (microstructure) play a minor role during the biofilm formation. This is related to the evolutionary adaptation of *S. mutans* to colonize the surface of teeth, which from the chemical point of view are formed by fluorine rich, carbonated calcium-deficient hydroxyapatite, where the hydroxyl groups of the crystalline lattice are partially substituted by fluoride ions [41]. The higher electronegativity of fluorine makes fluoroapatite less soluble, and mechanically and chemically more resistant than hydroxyapatite, thus driving it to be the main component in the surface of enamel [41,42]. The reproducible *S. mutans* biofilm with its high numbers of bacteria which was formed on both SHA and CDHA, promotes these materials for use as dental biofilm models. They can be used in susceptibility testing with the potential to mimic even more the composition and structure of enamel by substituting hydroxyls with fluorides during synthesis, and controlling

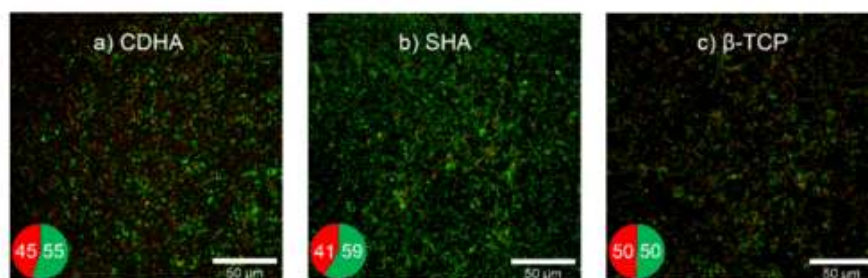


Fig. 4. Live/dead staining after 72 h at 37 °C. Living bacteria are green, dead are red. The scale bar on the micrographs represents 50 µm. The pie chart in the bottom left corner of micrographs represents average ratio of live/dead bacteria in the corresponding biofilm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

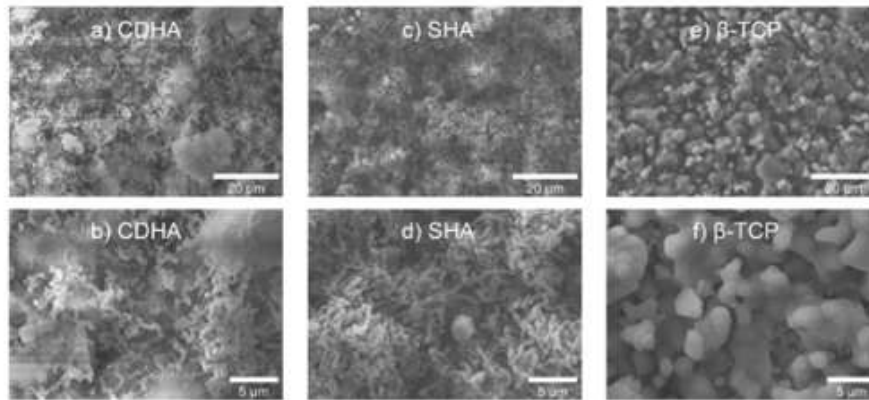


Fig. 5. Secondary electron SEM images of *S. mutans* growing on the materials after 72 h at 37 °C, a and b) CDHA, c and d) SHA, and e and f) β -TCP.

Table 1
Alamar blue reduction during the susceptibility test. Biofilm growth on SHA.

Treatment/incubation time	3 h	5 h	24 h
Untreated biofilm	59.5 ± 20.1	70.6 ± 12.1	86.3 ± 11.2
Chlorhexidine 0.2%	1.7 ± 1.1	3.0 ± 1.3	6.6 ± 4.3
Chlorhexidine 0.1%	2.9 ± 0.9	4.5 ± 1.0	7.6 ± 2.0
Chlorhexidine 0.01%	35.4 ± 11.4	46.4 ± 14.8	73.3 ± 23.0
EthOH 70%	3.1 ± 2.8	5.1 ± 3.8	46.8 ± 12.2

Reduction in percentage.

the porosity and grain size during sintering, variables which influence teeth demineralization.

In the past, various hydroxyapatites have been used for studies associated with *S. mutans* [23–27]. However, it is not straightforward to perform a comparison of those materials concerning the apatites used in this study due to the many possible variables. As a general guideline, the herein studied SHA may be comparable to the hydroxyapatites used by Smith and Bowen and Schilling and Bowen [27,28]. Besides, none of these calcium phosphate materials completely mimic the structure of the surface of the teeth, as the enamel of the tooth has a hierarchical structure of rods with irregular cross-section made of closely packed nanometric size hydroxyapatite crystals. The rods are generally aligned perpendicular to the surface of the dentin and the space between rods is also made of compacted hydroxyapatite crystals, but diverge in orientation [43]. In contrast, both β -TCP and SHA are porous and have polyhedral grains of micrometric size rather than aligned polycrystalline rods. CDHA mimics the nanometric size of hydroxyapatite crystals in the rods of enamel, but still differs in orientation and porosity.

The biofilm growth on SHA was selected to test the efficacy of clinically commonly-used disinfectants. The rationale behind the selection of SHA over CDHA was that despite both being comparable in biofilm formation, SHA is more similar to the surface of tooth in terms of roughness and low SSA [44]. Chlorhexidine at concentrations 0.01–0.2% was selected as it is a frequent component of mouthwash, toothpaste, disinfectant gels and sprays. Ethanol at a concentration of 70% was chosen as it is a well-known and often used disinfectant in several commercial products. Susceptibility testing revealed the inadequate activity of 70% ethanol and of chlorhexidine at concentration of 0.01%. Although the metabolic activity of the bacteria was suppressed by such treatments, a significant number of cells survived. Only chlorhexidine at concentrations higher than or equal to 0.1% was able to kill all the detectable bacteria of the biofilm. The inadequacy of the

antibacterial activity was attributed to the stability of the biofilm, and to its capacity to be protected inside the pores of the SHA, emphasizing the importance of selecting the appropriate material for development of a proper dental biofilm model.

The calcium phosphate material tested with the lowest growth of *S. mutans* biofilm was β -TCP, showing ten times fewer bacteria in comparison with SHA and CDHA. This result is in accordance with a study by Tafin et al., in which lesser biofilm formations of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and of *Staphylococcus epidermidis* RP62A were observed on β -TCP compared to CDHA [16]. Furthermore, differences were also observed in the osteogenic capacity, CDHA being more bioactive and osteoinductive than β -TCP [33,45]. In terms of composition, β -TCP and hydroxyapatite have different chemical formulae and crystalline structures, but the β -TCP and SHA studied in this work were similar in terms of grain morphology, grain size, porosity, SSA and roughness (observed in Fig. 1). Thus, the lower susceptibility of β -TCP to biofilm formation also points to the preferential growth of *S. mutans* on the apatitic crystalline structure (β -TCP belongs to the rhombohedral lattice system and does not contain hydroxyl groups). It is hard to offer an explanation for this, but the minor differences in biofilm between SHA and CDHA suggest that the reason does not lie in the microstructural features. Besides, the fact that β -TCP reduced biofilm formation is not related to ion release or changes in osmolarity and pH, because SHA and CDHA originated equivalent modifications, and all must have the same trace elements since were prepared with a common starting material. An alternative explanation may involve electrostatic interactions, since the *in vitro* adhesion of bacteria is dependent on the surface charge of the material [46] and hydroxyapatite usually shows a higher surface charge than β -TCP due to the presence of hydroxyl groups [47]. Nonetheless, the effect of surface charge on *S. mutans* adhesion and its relevance *in vivo*, where specific adhesion molecules are involved [26], require to be elucidated in future.

Notwithstanding its lower susceptibility, a biofilm does grow on β -TCP. Subsequent reduction of biofilm could be achieved by incorporation of an antimicrobial agent into β -TCP. This approach has already been investigated by other research groups, where different bioceramics were used with diverse chemicals, such as silver-containing β -TCP [48] or ornidazole-containing calcium phosphate cement [49].

The ability of *S. mutans* to acidify the environment is known part of cariogenic process [26]. Accordingly, the acidification of the medium promoted the decay of the materials as it happens with the teeth in the mouth. However, the relative short term of the experiment did not allow to observe visible disintegration of the materials and differences

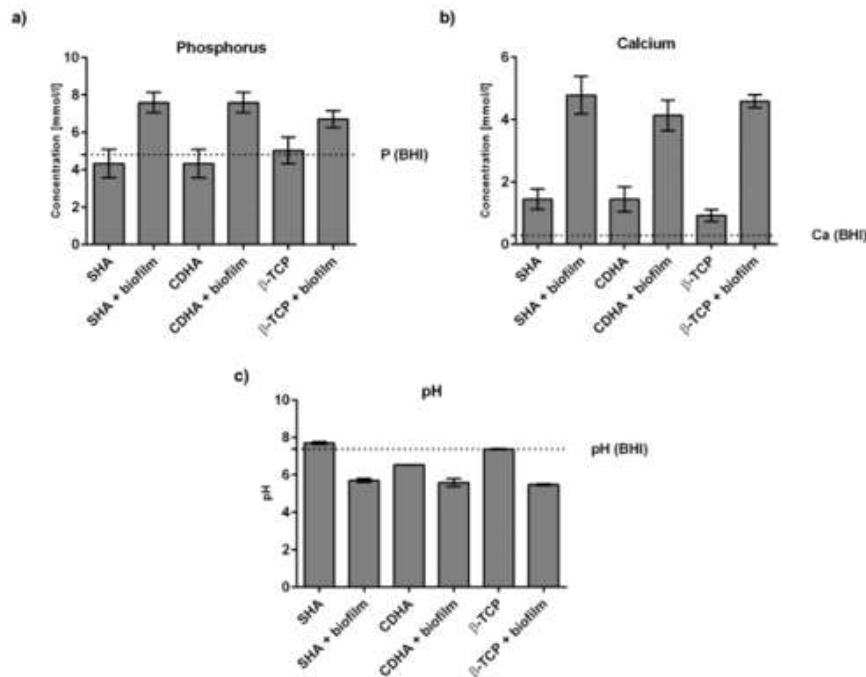


Fig. 6. Changes of P and Ca concentration and pH in BHI broth after 72 h of materials incubation at 37 °C with and without *S. mutans* biofilm. a) P concentration, b) Ca concentration, and c) pH. The horizontal dash-line indicates the initial values in the BHI broth.

between them. Moreover, despite that β -TCP is more soluble than hydroxyapatite in water, it did not increase the content of P and Ca beyond than the changes produced by SHA and CDHA, confirming that the water solubility of calcium phosphates does not mirror the behavior in the physiological environment.

This study has specific strengths. Focusing on oral location, this study is investigating *S. mutans* colonization of calcium phosphates, in contrast to other published studies in which it is acknowledged that bacterial colonization was by non-oral bacterial strains (*S. aureus* [16,48,50,51], *S. epidermidis* [16], *Escherichia coli* [15], *Pseudomonas aeruginosa* [50], etc.). Despite streptococcal infections being a significant complication for endodontic intervention, *S. mutans* is certainly associated with the initiation of dental caries [52–54], and consequently deserving of research. On the other hand, the limitations of the study are represented by the omission of other components of the oral environment, such as saliva, elevated sugar income or additional bacterial strains commonly involved in dental biofilm development. The incorporation of saliva and nutrients convenient for biofilm formation is in fact the topic for future research, together with exploration of the mechanical disruption of biofilm (tooth brushing).

5. Conclusion

In this study, three calcium phosphates were prepared and analysed as suitable teeth-mimicking materials for a dental biofilm model. SHA and CDHA were recognized as more suitable for a dental-like biofilm model, since a denser *S. mutans* biofilm was formed on these surfaces

than on β -TCP. Interestingly, significant differences in stoichiometry (Ca/P ratio) and microstructure (smooth equiaxial grains vs. rough plate-like entangled crystals) between SHA and CDHA did not result in significant differences in *S. mutans* biofilm formation, suggesting that the crystalline structure is the most important factor. The developed biofilm model is a simple, suitable and effective approach for susceptibility testing of commonly used antimicrobial agents. In agreement with previous reports, β -TCP was significantly less susceptible to biofilm formation. A better understanding of the factors involved is necessary to develop restorative materials and implants that prevent infections.

Funding

This work was supported by Ministry of Health of the Czech Republic (project NV 19-09-00198 and UHHK, 00179906), the Czech Science Foundation (grant 19-22662S), and the Faculty of Military Health Sciences (Long-term development plan). COU acknowledges the CONACYT grants 2020-000021-01EXTV-00235 and 2021-000012-01EXTV-00057.

CRedit authorship contribution statement

MH performed biological experiments, result analysis, conducted the work and was involved in the designing of the work, writing and interpretation of the data. COU performed calcium phosphate synthesis and characterization, was involved in result analysis, writing and interpretation of the data. MV was involved in SEM imagining, data analysis and writing. MM was involved in CLSM imagining, data analysis

and writing. PK and RK were involved in writing and isolation and cultivation of *S. mutans*. LC and EBM were involved in designing the work, result analysis, writing and interpretation of the data. JM was involved in designing the work, writing, interpretation of the data and submission of the manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

The authors are grateful to Ian McColl MD, PhD for assistance with the manuscript.

References

- [1] M.A. Pees, et al., Oral diseases: a global public health challenge, *Lancet* 394 (2019) 249–260.
- [2] J. Kilian, *Prevenec v stomatologii, 2. vyd.*, in: Gašín, Praha, 1999, ISBN 8072820223, pp. 1–239.
- [3] S.D. Fornem, M. Björkstrand, A.C. Östehand, *Streptococcus mutans, caries and simulation models*, *Nutrients* 2 (2010) 290–298.
- [4] W. Krzyżniak, A. Jurczak, D. Kościelniak, B. Bystrowska, A. Skabniak, The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 33 (2014) 499–515.
- [5] U. Berger, A. Rakhmanova, A. Poljak, Y. Loefer, *Oral biofilms: development, control, and analysis*, *High-Throughput* 7 (2018).
- [6] A. Sudaćka, A.K. Strzyka, A. Rydzewska, Changeability of oral cavity environment, *Eur. J. Dent.* 1 (2007) 14–17.
- [7] W.H. Bowen, R.A. Burne, H. Wu, H. Koo, *Oral biofilms: pathogens, matrix, and polysaccharide interactions in microenvironments*, *Trends Microbiol.* 26 (2018) 229–242.
- [8] J.L. Brown, et al., Polymicrobial oral biofilm models: simplifying the complex, *J. Med. Microbiol.* 66 (2019) 1573–1584.
- [9] M. Bolner, Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery, *Eur. Spine J.* 10 (2001) 5114–5121.
- [10] F. Schwarz, R. Birling, T. Lutz, E. Nuery, J. Becker, Healing of intrabony peri-implantitis defects following application of a nanocrystalline hydroxyapatite (Oxintact) or a bovine-derived keragraft (Bio-Oxone) in combination with a collagen membrane (Bio-Gidern), *A case series*, *J. Clin. Periodontol.* 33 (2006) 491–499.
- [11] F. Burne, et al., Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants: osteogenicity of OCP coatings, *J. Biomed. Mater. Res. A* 66A (2003) 779–788.
- [12] R.Z. Legros, Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review, *Adv. Dent. Res.* 2 (1988) 164–180.
- [13] M. Epple, et al., Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 18–23.
- [14] S. Kilgus, et al., The impact of dental implant surface modifications on macrointegration and biofilm formation, *J. Clin. Med.* 10 (2021) 1641.
- [15] W. Jakubowicz, A. Śliozarczyk, Z. Paszkiewicz, W. Szymanski, B. Walkowiak, Bacterial colonisation of bioceramic surfaces, *Adv. Appl. Ceram.* 107 (2008) 217–221.
- [16] U. Fornstrand Tafin, et al., Staphylococcal biofilm formation on the surface of three different calcium phosphate bone grafts: a qualitative and quantitative in vivo analysis, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2015) 130.
- [17] E. Westat, M. Giffels, J. Lima-Siemrad, E. Bruzell, M. Andersson, Biofilm formation on nanostructured hydroxyapatite-coated titanium, *J. Biomed. Mater. Res. A* 102 (2013) 1063–1070.
- [18] M. Claus, A. Thampuzi, O. Borens, M. Bohner, T. Fichtmann, Biofilm formation on bone grafts and bone graft substitutes: comparison of different materials by a standard in vitro test and microcalorimetry, *Acta Biomater.* 6 (2010) 3791–3797.
- [19] M. Claus, et al., Influence of physico-chemical material characteristics on staphylococcal biofilm formation - a qualitative and quantitative in vitro analysis of five different calcium phosphate bone grafts, *Eur. Cell. Mater.* 28 (2014) 39–50.
- [20] C.A. van Hiltzenrwijk, J.J. Geze, H.E. Koerten, W. Knijpers, The biological performance of calcium phosphate cements in an infected implantation site. III: biological performance of beta-whitlockite in the noninfected and infected rat middle ear, *J. Biomed. Mater. Res.* 20 (1986) 1197–1217.
- [21] V. Samard, et al., Comparative evaluation of the efficacy of tricalcium phosphate, calcium sodium phosphosilicate, and casein phosphopeptide - amorphous calcium phosphate in reducing streptococcal mutans levels in saliva, *Niger. J. Clin. Pract.* 20 (2017) 1404.
- [22] M. Park, J.B. Sutherland, F. Rafii, Effects of nano-hydroxyapatite on the formation of biofilms by *Streptococcus mutans* in two different media, *Arch. Oral Biol.* 107 (2019) 104484.
- [23] J. Olsson, A. Carlén, K. Holmberg, Inhibition of streptococcal mutans adherence to hydroxyapatite with combinations of alkyl phosphates and nonionic surfactants, *Caries Res.* 25 (1991) 51–57.
- [24] C. Spengler, et al., Enhanced adhesion of *Streptococcus mutans* to hydroxyapatite after exposure to saliva, *J. Mol. Recognit.* 30 (2017), e2015.
- [25] T. Coriye, K. Honzari, F. Rigole, P.N. Jimenez, H.J. Nella, In vitro inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on hydroxyapatite by subinhibitory concentrations of anthraquinones, *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007) 1541–1544.
- [26] W.H. Bowen, H. Koo, Biology of streptococcal mutans derived glycosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms, *Caries Res.* 45 (2011) 69–86.
- [27] A.M. Vacca Smith, W.H. Bowen, In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs, *Arch. Oral Biol.* 45 (2000) 277–291.
- [28] K.M. Schilling, W.H. Bowen, Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*, *Infect. Immun.* 60 (1992) 284–295.
- [29] C. Rey, et al., Surface properties of biomimetic nanocrystalline apatites: applications in biomaterials, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* 60 (2014) 63–73.
- [30] S.V. Dorozhkin, M. Epple, Biological and medical significance of calcium phosphates, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 41 (2002) 3130–3146.
- [31] A. Barba, et al., Osteoinduction by foamed and 3D-printed calcium phosphate scaffolds: effect of nanostructure and pore architecture, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (2017) 41722–41736.
- [32] E.E. Mostafaei, L. Vojteva, I. Gelko, M.-P. Ginebra, Calcium phosphate foam: potential scaffolds for bone tissue modeling in three dimensions, *Methods Mol. Biol. Clin. Res.* 1612 (2017) 79–94.
- [33] M. Hympanova, et al., The antibacterial effects of new N-allylpyridinium salts on planktonic and biofilm bacteria, *Front. Microbiol.* 11 (2020), 573951.
- [34] S. Terlep, M. Hympanova, I. Dogsa, F. Pujk, D. Stopar, Photoacoustic removal of enterococcal faecal biofilms from titanium surface with an Er:YAG laser using super short pulses, *Lasers Med. Sci.* (2021), <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03265-6>.
- [35] R.K. Pettit, et al., Microplate Alamar Blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 2612–2617.
- [36] R.K. Pettit, C.A. Weber, G.H. Pettit, Application of a high throughput Alamar Blue biofilm susceptibility assay to *Staphylococcus aureus* biofilms, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 6 (2009) 28.
- [37] A.L. Ponomareva, L.S. Busuleva, E.A. Bogatyrenko, Abiotic environmental factors affecting the formation of microbial biofilms, *Biol. Bull.* 45 (2018) 490–496.
- [38] H. Cori, et al., The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms, *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999) 1771–1776.
- [39] B. Guggenheim, M. Guggenheim, R. Greni, E. Gianetti, T. Thurshner, Application of the Zürich biofilm model in problems of cariology, *Caries Res.* 38 (2004) 212–222.
- [40] J.M. Sedowska, J. Guillou-Marti, E.R. Moerslar, M. Espanol, M.-P. Ginebra, Biomimetic versus sintered calcium phosphates: the in vitro behavior of osteoblasts and mesenchymal stem cells, *Tissue Eng. Part A* 23 (2017) 1297–1309.
- [41] C. Rey, C. Combes, C. Drouot, H. Sfihi, Fluoride-based bioceramics, in: *Fluorine and Health*, Elsevier, 2008, pp. 279–331, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53006-0.00006-0>.
- [42] C. Combes, S. Casalosa, C. Rey, Apatite biomaterials, *Minerals* 6 (2016) 34.
- [43] A. Nanci, *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*, 9th edition, Elsevier, 2017.
- [44] M.F. Orrellana, et al., Surface analysis of etched molse enamel by gas adsorption, *J. Dent. Res.* 87 (2008) 532–536.
- [45] T. Kokubo, H. Takahama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27 (2006) 2907–2915.
- [46] M.C.M. van Loensrecht, W. Noorde, J. Lyklema, A.J.B. Zehnder, Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion: dedicated to Werner Stumm for his 65th birthday, *Aquat. Sci.* 52 (1990) 103–114.
- [47] I.O. Smith, M.J. Bannam, L.R. McCabe, Electrostatic interactions as a predictor for osteoblast attachment to biomaterials, *J. Biomed. Mater. Res. A* 70 (2004) 436–441.
- [48] M. Houda, et al., Bactericidal and bioresorbable calcium phosphate cements fabricated by silver-containing tricalcium phosphate microphases, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 3745.
- [49] H. Chen, et al., An antibacterial and injectable calcium phosphate scaffold delivering human periodontal ligament stem cells for bone tissue engineering, *RSC Adv.* 10 (2020) 40157–40170.
- [50] I.I. Gremyok, et al., Influence of nanoscale modified apatite type calcium phosphates on the biofilm formation by pathogenic microorganisms, *Open Chem.* 10 (2021) 39–48.
- [51] M. Houda, et al., In vitro and in vivo antimicrobial properties of silver-containing hydroxyapatite prepared via ultrasonic spray pyrolysis route, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 5008–5018.
- [52] A.B. Lima, et al., Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus mutans* strains isolated from endodontic infections, *J. Endod.* 46 (2020) 1876–1882.
- [53] T.S. Ghazal, et al., Mutant streptococci and dental caries: a new statistical modeling approach, *Caries Res.* 52 (2018) 246–252.
- [54] J.M. Tamari, J. Livingston, A.M. Thompson, The microbiology of primary dental caries in humans, *J. Dent. Educ.* 85 (2001) 1028–1037.

Příloha F – Vybraná publikace III.

Markova, A., **M. Hympanova**, M. Matula, L. Prchal, R. Sleha, M. Benkova, L. Pulkrabkova, O. Soukup, Z. Krocova, D. Jun a J. Marek. Synthesis and Decontamination Effect on Chemical and Biological Agents of Benzoxonium-Like Salts. *Toxics*. **9**, 222 (2021). doi:10.3390/toxics9090222.

IF₍₂₀₂₀₎ 4,146

Article

Synthesis and Decontamination Effect on Chemical and Biological Agents of Benzoxonium-Like Salts

Aneta Markova ^{1,2}, Michaela Hympanova ^{1,3}, Marek Matula ², Lukas Prchal ¹, Radek Sleha ³, Marketa Benkova ¹, Lenka Pulkrabkova ^{1,2}, Ondrej Soukup ^{1,2}, Zuzana Krocova ⁴, Daniel Jun ² and Jan Marek ^{1,3,*}

- ¹ Biomedical Research Centre, University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic; aneta.markova@fnhk.cz (A.M.); michaela.hympanova@fnhk.cz (M.H.); lukas.prchal@fnhk.cz (L.P.); Marketa.Benkova@fnhk.cz (M.B.); lenka.pulkrabkova@fnhk.cz (L.P.); ondrej.soukup@fnhk.cz (O.S.)
- ² Department of Toxicology and Military Pharmacy, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence in Brno, Trebesska 1575, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic; marek.matula@unob.cz (M.M.); daniel.jun@unob.cz (D.J.)
- ³ Department of Epidemiology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence in Brno, Trebesska 1575, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic; radek.sleha@unob.cz
- ⁴ Department of Molecular Pathology and Biology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence in Brno, Trebesska 1575, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic; zuzana.krocova@unob.cz
- * Correspondence: marekija@gmail.com; Tel.: +420-495-833-447



Citation: Markova, A.; Hympanova, M.; Matula, M.; Prchal, L.; Sleha, R.; Benkova, M.; Pulkrabkova, L.; Soukup, O.; Krocova, Z.; Jun, D.; et al. Synthesis and Decontamination Effect on Chemical and Biological Agents of Benzoxonium-Like Salts. *Toxics* **2021**, *9*, 222. <https://doi.org/10.3390/toxics9090222>

Academic Editor: Eduardo Rocha

Received: 28 July 2021

Accepted: 4 September 2021

Published: 15 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Benzoxonium chloride belongs to the group of quaternary ammonium salts, which have been widely used for decades as disinfectants because of their high efficacy, low toxicity, and thermal stability. In this study, we have prepared the C₁₀–C₁₈ set of benzoxonium-like salts to evaluate the effect of their chemical and biological decontamination capabilities. In particular, biocidal activity against a panel of bacterial strains including *Staphylococcus aureus* in biofilm form was screened. In addition, the most promising compounds were successfully tested against *Francisella tularensis* as a representative of potential biological warfare agents. From a point of view of chemical warfare protection, the efficiency of BOC-like compounds to degrade the organophosphate simulant fenitrothion was examined. Notwithstanding that no single compound with universal effectiveness was identified, a mixture of only two compounds from this group would be able to satisfactorily cover the proposed decontamination spectrum. In addition, the compounds were evaluated for their cytotoxicity as a basic safety parameter for potential use in practice. In summary, the dual effect on chemical and biological agents of benzoxonium-like salts offer attractive potential as active components of decontamination mixtures in the case of a terrorist threat or chemical or biological accidents.

Keywords: quaternary ammonium salts; benzoxonium; decontamination; organophosphates; disinfection; micellar catalysis

1. Introduction

Benzoxonium chloride (N-benzyl-N,N-bis(2-hydroxyethyl)dodecan-1-aminium chloride, BOC), known for over 30 years [1], manifests strong antimicrobial activity against certain bacterial strains, especially non-spore forming, yeasts and protozoa. In practice, BOC is widely used against buccopharyngeal pathogens as a mucous membrane disinfectant. It is commercially available in the form of gargle solutions, lozenges, and oral sprays, often in combination with lidocaine [2,3]. Likewise in dentistry it is used against dental plaque and dental caries [4,5]. Further applications include disinfection of medical instruments in hospitals, and of skin burns, seborrheic dermatitis, and cutaneous leishmaniasis [4,6,7], as a veterinary fungicide and bactericide in the treatment of animal skin, in the food and beverage industry, and in the textile industry as a bactericide in textile

fibers [1,8,9]. Of note, BOC is one of the few quaternary ammonium salts (together with cetrimide and benzalkonium chloride (BAC)) highly efficient in preservation of topical eye medications [10,11].

BOC belongs in the wide group of quaternary ammonium salts (QACs)—substances with surface-active properties. They are still considered an important component of hygienic and anti-epidemic measures against the spread of nosocomial diseases, due to their high efficacy, low price, and only modest toxicity to eukaryotic cells [12,13].

QACs are predominantly supposed to have relatively unspecific mechanisms of antimicrobial action. Owing to the positively charged nitrogen moiety, QACs are able to interact with the negatively charged outermost surface of cell walls and membranes and penetrate into the phospholipid bilayer with their long alkyl chain, thus causing leakages, ruptures, and disintegration of the cell [14]. QACs exhibit higher activity against Gram-positive (G+) bacteria as these possess a single phospholipid cellular membrane and a thicker cell wall composed of peptidoglycan, whereas Gram-negative (G-) bacteria are enveloped by two cellular membranes and a thinner layer of peptidoglycan. The outer membrane causes decreased antimicrobial activity in the case of Gram-negative bacteria [15].

However, recent studies show that some QACs can be also used as micellar catalysts because of their ability to accelerate the decomposition of neurotoxic organophosphate esters [16–20]. Such esters (e.g., fenitrothion, chlorpyrifos, paraoxon) are widely used as pesticides in agriculture. Similarly, highly toxic organophosphates, so-called nerve agents (tabun, soman and sarin and VX), have been reported to be also susceptible to decomposition of their organophosphorus ester moieties by quaternary ammonium salt-type cationic surfactants.

The above-mentioned properties of QACs render benzoxonium salts as suitable active ingredients of a decontamination mixture against chemical and biological agents. Despite the fact that BOC is a well-known compound, there is a lack of comprehensive information describing its potential decontamination properties, and the preparation and evaluation of the whole series [21].

Therefore, within this study, we have designed and synthesized a novel series of BOC-like compounds differing in the long alkyl chain (C_{10} – C_{18}) with an expected dual effect on biological and chemical agents including agents with warfare potential. The decontamination properties screening assessed the antimicrobial effect against eight floating-form strains and a representative biofilm-forming strain of *S. aureus* [22]. The cells in biofilms possess different characteristics than single cells and due to their specific structure present decreased susceptibility [23,24]. We further focused on potentially misused warfare agents. Antimicrobial activity was determined against the Gram-negative *Francisella tularensis*, with potential to be misused as a biological weapon; also determined was the efficiency of BOC-like compounds to decompose fenitrothion as an organophosphate simulant. Finally, the cytotoxicity on a mammalian cell line was evaluated as one of the key safety parameters for new substances. Despite the above-mentioned properties, the substances can have practical use in the military (the main active ingredient of a universal decontamination mixture for chemical and biological warfare agents in form of solution or foam). Further, in the civil sector use as disinfectant in healthcare (viruses, bacteria, fungi) or as active ingredients for decontamination of organophosphorus pesticides (from water, soil, etc.).

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis and Analysis

Analytical grade reagents were purchased from Sigma-Aldrich, Fluka, and Merck (Darmstadt, Germany). The solvents were purchased from Penta Chemicals (Prague, Czech Republic). Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) using pre-coated silica gel 60 F254 TLC alumina sheet. Column chromatography was performed with silica gel 0.063e0.200 mm. Melting points (m. p.) were determined on a micro heating stage PHMK 05 (VEB Kombinat Nagema, Radebeul, Germany) and are uncorrected. All com-

pounds were fully characterized by NMR spectra and HRMS. NMR spectra were recorded on a Varian VNMR S500 (operating at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C ; Varian Co., Palo Alto, CA, USA). The chemical shifts (δ) are given in ppm, relative to tetramethylsilane (TMS) as internal standard. Coupling constants (J) are reported in Hz. Splitting patterns are designated as s, singlet; d, doublet; t, triplet; and m, multiplet. Mass spectra were recorded using a combination of liquid chromatography and mass spectrometry: high-resolution mass spectra (HRMS) and sample purities were obtained by high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV and mass spectrometric (MS) detection gradient method. The system used in this study was a Dionex Ultimate 3000 UHPLC: RS Pump, RS Column Compartment, RS Autosampler, Diode Array Detector, controlled by Chromeleon (version 7.2.9 build 11323) software (Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany) with Q Exactive Plus Orbitrap mass spectrometer with Thermo Xcalibur (version 3.1.66.10.) software (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Detection was performed by mass spectrometer in positive mode. Settings of the heated electrospray source were: Spray voltage 3.5 kV, Capillary temperature: 262 °C, Sheath gas: 55 arbitrary units, Auxiliary gas: 15 arbitrary units, Spare gas: 3 arbitrary units, Probe heater temperature: 250 °C, Max spray current: 100 mA, S-lens RF Level: 50. C18 column (Kinetex EVO C18, 3 × 150 mm, 2.6 μm , Phenomenex, Torrance, CA, USA) was used in this study. Mobile phase A was ultrapure water of ASTM I type (resistivity 18.2 M $\Omega\cdot\text{cm}$ at 25 °C) prepared by Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF apparatus (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) with 0.1% (*v/v*) formic acid (HPLC-MS grade, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany); mobile phase B was acetonitrile (MS grade, Honeywell-Sigma Aldrich) with 0.1% (*v/v*) of formic acid. The flow was constant at 0.4 mL/min. The method started with 1 min of isocratic flow of 5% B, and then the gradient of B rose to 100% B in 3 min and remained constant at 100% B for 1 min. The composition then went back to 5% B and equilibrated for 5 min. Total runtime of the method was 10 min. The column was heated to 27 °C. Samples were dissolved in methanol (LC-MS grade, Fluka-Sigma Aldrich) at a concentration 1 mg/mL and sample injection was 1 μL . Purity was determined from UV spectra measured at wavelength 254 nm. HRMS was determined by total ion current spectra from the mass spectrometer collected at resolution of 140,000 in a range 105–1000 *m/z*. Clog *P* was calculated with the MarvinSketch (version 14.9.8.0) software.

2.1.1. General Procedure for Synthesis of *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)-*N*-alkylamines (**3a-e**)

Diethanolamine (**1**) (22.5 mmol), anhydrous potassium carbonate (30 mmol), and potassium iodide (3 mmol) were dispersed in 40 mL of acetonitrile. Subsequently, the appropriate 1-bromoalkane **2a-e** (15 mmol) was added. The reaction mixture was refluxed under nitrogen atmosphere for 12 h. After filtration the acetonitrile was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in water (30 mL) and extracted twice with dichloromethane. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and evaporated to obtain a yellow oily product in 65–96% yields. The intermediates **3a-e** were of satisfactory purity for the next reaction step (>95%).

2.1.2. General Procedures for Synthesis of *N*-benzyl-*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)alkane-1-aminium Chloride (**5a-e**)

A mixture of the appropriate intermediate *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)-*N*-alkylamine **3a-e** (14 mmol) and benzyl chloride (**4**, 28 mmol) was heated in a 100 mL flask at 100 °C for 2 h as a solvent-free reaction. Subsequently, the reaction was allowed to stand for 5 days at room temperature. Crude products were purified by crystallization in a medley of 1:10 methanol/ethyl acetate and subsequently in 1:10 methanol/diethyl ether to obtain white solid in 42–79% yields.

2.1.3. NMR and HRMS Analysis

N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-*N*-decylamine (**3a**). Yellow oil, (2.40 g, 65%); $^1\text{H-NMR}$ (chloroform-*d*) δ 3.63 (t, J = 5.4 Hz, 4H), 2.68 (t, J = 5.4 Hz, 4H), 2.57–2.50 (m, 2H), 1.51–1.44 (m, 2H), 1.35–1.21 (m, 14H), 0.89 (t, J = 6.8 Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (chloroform-*d*) δ 59.67, 56.05, 54.79,

31.88, 29.61, 29.55, 29.30, 27.36, 27.17, 22.67, 14.10; HRMS: m/z 246.2424 [M + H]⁺ (calculated m/z 246.2428 for [C₁₄H₃₂NO₂]).

N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-*N*-dodecylamine (3b). Yellow oil, (3.75 g, 91%); ¹H-NMR (chloroform-*d*) δ 3.63 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H), 2.68 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H), 2.58–2.51 (m, 2H), 1.52–1.44 (m, 2H), 1.32–1.22 (m, 18H), 0.89 (t, *J* = 7.1, 1.7 Hz, 3H); ¹³C-NMR (chloroform-*d*) δ 59.46, 56.08, 54.80, 31.87, 29.62, 29.59, 29.52, 29.30, 27.33, 26.80, 22.64, 14.07; HRMS: m/z 274.2736 [M + H]⁺ (calculated m/z 274.2741 for [C₁₆H₃₆NO₂]).

N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-*N*-tetradecylamine (3c). Yellow oil, (3.07 g, 67%); ¹H-NMR (chloroform-*d*) δ 3.62 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H), 2.66 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H), 2.55–2.49 (m, 2H), 1.49–1.43 (m, 2H), 1.32–1.22 (m, 22H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C-NMR (chloroform-*d*) δ 59.65, 56.05, 54.79, 31.90, 29.67, 29.65, 29.63, 29.62, 29.57, 29.56, 29.34, 27.37, 27.08, 22.67, 14.09; HRMS: m/z 302.3054 [M + H]⁺ (calculated m/z 302.3054 for [C₁₈H₄₀NO₂]).

N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-*N*-hexadecylamine (3d). Yellow oil, (3.82 g, 77%); ¹H-NMR (chloroform-*d*) δ 3.62 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H), 2.66 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H), 2.56–2.49 (m, 2H), 1.51–1.43 (m, 2H), 1.29–1.25 (m, 26H), 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C-NMR (chloroform-*d*) δ 59.65, 56.05, 54.79, 31.91, 29.68, 29.66, 29.64, 29.62, 29.56, 29.34, 27.37, 27.09, 22.67, 14.09; HRMS: m/z 330.3361 [M + H]⁺ (calculated m/z 330.3367 for [C₂₀H₄₄NO₂]).

N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-*N*-octadecylamine (3e). Yellow solid, m. p. 48.1–49.7 °C (5.17 g, 96%); ¹H-NMR (chloroform-*d*) δ 3.62 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H), 2.66 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H), 2.55–2.49 (m, 2H), 1.49–1.43 (m, 2H), 1.29–1.24 (m, 30H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C-NMR (chloroform-*d*) δ 61.10, 59.62, 56.04, 54.78, 50.94, 31.90, 29.67, 29.64, 29.61, 29.56, 29.33, 27.37, 27.00, 22.66, 14.09; HRMS: m/z 358.3675 [M + H]⁺ (calculated m/z 358.3680 for [C₂₂H₄₈NO₂]).

N-benzyl-*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)decan-1-aminium chloride (5a). White solid, m. p. 114.0–114.6 °C (4.09 g, 78%); ¹H-NMR (chloroform-*d*) δ 7.63–7.57 (m, 2H), 7.47–7.39 (m, 3H), 5.73 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.86 (s, 2H), 4.29–4.10 (m, 4H), 3.71–3.52 (m, 4H), 3.39–3.32 (m, 2H), 1.89–1.80 (m, 2H), 1.38–1.14 (m, 14H), 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C-NMR (chloroform-*d*) δ 133.18, 130.61, 129.25, 127.27, 64.39, 60.20, 59.60, 55.83, 31.78, 29.37, 29.36, 29.18, 29.13, 26.22, 22.69, 22.59, 14.05; HRMS: m/z 336.2888 [M]⁺ (calculated m/z 336.2897 for [C₂₁H₃₈NO₂]⁺).

N-benzyl-*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)dodecan-1-aminium chloride (5b). White solid, m. p. 118.7–119.0 °C (4.68 g, 41%); ¹H-NMR (chloroform-*d*) δ 7.62–7.57 (m, 2H), 7.47–7.39 (m, 3H), 5.30 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.86 (s, 2H), 4.27–4.14 (m, 4H), 3.71–3.53 (m, 4H), 3.38–3.31 (m, 2H), 1.89–1.80 (m, 2H), 1.36–1.19 (m, 18H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C-NMR (chloroform-*d*) δ 133.17, 130.61, 129.26, 127.27, 64.39, 60.21, 59.61, 55.83, 31.84, 29.55, 29.42, 29.39, 29.27, 29.15, 26.23, 22.69, 22.62, 14.06; HRMS: m/z 364.3207 [M]⁺ (calculated m/z 364.3210 for [C₂₃H₄₂NO₂]⁺).

N-benzyl-*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)tetradecan-1-aminium chloride (5c). White solid, m. p. 120.6–120.9 °C (3.92 g, 65%); ¹H-NMR (methanol-*d*₄) δ 7.68–7.62 (m, 2H), 7.60–7.49 (m, 3H), 4.79 (s, 2H), 4.09 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H), 3.51 (t, *J* = 7.4, 5.0 Hz, 4H), 3.38–3.31 (m, 2H), 1.98–1.88 (m, 2H), 1.45–1.28 (m, 22H), 0.90 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C-NMR (methanol-*d*₄) δ 134.34, 131.79, 130.36, 129.11, 65.40, 61.34, 61.08, 56.71, 33.06, 30.79, 30.77, 30.75, 30.71, 30.61, 30.53, 30.46, 30.18, 27.34, 23.72, 23.49, 14.44; HRMS: m/z 392.3515 [M]⁺ (calculated m/z 392.3523 for [C₂₅H₄₆NO₂]⁺).

N-benzyl-*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)hexadecan-1-aminium chloride (5d). White solid, m. p. 121.6–121.9 °C (4.39 g, 68%); ¹H-NMR (chloroform-*d*) δ 7.63–7.57 (m, 2H), 7.48–7.40 (m, 3H), 5.73 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.86 (s, 2H), 4.28–4.14 (m, 4H), 3.69–3.55 (m, 4H), 3.39–3.32 (m, 2H), 1.90–1.80 (m, 2H), 1.32–1.23 (m, 26H), 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C-NMR (chloroform-*d*) δ 133.22, 130.67, 129.31, 127.31, 64.43, 60.25, 59.65, 55.89, 31.92, 29.70, 29.66, 29.61, 29.48, 29.45, 29.36, 29.21, 26.28, 22.75, 22.68, 14.11; HRMS: m/z 420.3828 [M]⁺ (calculated m/z 420.3836 for [C₂₇H₅₀NO₂]⁺).

N-benzyl-*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)octadecan-1-aminium chloride (5e). White solid, m. p. 124.2–124.7 °C (3.59 g, 52%); ¹H-NMR (chloroform-*d*) δ 7.62–7.57 (m, 2H), 7.49–7.39 (m, 3H), 5.72 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.87 (s, 2H), 4.22 (t, *J* = 10.8, 6.3, 5.6 Hz, 4H), 3.62 (t, *J* = 39.6, 14.4, 6.5, 3.3 Hz, 4H), 3.38–3.31 (m, 2H), 1.90–1.81 (m, 2H), 1.38–1.15 (m, 30H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C-NMR (chloroform-*d*) δ 133.19, 130.63, 129.28, 127.28, 64.40, 60.22, 59.61, 55.87, 31.88,

29.68, 29.64, 29.62, 29.59, 29.46, 29.42, 29.32, 29.18, 26.24, 22.71, 22.65, 14.08; HRMS: m/z 448.4153 [M]⁺ (calculated m/z 448.4149 for [C₂₉H₅₄NO₂]⁺).

All spectra are available in the Supplementary Materials (Figures S1–S15).

2.2. Conductivity

The conductivity of surfactant solutions was measured in triplicate on a Tristar Orion conductivity meter in a conductivity cell 013005MD (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The apparatus was controlled with the software Navigator 21 (Thermo Scientific) using continuous data collection. The solutions were temperature-controlled to 49 ± 0.1 °C. The surfactant stock solutions had a range of concentrations of 15–200 mM and these stock solutions were diluted further to determine the CMC. A linear pump Lineomat (VEB MLW Labortechnik Ilmenau, Germany) was used with a flow rate of 0.43 mL/min. An ARES stirrer (VELP Scientifica Srl, Usmate, Italy) was used for continuous agitation, and the conductivity was recorded every 3 s. The resulting data were captured into an MS Excel datasheet for subsequent analysis. The transformation of the time axis to a concentration axis was performed according to the parameters defining the measurements (starting volume of a liquid in the titration vessel, the concentration of the surfactant solution in the syringe, and the solution feed rate):

$$C_t = \frac{C_0}{1 + \frac{V_{start}}{v_{inj}t}}$$

where C_t = concentration at time t , C_0 = starting concentration of the surfactant, V_{start} = volume of distilled water at start, v_{inj} = surfactant solution dosing rate and t = time recorded by Navigator21

2.3. Micellar Catalysis

A solution of fenitrothion (O,O-dimethyl O-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate) was diluted with methanol to obtain a concentration of 10^{-2} M (10 mM). The surfactant stock solutions were diluted in distilled water with a concentration of 500 mM, 100 mM, or 10 mM (pursuant to the value of their CMC). Furthermore, these solutions were diluted in the range of concentrations of 10^{-1} – 10^{-5} M. Carbonate buffer 0.1 M was adjusted to pH 10 or 11. Carbonate buffer 250 μ L, surfactant stock solution 250 μ L, and the solution of fenitrothion 10 μ L were homogenized in a 1 cm thick cuvette. The absorption changes were measured by Helios α spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) with a set wavelength of 394 nm. The measurement was temperature-controlled to 37 ± 0.1 °C and stopped at the time when the difference between adjacent absorptions was minimal. The resulting data were processed in Thermo Scientific Vision software (Thermo Fisher Scientific) and then converted into MS Excel. The rate constant was calculated by the procedure described by Guggenheim [25], with modification introduced by Zajicek and Radl [26]. The procedure used is based on the acceptance of the following equation:

$$A_{t+\Delta t} = A_t \times \exp(k_{obs} \times \Delta t) + A_n \times (1 - \exp(-k_{obs} \times \Delta t)),$$

where $A_{t+\Delta t}$ = absorption at time $t+\Delta t$, A_t = absorption at time t , \exp = base of natural logarithm, k_{obs} = observed rate constant, Δt = time between two successive measurements and A_n = absorption at infinite time

This relationship is a linear equation with slope $\exp(k_{obs} \times \Delta t)$ and intersection $A_n \times (1 - \exp(-k_{obs} \times \Delta t))$. Data from ten minutes' measurement were put in two columns of MS Excel so that the second column was shifted one row up. This shift presents one value Δt . Data prepared in such a way were displayed in an XY scatter chart. A trends line with a print-out of the coefficient regression equation was interlaid through the displayed points. The slope thus obtained was used for the calculation of the rate constant k_{obs} from the term $\exp(k_{obs} \times \Delta t)$. Rate constants were recalculated to the reaction half-times [27].

2.4. Bacterial Strains

In vitro antibacterial activity of the prepared compounds was tested on a panel of four Gram-positive and four Gram-negative bacterial strains: *Staphylococcus aureus* (C1947), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (C1926), *Staphylococcus epidermidis* (C1936), vancomycin-resistant *Enterococcus* (S2484), *Escherichia coli* (A1235), extended-spectrum β -lactamase (ESBL) non-producing *Klebsiella pneumoniae* (C1950), ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* (C1934), and multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (A1245). All named bacteria used in the study were obtained as clinical isolates from patients (University Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic) and stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the cryobank according to the manufacturer's instructions. When needed, each bacterial strain was inoculated and cultivated on Mueller-Hinton agar (HiMedia, Cadarsky-Envitek, Prague, Czech Republic). *Francisella tularensis* LVS, live vaccine strain, was obtained from the collection of Faculty of Military Health Sciences, University of Defense (Hradec Kralove, Czech Republic) and cultured on McLeod plates.

2.5. Biofilm Cultivation

The second-subculture colonies of *S. aureus* were suspended in Mueller-Hinton broth (MHB) to reach 1.0 McFarland Standard. This suspension was diluted with MHB medium 1:30 and subsequently used as the inoculum. The initial bacterial number of the inoculum was verified by viable cell counting and equaled approximately 10^7 CFU/mL. Each well from the MBEC microtiter plate (Innovotech, Edmonton, AB, Canada) was inoculated with 150 μL of inoculum. The inoculated device was incubated for 24 h at $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ while being shaken at 110 rpm. For every MBEC assay, the formed biofilm was verified by viable cell counting of disrupted biofilms after removing four pegs from the lid, rinsing and sonication (Bandelin Sonorex, Bandeline Electronics, Berlin, Germany) in MHB for 15 min. The established bacterial number in formed biofilms equals approximately 10^7 CFU/mL.

2.6. Antimicrobial Activity Evaluation

2.6.1. Broth Microdilution Method

The antibacterial susceptibility against bacteria was determined by the broth microdilution method according to standard M07-A10 [28]; the optimized protocol has been published previously [29,30]. Mueller-Hinton broth (Merck, Prague, Czech Republic) adjusted to pH 7.4 (± 0.2) was used as the test medium. Dimethyl sulfoxide (DMSO) served as a diluent for all compounds and its final concentration did not exceed 1% in the test medium. The wells of the microdilution tray contained 200 μL of the MH broth with two-fold serial dilutions of the compounds (500–0.49 $\mu\text{mol/L}$) and were inoculated with 10 μL of the bacterial suspension. The bacterial suspensions were controlled densitometrically to reach 1.5×10^8 viable colony forming units (CFU) per 1 mL. The MIC values, defined as 95% inhibition of bacterial growth, were determined after 24 h and 48 h incubation at $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. The MBC values were determined as the concentration of compound causing a decrease in the number of bacterial colonies by $\geq 99.9\%$, after subculturing of a 10 μL aliquot of each well without visible growth.

2.6.2. Flow Cytometry Assay

F. tularensis LVS bacterial suspension in PBS was prepared from fresh overnight subculture to reach O.D. 1.0 (optical density at 600 nm) which in the case of *F. tularensis* means 4×10^9 CFU (colony forming units)/mL. 1 mL aliquots were centrifuged for 7 min, $7000 \times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the supernatant was replaced by 500 μL of the tested compound. After 5 min exposure the treated bacterial suspension was again centrifuged for 7 min, $7000 \times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the solution of the tested compound was removed. Cells were re-suspended in 1 mL PBS and stored on ice until flow cytometry measurement. A negative control was prepared from dead bacterial suspension resuspended in PBS (OD 1), where the bacteria had been exposed overnight to 36% formaldehyde. Fresh bacteria cultured overnight on McLeod agar plates were resuspended in PBS (OD 1) and used as a positive control. All

samples were diluted 100× in 1 mL of PBS, stained with 1 µL of propidium iodide and 1.5 µL of Syto 9, and incubated in the dark for 15 min. 10 µL of vortexed microspheres were added and samples were properly mixed before measurement. All samples were analyzed with a CyAn ADP Flow Cytometer (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA). Listmode data were analyzed by Summit v4.3 software (Beckman Coulter). At least three independent experiments were performed.

2.6.3. MBEC Assay

The determination of minimal biofilm eradication concentration (MBEC) against *S. aureus* was determined using MBEC assay plates (Innovotech) according to the manufacturer's instructions using a modified Calgary method [22]. The biofilm formed on the lid of the MBEC assay microtiter plate was rinsed with saline and inserted on the challenge plate. Each microtiter challenge plate contained tested compounds serially diluted two-fold in MHB, with sterility and growth controls. After incubation for 24 h at 35 °C ± 1 °C, the lid with treated biofilm was removed, rinsed with saline, and the biofilm was disrupted by sonication. Disrupted biofilm was released into a new microtiter plate with MHB supplemented by 0.5% Tween 80 as an antimicrobial neutralizer. The MBEC was determined after 24 h of incubation at 35 °C ± 1 ° by reading OD₆₀₀. The challenge plate was covered with a new, sterile lid and after 24 h of incubation at 35 °C ± 1 °C was used for MIC determination by reading OD₆₀₀.

2.7. Antiviral Activity Evaluation

2.7.1. Viruses and Cell Cultures

Murine cytomegalovirus (MCMV) and SARS-CoV-2 virus were used in the experiments. The viral stocks were prepared by infecting susceptible cells. For MCMV, NIH 3T3 cells (murine embryonic fibroblasts) were used, and for SARS-CoV-2 (clinical isolate kindly provided by Assoc. prof. Daniel Ruzek, University of South Bohemia, Ceske Budejovice, Czech Republic), Vero cells CCL81 (African green monkey kidney) were used.

The viral stocks were prepared after virus inoculation of the appropriate cells in a suitable cell culture medium (DMEM with high glucose, containing 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin). The cells were incubated at 37 °C under 5% CO₂ until 80–90% of cells exhibited cytopathic effect (5–7 days). Following 5 min of centrifugation at 500× g the supernatant was collected and frozen in aliquots at –80 °C.

2.7.2. Virucidal Activity Testing

The virucidal activity of the synthesized agents was evaluated by a quantitative suspension test. Briefly, one part of the virus suspension was mixed with one part of bovine serum albumin (final concentration 0.03%; 'clean conditions' as specified in EN 14476) and eight parts of the novel tested compounds. The mixtures were kept at room temperature for 5 min (exposure time). After the exposure period, the mixtures were serially diluted tenfold with ice-cold DMEM and 100 µL of each dilution were seeded into a 96-well microtiter plate with the appropriate cell and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere until a cytopathic effect was detected, approximately 5–7 days. Six wells per sample dilution were inoculated. Virus-untreated controls with identical protein concentrations were also tested.

Virus titer was determined using the method of Spearman and Karber and expressed as log₁₀ TCID₅₀/mL [31,32]. According to the European Standard EN 14476 for the virucidal activity of disinfection, a product should demonstrate at least a log₁₀ reduction of 4 in virus titer, corresponding to 99.99% inactivation [33]. To differentiate between virus-induced cytopathogenic changes and the toxic effect caused by the tested compounds, the cell monolayer was monitored until the end of the virucidal activity testing period for morphological changes after exposure to the disinfectant solution.

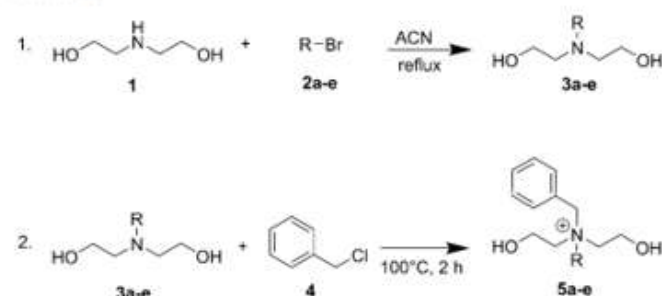
2.8. In Vitro Cytotoxicity and Selectivity Index

The standard 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Merck) cell viability assay was applied according to the manufacturer's protocol on the Chinese hamster ovary cell line CHO-K1 (ECACC, Salisbury, UK) [34]. The cells were cultured according to ECACC recommended conditions and seeded at a density of 8×10^3 per well in the 96-well plate. The tested compounds were dissolved in DMSO (Merck) and subsequently in the Nutrient Mixture F-12 Ham growth medium (Merck) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum and 1% Penicillin-Streptomycin (both Merck) so that the final concentration of DMSO did not exceed 1% (v/v) per well. Cells were exposed to the tested compounds for 24 h. The medium was replaced by a medium containing 0.5 mg/mL of MTT and the cells were allowed to produce formazan for approximately 3 h under surveillance. Thereafter, the medium with MTT was removed and the crystals of formazan were dissolved in DMSO (100 μ L/well; Ing. Petr Švec-PENTA s.r.o., Prague, Czech Republic). Cell viability was assessed spectrophotometrically by the amount of formazan produced. Absorbance was measured at 570 nm with 650 nm as a reference wavelength on Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, USA). The IC_{50} value was then calculated from the control-subtracted triplicates using non-linear regression (four parameters) by GraphPad Prism 5.03 or 7.03 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Final IC_{50} values including SEM (standard error of the mean) were obtained as the mean of three independent measurements. The selectivity indices of compounds have been calculated as the ration of the cytotoxicity (IC_{50}) and minimum inhibitory concentrations after 24 h (MIC) for all bacterial strains.

3. Results and Discussion

3.1. Synthesis

The series of alkyl-bis(2-hydroxyethyl)benzylammonium chlorides **5a-e** was prepared by the two-step reaction according to Limanov et al. [35]. The reaction process is shown in Scheme 1.



Scheme 1. Two-step preparation of benzoxonium-like salts.

Yields, melting points, purity, and Clog *P* are listed in Table 1. Compound **5b** was prepared with a superior yield compared to Chernyavskaya et al. [36], but with inferior yield according to Limanov et al. [35] prepared in the same way. Homologues **5a** and **5d** were obtained in a yield comparable to that of Stefanovic et al. [37]. The decreased yields are the result of repeated crystallizations to reach satisfactory purity of the final products. Compounds **5c** and **5e** were reported for the first time.

Table 1. Synthesis of BOC-like salts.

Compound	R	Yield (%)	m.p. (°C)	Purity (%)	Clog P
5a	C ₁₀ H ₂₁	79	114.0–114.6	97	−1.907
5b	C ₁₂ H ₂₅	42	118.7–119.0	95	−1.018
5c	C ₁₄ H ₂₉	67	120.6–120.9	95	−0.129
5d	C ₁₆ H ₃₃	69	121.6–121.9	98	0.76
5e	C ₁₈ H ₃₇	7	120.6–122.3	95	1.649

3.2. Conductometry

The critical micelle concentrations (CMC) of the new series of compounds were assessed by a conductometric study performed in aqueous solutions at 49 °C, which takes advantage of the dependency between conductivity change and rising concentration of surfactant. The dependence curve is linear until the unimers of the surfactants can balance the interactions between solution and micelle aggregation. This change is manifested as a breaking of the curve as shown in Figure 1.

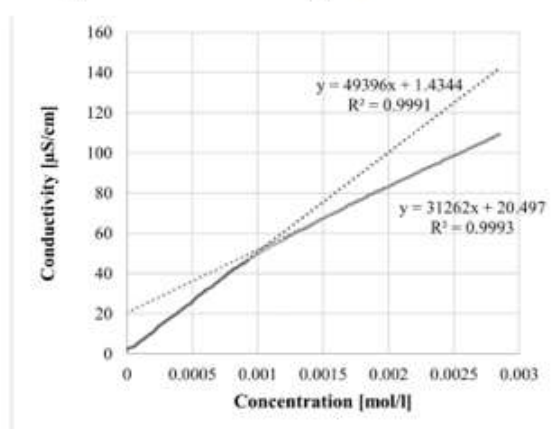


Figure 1. Dependency of conductivity on concentration. The curve was divided into three parts: lower and upper linear parts, and a transition section. The equation of the line and the coefficient of determination were calculated for both linear parts. The CMC value was determined at the intersection of both axes [38].

According to Taube's rule [39], obtained data confirm the dependency of CMC on the elongation of the alkyl chain (Figure 2). The CMC values (Table 2) are the basic characteristics of surfactants needed for further chemical decontamination measurement.

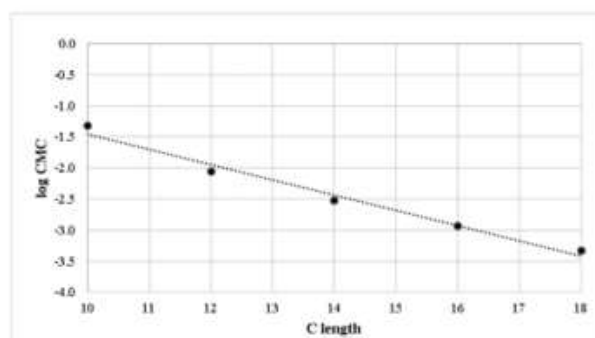


Figure 2. Dependency of log CMC on length of alkyl chain.

Table 2. CMC value of compounds 5a–5e.

C Length (Compound)	CMC [mol/L]	log CMC
10 (5a)	4.836×10^{-2}	-1.316
12 (5b)	8.710×10^{-3}	-2.060
14 (5c)	3.003×10^{-3}	-2.522
16 (5d)	1.159×10^{-3}	-2.936
18 (5e)	4.707×10^{-4}	-3.332E

3.3. Micellar Catalysis

Next, the hydrolytic activity against fenitrothion was measured. Because the pesticide fenitrothion contains a 4-nitrophenol group detectable by UV/VIS spectrophotometry, it is a suitable candidate for micellar catalysis investigation as a representative of highly toxic organophosphorus compounds with chemical warfare potential [40]. Reaction of fenitrothion with a micellar catalyst provides 3-methyl-4-nitrophenol, which in alkaline medium creates the yellow-colored nitrophenoxide anion with absorption maximum at 400 nm [27]. This decomposition reaction is monitored by the spectrophotometer. Hydrolytic activity was evaluated in this way using the Guggenheim method for the whole series of synthesized compounds 5a–e as an assessment of chemical decontamination potential (Table 3). This method is applicable in the case of first order or pseudo-first order reactions and enables processing of the data using linear regression [25]. Compound 5d is the most efficient micellar catalyst with half-life 2.3 min at 0.01M concentration, and half-life 2.4 min at 0.005M (pH 11 and 37 °C). In comparison with the spontaneous hydrolysis of fenitrothion ($k = 14.00 \times 10^{-6}$, $T_{1/2} = 808.4$ min) under the same conditions, the novel compounds were 60–160 times more effective at pH 11. It is evident that increasing the pH by one unit causes a significant acceleration of the organophosphate degradation. Spontaneous hydrolysis of fenitrothion at pH 10 was so slow that it could not be determined by the given methodology.

Table 3. Summary data of fenitrothion degradation.

Compound	c (mM)	pH 11, t 37 °C		pH 10, t 37 °C	
		10 ⁴ k (s ⁻¹)	T _{1/2} (min)	10 ⁴ k (s ⁻¹)	T _{1/2} (min)
5a	500	6.20	18.6	2.30	50.3
	100	12.82	9.0	3.97	29.2
	50	12.68	9.1	3.77	30.7
	10	0.50	230.8	0.18	606.3
	5	0.35	323.2	-	-
5b	100	8.17	14.1	1.67	69.1
	50	9.35	12.4	2.35	49.3
	10	8.23	14.0	2.65	43.5
	5	5.93	19.5	1.15	100.8
	1	1.80	64.5	-	-
5c	10	24.62	4.7	6.77	17.1
	5	23.62	4.9	5.82	19.9
	1	11.28	10.2	2.02	57.5
	0.5	3.80	30.5	1.12	103
	0.1	1.17	98.8	0.50	230.8
5d	10	50.73	2.3	11.56	10.0
	5	49.06	2.4	11.14	10.4
	1	12.32	9.4	3.97	29.2
	0.5	6.47	17.9	2.30	50.3
	0.1	1.77	65.3	1.10	105.2
5e	5	23.30	5.0	6.98	16.5
	1	13.95	8.3	4.37	26.4
	0.5	7.82	14.8	2.97	38.9
	0.1	1.87	62.0	0.82	142.5
	0.05	0.83	138.4	0.28	404.1
SH		0.14	808.4	-	-

[–] values were outside the instrumental range. Concentration (c), half-life (T_{1/2}), and rate constant (k). Left column includes measurement at pH 11 and 37 °C and right column includes measurement at pH 10 and 37 °C. The compounds are sorted in descending effect as follows 5d > 5c > 5e > 5a > 5b. Spontaneous hydrolysis (SH) of fenitrothion at pH 11–T_{1/2} = 808.4 min; at pH 10 it could not be determined by given methodology.

The rate constants determined in the concentrations below the CMC values were affected by spontaneous hydrolysis at a given temperature, by pH, and the presence of hydroxyl groups hydrolyzing the fenitrothion ester bond. Once the concentration exceeds the CMC, the rate constant noticeably rises. Hydroxyl groups and formed micelles together create a counterion cationic surfactant, and fenitrothion is attracted to the Stern layer where it adopts a favorable orientation for nucleophile access and is finally decomposed [41].

The structure-activity relationship evaluation showed a clear effect of the presence of the hydroxyethyl groups on the rate constant of OP decomposition. Indeed, Figure 3 shows asymptotic dependence between rate constant and concentration for the commercially used compounds with identical length of alkyl chain C₁₂ at pH 11. Whereas DTMA (*N*-dodecyl-*N,N,N*-trimethylammonium chloride) and BAC (*N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-dodecylammonium chloride), commercially used QAS without hydroxyethyl groups, show poor decontamination effect, DHEMA (*N,N*-bis(hydroxyethyl)-*N*-dodecyl-*N*-methylammonium chloride) containing hydroxyethyl groups shows a significant increase in decontamination effect. Notably, 5b was found to be much superior to all the reference compounds. Finally, we proved the necessity for the hydroxyl groups potentiated by the benzyl moiety for justification of the choice of BOC-like compounds.

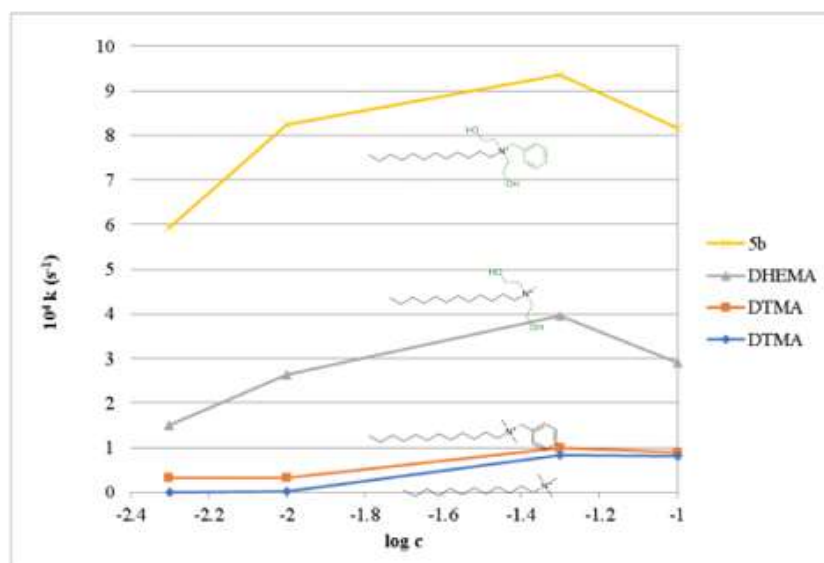


Figure 3. Commercially used compounds at pH 11. The influence of QAS structure on the decontamination effect (rate constant) at pH 11; DTMA (*N*-dodecyl-*N,N,N*-trimethylammonium chloride), BAC (*N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-dodecylammonium chloride), DHEMA (*N,N*-bis(hydroxyethyl)-*N*-dodecyl-*N*-methylammonium chloride) and **5b** (*N*-benzyl-*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)dodecan-1-aminium chloride); green color highlights the positive moiety to increase the decontamination effect. The decrease in activity at high concentrations is due to an excess of surfactant. This so-called empty micelle effect has been previously described [42].

3.4. Antimicrobial Activity

To evaluate the biological decontamination potential, *in vitro* antimicrobial activity of compounds **5a-e** was evaluated by the broth microdilution method for four Gram-positive and four Gram-negative bacterial strains. Obtained results are presented as minimum inhibitory concentrations (MICs) after 24 h and 48 h, and the minimum bactericidal concentrations (MBCs) after 24 h (Figure 4). High antibacterial activity was found against the G+ bacteria *S. aureus* (STAU), methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), *S. epidermidis* (STEP), and vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE). The observed higher susceptibility to the tested compounds of G+ bacteria compared to G- bacteria, as discussed previously, is in agreement with the literature [43,44]. The lowest MIC and MBC values, i.e., the highest effectiveness, was observed for *S. aureus*. The relationship of alkyl chain length to antimicrobial activity showed that the compounds with C₁₄ (**5c**) and C₁₆ (**5d**) chains were the most efficient against G+ bacteria. In contrast, the G- bacteria *E. coli* (ESCO), *K. pneumoniae* (KLPN-), extended-spectrum β -lactamase-producing *K. pneumoniae* (KLPN+), and multidrug-resistant *P. aeruginosa* (PSAE MR) were most susceptible to compounds with shorter alkyl chains, C₁₂ (**5b**) and C₁₄ (**5c**), respectively. Unsurprisingly, the least efficient against all tested bacterial strains was the compound with the shortest alkyl chain C₁₀ (**5a**) [14,29,31]. Compared with the commercially used BAC series, the **5a-e** series was comparable at a corresponding alkyl chain length. Individually, **5c** and **5b** have shown the best activity against *S. aureus* and *E. coli*, respectively.

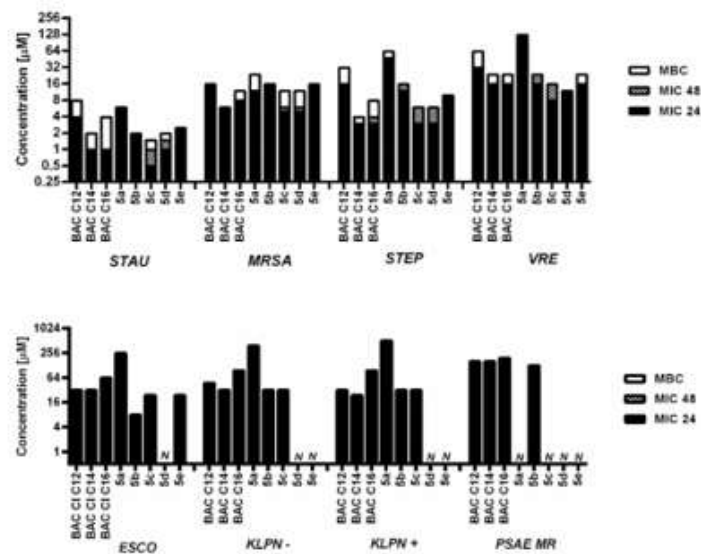


Figure 4. MIC and MBC values of tested compounds for G+ and G- bacterial strains. MIC values were determined after 24 and 48 h of incubation, MBC was determined after 24 h of incubation. The results for BACs had been published elsewhere [31,38]. N means that MIC or MBC was higher than the highest soluble concentration of the compound. Abbreviations: STAU = *S. aureus*, MRSA = methicillin-resistant *S. aureus*, STEP = *S. epidermidis*, VRE = vancomycin-resistant *Enterococcus*, ESCO = *E. coli*, KLPN- = *K. pneumoniae*, KLPN+ = extended-spectrum β -lactamase-producing *K. pneumoniae*, PSAE MR = multidrug-resistant *P. aeruginosa*.

According to the MICs and MBCs obtained for the traditional strains, the most efficient derivatives (5b, 5c, and 5d) underwent susceptibility testing against *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain (LVS) by flow cytometry assay (Figure 5). Although we used a *F. tularensis* LVS model strain that is attenuated in comparison to the virulent strain, the resistance of this strain is identical to that of the virulent strains. *F. tularensis* is a Gram-negative, intracellular bacterium which is an important medical challenge. *F. tularensis* is included in category A on the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) bioterrorism agent/disease list for the following reasons [45]: (a) it can be easily disseminated or transmitted from person to person; (b) it results in high mortality rates and has the potential for major public health impact; (c) it might cause public panic and social disruption; and (d) it requires special action for public health preparedness. In view of the above, any substance that can successfully kill *F. tularensis* is highly desirable. The time of exposure (5 min) and reference compounds (ethanol 70% and BAC 0.1%) were used to simulate more practical conditions. The obtained results showed high efficacy especially of 5b, at least comparable to all reference drugs (Figure 6). Notably, substance 5b at concentration 0.1% has an even better effect compared to ethanol, which is used as standard for disinfection and decontamination against pathogenic bacteria. Moreover, the effect of alkyl chain length on susceptibility to G- bacteria, represented by decreasing activity from 5b to 5d, corresponded to results obtained by microdilution assay. In addition, it is clear that the decontamination effect is proportionally dependent on the concentration (5c at concentration of 0.1%, 0.05% and 0.01% causes the elimination of $80.47 \pm 4.61\%$, $58.16 \pm 7.23\%$ and $29.04 \pm 8.80\%$ of bacteria, respectively) (Figure 5).

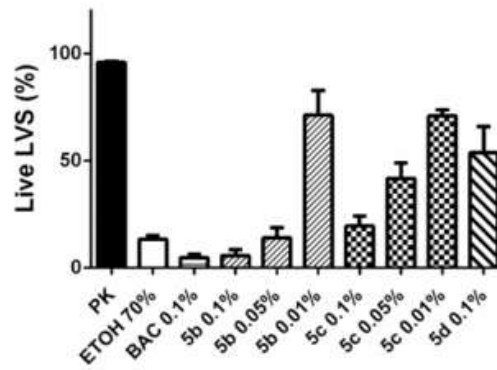


Figure 5. Susceptibility testing against *Francisella tularensis* LVS. The remaining ratio of living LVS after 5 min exposure is expressed as mean \pm SEM ($n = 3$).

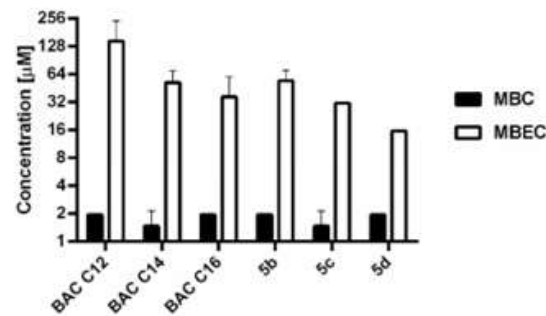


Figure 6. MBEC values and MBC values established for *S. aureus*. MBC and MBEC values were determined after 24 h of incubation for BAC and 5b-d series by broth microdilution method and MBEC assay respectively. Results are expressed as the mean \pm SD ($n = 3$).

3.5. Antibiofilm Activity and Comparison in Effectiveness against *S. aureus* in Planktonic and Biofilm Form

To evaluate the efficacy of the novel series against the biofilm form, which is much more resistant than the planktonic form and can often cause a relapse of the infection, a *S. aureus* biofilm formed on a polystyrene surface for 24 h was exposed for 24 h to the 5b, 5c, 5d and BAC derivatives with C12, C14 and C16 alkyl chains. The minimal biofilm eradication concentration (MBEC) showed comparable activity between both tested series, and notably the MBECs values of 5b-d derivatives were slightly lower than the values for the corresponding BAC derivatives. Comparison of established MBEC and MBC values have shown that *S. aureus* in biofilm form was 4–64 times less susceptible to the tested compounds than in planktonic form. All results are depicted in Figure 6.

3.6. Virucidal Activity against Enveloped Viruses

To evaluate the width of the spectrum against different microorganisms, the virucidal activity of 5b-d on murine cytomegalovirus (MCMV) and SARS-CoV-2 virus was determined using a quantitative suspension assay. Virus titer was evaluated using the

Spearman-Kärber method and expressed as logTCID₅₀/mL [32]. In accordance with EN 14476 for disinfection with full virucidal activity, the substance should demonstrate a reduction in virus titer of at least 4 orders of magnitude, corresponding to 99.99% inactivation [33]. The morphological changes of one layer of cells were monitored to distinguish between the virus-induced cytopathic changes and the toxic effect caused by the test substance. The highest efficiency was shown by substance **5b**, where the virus titer decreased by more than 5 orders of magnitude at a concentration of 0.01% (Table 4). The decrease could not be determined exactly for the compounds at a concentration of 0.1% (marked >), as the tested substances at this concentration already affected the cell culture which was used for growing the virus. Evaluation against SARS-CoV-2 showed that **5b** and **5c** showed only a modest effect at a concentration of 0.01%. Unfortunately, at higher concentration (0.1%), growth of the cells for culturing the virus was affected and the effect reaching the required value of a decrease of 4 logarithms cannot be confirmed.

Table 4. Determination of virucidal activity against MCMV and SARS-CoV-2 (5 min exposure).

Compounds	Conc. (mM)	$\Delta\log\text{TCID}_{50}$ (MCMV)	$\Delta\log\text{TCID}_{50}$ (SARS-CoV-2)
5b	0.1% (2.690)	>3.34 ^a	>3.51 ^a
	0.01% (0.269)	5.33	0.47
5c	0.1% (2.340)	>2.34 ^a	>3.51 ^a
	0.01% (0.234)	3.34	0.64
5d	0.1% (2.190)	>3.34 ^a	1.00
	0.01% (0.219)	−0.50	0.84

^a The symbol > indicates that the concentration of the tested substances already affected the cell culture used for virus cultivation and it is not possible to determine the exact value.

3.7. Cell Viability Evaluation and Selectivity Index

To define the cytotoxic selectivity, i.e., safety, towards eukaryotic cells, in vitro cytotoxicity studies were performed using the mammalian Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. The values of IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) confirmed the predicted trend of the correlation described earlier for the homolog group, i.e., elongation of the alkyl chain length increases the cytotoxic potential of the drugs (Table 5) [29,31]. This effect is related to the increasing lipophilicity expressed as the Clog *P* (Table 5), and most likely correlates with the easier ability to penetrate cells. Notably, considering the identical BAC homologs (BAC 12–16), we can conclude that the introduction of the hydroxyethyl groups into the structure increases the IC₅₀ value and therefore reduces the toxicity of the substances. Furthermore, the selectivity indexes were calculated as the ration of IC₅₀/MIC (24 h) for all bacterial strains (Table 6).

Table 5. The effect of the tested compounds on CHO-K1 cell viability. Values are expressed as the IC₅₀ (series **5a–e**): Mean ± SEM (*n* = 3).

Compound	IC ₅₀ ± SEM (μM)	Clog <i>P</i>
5a	128.40 ± 12.7	−1.91
5b	36.09 ± 0.5	−1.02
5c	27.34 ± 1.1	−0.13
5d	19.58 ± 0.5	0.76
5e	19.14 ± 1.3	1.64
BAC 12^a	19.54 ± 1.2	2.63
BAC 14^a	15.04 ± 0.1	3.52
BAC 16^a	12.85 ± 1.4	4.41

^a The preparation of BAC_{12–16} has been described elsewhere [46].

Table 6. The selectivity indexes of benzoxonium-like salts calculated as ration IC₅₀/MIC (24h).

Compounds	SI (IC ₅₀ /MIC)							
	STAU	MRSA	STEP	VRE	ESCO	KLPN-	KLPN+	PSAE MR
5a	21.986	10.956	2.739	1.027	0.514	0.342	0.257	<0.257
5b	18.508	2.309	3.079	2.309	4.621	1.155	1.155	0.289
5c	55.796	5.602	9.331	3.501	1.166	0.875	0.875	<0.437
5d	19.980	4.012	6.683	1.671	<0.313	<0.313	<0.313	<0.313
5e	8.700	1.225	1.959	1.225	0.817	<0.612	<0.612	<0.612
BAC 12	3.750	0.625	0.625	0.375	0.313	0.156	0.094	0.039
BAC 14	13.193	5.127	3.847	2.310	0.722	0.577	0.241	0.030
BAC 16	19.668	0.987	4.936	3.946	1.234	0.822	0.822	<0.051

Abbreviations: STAU = *S. aureus*, MRSA = methicillin-resistant *S. aureus*, STEP = *S. epidermidis*, VRE = vancomycin-resistant *Enterococcus*, ESCO = *E. coli*, KLPN- = *K. pneumoniae*, KLPN+ = extended-spectrum β -lactamase-producing *K. pneumoniae*, PSAE MR = multidrug-resistant *P. aeruginosa*, SI—selectivity index, MIC—minimum inhibitory concentration (24 h).

4. Conclusions

The series of benzoxonium-like salts with alkyl chain length C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆ and C₁₈ was identified as promising active ingredients for chemical-biological decontamination. Critical micellar concentration as a standard characteristic of surfactants has shown a suitable concentration for chemical decontamination and the efficacy in fenitrothion degradation surpassed that of all the reference compounds. Biocidal activity against various strains of bacteria including *F. tularensis* and *S. aureus* in biofilm form was also determined to discover biological decontamination potential. The homolog with a chain length of C₁₂ (5b) shows the highest biocidal activity. However, the best effect for chemical decontamination is observed for derivatives with a longer alkyl chain (i.e., compounds 5d, 5e). In addition, the compounds seem to be safe on mammalian cell lines as a basic safety parameter for potential use in practice. Finally, BOC-type compounds have been found to have a significant dual effect against both chemical and biological agents. It is thus possible to envisage their use, individually or in a mixture, as active components of multi-purpose decontamination products.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/toxics9090222/s1>, Figure S1: ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) – 5a, Figure S2: ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) – 5a, Figure S3: ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) – 5b, Figure S4: ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) – 5b, Figure S5: ¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) – 5c, Figure S6: ¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) – 5c, Figure S7: ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) – 5d, Figure S8: ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) – 5d, Figure S9: ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) – 5e, Figure S10: ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) – 5e, Figure S11: MS spectrum of 5a in Rt 3.15 min, Figure S12: MS spectrum of 5b in Rt 3.28 min, Figure S13: MS spectrum of 5c in Rt 3.46 min, Figure S14: MS spectrum of 5d in Rt 3.64 min, Figure S15: MS spectrum of 5e in Rt 3.84 min.

Author Contributions: A.M. was responsible for the preparation of benzoxonium salts and characterization of their structure and writing the manuscript; M.H. was responsible for the evaluation of antibacterial and antibiofilm properties; A.M. and M.M. assessed the critical micellar concentration of prepared QAS and micellar catalysis measurement; L.P. (Lukas Prchal) performed HPLC analysis including calculation of lipophilicity; R.S. assessed the antiviral activity; M.B. and L.P. (Lenka Pulkrabkova) were responsible for the evaluation of cytotoxicity assessment; Z.K. was responsible for the evaluation of susceptibility of *Francisella tularensis*; O.S., D.J. and J.M. participated in the QAS design, management of the study and final correction of the manuscript and correspondence. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Czech Health Research Council (no. NV19-09-00198 and NV18-09-00181), by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project SV/FVZ201808), and by a grant of Ministry of Defence “Long Term Development Plan” Medical

Aspects of Weapons of Mass Destruction of the Faculty of Military Health Sciences, University of Defence.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors are grateful to Ian McColl for assistance with the manuscript.

Conflicts of Interest: Authors declare no conflict of interest.

References

1. EP3061864A1—Textiles Having Antimicrobial Properties—Google Patents. Available online: <https://patents.google.com/patent/EP3061864A1/en> (accessed on 18 September 2020).
2. Weibel, M.A.; Cortat, M.; Lebek, G.; LeCotonne, J.Y.; Kitler, M.E.; Barcherini, G. An Approach of the in Vivo Antibacterial Activity of Benzoxonium Chloride and Comparison with Other Buccopharyngeal Disinfectants. *Arzneimittelforschung* **1987**, *37*, 467–471. [PubMed]
3. Benzoxonium Chloride. Available online: <https://www.drugs.com/international/benzoxonium-chloride.html> (accessed on 18 September 2020).
4. Ponzelli, G.; Taidelli-Palmizi, G. Dodecyl-di-beta-oxyethyl-benzylammonium chloride in the topical therapy of burns. *Clin. Ter.* **1979**, *90*, 251–259. [PubMed]
5. Firestone, A.R.; Schmid, R.; Mühlemann, H.R. Topical Effects of a Quaternary Ammonium Compound on Caries Incidence and Bacterial Agglomerate Formation in the Rat. *Caries Res.* **1981**, *15*, 338–340. [CrossRef] [PubMed]
6. Daie Parizi, M.H.; Karvar, M.; Sharifi, I.; Bahrampour, A.; Heshmat Khah, A.; Rahnama, Z.; Baziar, Z.; Amiri, R. The Topical Treatment of Anthropnotic Cutaneous Leishmaniasis with the Tincture of Thioxolone plus Benzoxonium Chloride (Thio-Ben) along with Cryotherapy: A Single-Blind Randomized Clinical Trial. *Dermatol. Ther.* **2015**, *28*, 140–146. [CrossRef]
7. Hakimi Parizi, M.; Pardakhty, A.; Sharifi, I.; Farajzadeh, S.; Daie Parizi, M.H.; Sharifi, H.; Keyhani, A.R.; Mostafavi, M.; Bamorovat, M.; Ghaffari, D. Antileishmanial Activity and Immune Modulatory Effects of Benzoxonium Chloride and Its Entrapped Forms in Niosome on *Leishmania Tropica*. *J. Parasit. Dis.* **2019**, *43*, 406–415. [CrossRef] [PubMed]
8. Kis, G.L. Antimicrobial Compositions. CA2025728C, 26 February 2002. Available online: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/004256126/publication/CA2025728C?q=CA2025728C> (accessed on 18 September 2020).
9. Szekacs, A. Mechanism-Related Teratogenic, Hormone Modulant and Other Toxicological Effects of Veterinary and Agricultural Surfactants. *Insights Vet. Sci.* **2017**, *1*, 24–31. [CrossRef]
10. Labranche, L.-P.; Dumont, S.N.; Levesque, S.; Carrier, A. Rapid Determination of Total Benzalkonium Chloride Content in Ophthalmic Formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 989–993. [CrossRef] [PubMed]
11. Horn, G. Method and Composition Which Reduces Stimulation of Muscles Which Dilate the Eye. U.S. Patent 20060211753A1, 21 September 2006.
12. Ioannou, C.J.; Hanlon, G.W.; Denyer, S.P. Action of Disinfectant Quaternary Ammonium Compounds against *Staphylococcus Aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 296–306. [CrossRef]
13. Minbiole, K.P.C.; Jennings, M.C.; Ator, L.E.; Black, J.W.; Grenier, M.C.; LaDow, J.E.; Caran, K.L.; Seifert, K.; Wuest, W.M. From Antimicrobial Activity to Mechanism of Resistance: The Multifaceted Role of Simple Quaternary Ammonium Compounds in Bacterial Eradication. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 3559–3566. [CrossRef]
14. Dolezal, R.; Soukup, O.; Malinak, D.; Savedra, R.M.L.; Marek, J.; Dolezalova, M.; Pasdiorova, M.; Salajkova, S.; Korabecny, J.; Honegr, J.; et al. Towards Understanding the Mechanism of Action of Antibacterial N-Alkyl-3-Hydroxypyridinium Salts: Biological Activities, Molecular Modeling and QSAR Studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 699–711. [CrossRef]
15. Jennings, M.C.; Minbiole, K.P.C.; Wuest, W.M. Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1*, 288–303. [CrossRef]
16. Tiwari, S.; Ghosh, K.; Marek, J.; Kuca, K. Cationic Micellar-Catalyzed Hydrolysis of Pesticide Fenitrothion Using α -Nucleophiles. *Lett. Drug Des. Discov.* **2010**, *7*, 194–199. [CrossRef]
17. Sharma, R.; Gupta, B.; Yadav, T.; Sinha, S.; Sahu, A.K.; Karpichev, Y.; Gathergood, N.; Marek, J.; Kuca, K.; Ghosh, K.K. Degradation of Organophosphate Pesticides Using Pyridinium Based Functional Surfactants. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4*, 6962–6973. [CrossRef]
18. Singh, N.; Karpichev, Y.; Gupta, B.; Satnami, M.L.; Marek, J.; Kuca, K.; Ghosh, K.K. Physicochemical Properties and Supernucleophilicity of Oxime-Functionalized Surfactants: Hydrolytic Catalysts toward Dephosphorylation of Di- and Triphosphate Esters. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 3806–3817. [CrossRef] [PubMed]

19. Singh, N.; Ghosh, K.K.; Marek, J.; Kuca, K. Hydrolysis of Carboxylate and Phosphate Esters Using Monopyridinium Oximes in Cationic Micellar Media. *Int. J. Chem. Kinet.* **2011**, *43*, 569–578. [CrossRef]
20. Banjare, M.K.; Kurrey, R.; Yadav, T.; Sinha, S.; Satnami, M.L.; Ghosh, K.K. A Comparative Study on the Effect of Imidazolium-Based Ionic Liquid on Self-Aggregation of Cationic, Anionic and Nonionic Surfactants Studied by Surface Tension, Conductivity, Fluorescence and FTIR Spectroscopy. *J. Mol. Liq.* **2017**, *241*, 622–632. [CrossRef]
21. Domagk, G. A Method for Disinfection and Preservation. DE680599C, 1 September 1939.
22. 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. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *37*. Available online: <https://jcm.asm.org/content/37/6/1771/figures-only> (accessed on 8 April 2021).
23. Singh, S.; Singh, S.K.; Chowdhury, I.; Singh, R. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *Open Microbiol. J.* **2017**, *11*, 53–62. [CrossRef]
24. Azeredo, J.; Azevedo, N.F.; Briandet, R.; Cerca, N.; Coenye, T.; Costa, A.R.; Desvaux, M.; Di Bonaventura, G.; Hébraud, M.; Jaglic, Z.; et al. Critical Review on Biofilm Methods. *Crit. Rev. Microbiol.* **2017**, *43*, 313–351. [CrossRef] [PubMed]
25. Guggenheim, E.A. XLVI. On the Determination of the Velocity Constant of a Unimolecular Reaction. *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **1926**, *2*, 538–543. [CrossRef]
26. Zajicek, M.; Radl, Z. Katalytický Vliv Kationaktivního Tenzidu Na Hydrolyzu Fosfonátu. In *Sborník Vyzkumného Ústavu 070*; Ministry of Defense: Brno, Czech Republic, 1979; pp. 115–129. (In Czech)
27. Cabal, J.; Kuča, K.; Mičková, J. Kinetics of Decomposition of Organophosphate Fenitrothion by Decontaminating Foam-Making Blends. *J. Appl. Biomed.* **2007**, *5*, 167–170. [CrossRef]
28. Clinical and Laboratory Standards Institute (Ed.) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: M07-A10; Approved Standard*, 10th ed.; Documents/Clinical and Laboratory Standards Institute; Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, PA, USA, 2015.
29. Marek, J.; Malinák, 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. [CrossRef] [PubMed]
30. Malinák, D.; Dolezal, R.; Marek, J.; Salajkova, S.; Soukup, O.; Vejsova, M.; Korabecny, J.; Honegr, J.; Penhaker, M.; Musilek, K.; et al. 6-Hydroxyquinolinium Salts Differing in the Length of Alkyl Side-Chain: Synthesis and Antimicrobial Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5238–5241. [CrossRef]
31. Soukup, O.; Benkova, M.; Dolezal, R.; Sleha, R.; Malinák, D.; Salajkova, S.; Markova, A.; Hympanova, M.; Prchal, L.; Ryskova, L.; et al. The Wide-Spectrum Antimicrobial Effect of Novel N-Alkyl Monoquaternary Ammonium Salts and Their Mixtures; the QSAR Study against Bacteria. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *206*, 112584. [CrossRef]
32. Spearman, C. The Method of ‘Right and Wrong Cases’ (‘Constant Stimuli’) Without Gauss’s Formulae. *Br. J. Psychol.* **1908**, *2*, 227–242. [CrossRef]
33. BS EN 14476:2013+A2:2019—Chemical Disinfectants and Antiseptics. Quantitative Suspension Test for the Evaluation of Virucidal Activity in the Medical Area. Test Method and Requirements (Phase 2/Step 1). 31 August 2019. Available online: <https://shop.bsigroup.com/ProductDetail?pid=00000000030401479> (accessed on 8 April 2021).
34. van Meerloo, J.; Kaspers, G.J.L.; Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*; Cree, I.A., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2011; pp. 237–245. [CrossRef]
35. Limanov, V.E.; Épshtein, A.E.; Skvortsova, E.K.; Aref’eva, L.I.; Gleberman, S.E.; Volkova, A.P. Synthesis and Antibacterial Action of Surface-Active Quaternary Ammonium Salts Containing Hydroxyethyl Radicals. *Pharm. Chem. J.* **1976**, *10*, 55–58. [CrossRef]
36. Chernyavskaya, M.A.; Stefanovich, V.V.; Sergeeva, I.A.; Belova, A.S. Antimicrobial and Surface-Active Properties of Cationic Surfactants Based on Chloroalkanes and Alkylbenzenes. *Pharm. Chem. J.* **1984**, *18*, 784–787. [CrossRef]
37. Stefanović, G.; Čirić, J. Synthese und bacterizide Wirkung einiger quaternärer, höherer Alkyl- und Alkenyl-bis-(2-oxýáthyl)-Ammoniumsalze. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1954**, *73*, 401–409. [CrossRef]
38. Benkova, M.; Soukup, O.; Prchal, L.; Sleha, R.; Eleršek, T.; Novak, M.; Sepčić, K.; Gunde-Cimerman, N.; Dolezal, R.; Bostik, V.; et al. Synthesis, Antimicrobial Effect and Lipophilicity-Activity Dependence of Three Series of Dichained N-Alkylammonium Salts. *ChemistrySelect* **2019**, *4*, 12076–12084. [CrossRef]
39. Traube, I. Über Die Kapillaritätskonstanten Organischer Stoffe in Wässriger Lösung. *Annu. Chem.* **1891**, *265*, 27–55. [CrossRef]
40. Han, X.; Balakrishnan, V.K.; VanLoon, G.W.; Bunzel, E. Degradation of the Pesticide Fenitrothion as Mediated by Cationic Surfactants and Alpha-Nucleophilic Reagents. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2006**, *22*, 9009–9017. [CrossRef]
41. Balakrishnan, V.K.; Han, X.; VanLoon, G.W.; Dust, J.M.; Toullec, J.; Bunzel, E. Acceleration of Nucleophilic Attack on an Organophosphorothioate Neurotoxin, Fenitrothion, by Reactive Counterion Cationic Micelles. Regioselectivity as a Probe of Substrate Orientation within the Micelle. *Langmuir* **2004**, *20*, 6586–6593. [CrossRef]
42. Bunton, C.A. Micellar Catalysis and Inhibition. *Prog. Solid State Chem.* **1973**, *8*, 239–281. [CrossRef]
43. Tischer, M.; Pradel, G.; Ohlsen, K.; Holzgrabe, U. Quaternary Ammonium Salts and Their Antimicrobial Potential: Targets or Nonspecific Interactions? *ChemMedChem* **2012**, *7*, 22–31. [CrossRef] [PubMed]
44. Shtyrlin, N.V.; Sapozhnikov, S.V.; Galiullina, A.S.; Kayumov, A.R.; Bondar, O.V.; Mirchink, E.P.; Isakova, E.B.; Firsov, A.A.; Balakin, K.V.; Shtyrlin, Y.G. Synthesis and Antibacterial Activity of Quaternary Ammonium 4-Deoxyypyridoxine Derivatives. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 3864193. [CrossRef] [PubMed]

45. CDC/Bioterrorism Agents/Diseases (by category)/Emergency Preparedness & Response. Available online: <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp> (accessed on 9 April 2021).
46. Kuca, K.; Marek, J.; Stodulka, P.; Musilek, K.; Hanusova, P.; Hrabanova, M.; Jun, D. Preparation of Benzalkonium Salts Differing in the Length of a Side Alkyl Chain. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* **2007**, *12*, 2341–2347. [[CrossRef](#)]