

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

OPTIMALIZACE METODIKY VEDOUČÍ K HODNOCENÍ CITLIVOSTI BIOFILM FORMUJÍCÍCH MIKROBIÁLNÍCH AGENS VŮČI LÁTKÁM S ANTIMIKROBNÍM POTENCIÁLEM

JANA ROUBALOVÁ

Vedoucí diplomové práce: RNDr. KLÁRA KONEČNÁ, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Kláře Konečné, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky, vstřícnost při konzultacích a za odborné vedení mé diplomové práce. Velký dík patří i mým rodičům za podporu a zázemí, které mi poskytovali po celou dobu mého studia.

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

V Hradci Králové 4.5.2018

Obsah

1. OBSAH

2.	ABSTRAKT	7
3.	ABSTRACT	8
4.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
5.	ÚVOD	10
6.	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	11
7.	TEORETICKÁ ČÁST	12
7.1	BIOFILM JAKO SPOLEČENSTVÍ MIKROORGANISMŮ	12
7.1.1	Vývoj éry biofilmů	12
7.2	STAVBA BIOFILMU	13
7.2.1	Extracelulární polymerní matrice	14
7.2.1.1	Složení a stavba extracelulární polymerní matrice	14
7.2.1.2	Funkce extracelulární polymerní matrice	17
7.3	VÝVOJ BIOFILMU	17
7.3.1	Přichycení bakterií k povrchu	17
7.3.2	Zrání biofilmu	18
7.3.3	Odlučování buněk	19
7.4	KVASINKOVÉ BIOFILMY	19
7.4.1	Morfologie kvasinky <i>Candida albicans</i>	20
7.5	MODELY BIOFILMŮ	22
7.5.1	Statické <i>in vitro</i> metody	22
7.5.1.1	Formování biofilmu v mikrotitračních destičkách	22
7.5.1.2	Formování biofilmu na kolíčcích	23
7.5.2	Dynamické <i>in vitro</i> metody	27
7.5.2.1	Průtoková komora	27
7.5.2.2	Chemostat	28
7.5.2.3	Rotační prstencový reaktor	30
7.5.2.4	Membránový bioreaktor	31

7.5.2.5	Bioreaktor pro tvorbu biofilmu s konstantní tloušťkou.....	32
7.5.3	<i>In vivo</i> modely s využitím obratlovců.....	33
7.5.3.1	Modely biofilmů na centrálních žilních katetrech	33
7.5.3.2	Modely biofilmů na podkožních implantátech	34
7.6	DETEKCE BIOFILMŮ	35
7.6.1	Konfokální laserová skenovací mikroskopie	35
7.6.2	Kvantifikace biomasy biofilmů a mikrobů obsažených v biofilmech	37
7.6.2.1	Detekce celé biomasy biofilmu.....	37
7.6.2.2	Kvantifikace viabilních buněk biofilmu na základě detekce metabolické aktivity	40
7.6.2.3	Kvantifikace matrice biofilmu	43
8.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
8.1	POUŽITÝ MATERIÁL.....	45
8.2	POUŽITÉ KMENY KVASINEK.....	47
8.3	POUŽITÁ KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	48
8.3.1	Soyabean médium.....	48
8.3.2	Médium RPMI-1640, R8758 s L-glutaminem a NaHCO ₃	48
8.3.3	MGM20 médium	48
8.3.4	MGM10 médium	49
8.4	PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ.....	49
8.4.1	Soyabean médium.....	49
8.4.2	MGM20 médium	49
8.4.3	MGM10 médium	50
8.5	PŘÍPRAVA KALCIFIKAČNÍHO ROZTOKU	50
8.6	METODIKA.....	52
8.6.1	Formace biofilmů na kolíčkách a v jamkách mikrotitračních destiček.....	52
8.6.2	Hodnocení schopnosti kvasinek adherovat k povrchu.....	54
8.6.3	Syntéza hydroxyapatitu <i>in-situ</i> na kolíčkách	57
8.6.4	Hodnocení a výsledky.....	57
9.	DISKUSE	79
10.	ZÁVĚR	82
11.	SEZNAM TABULEK	83

12. SEZNAM OBRÁZKŮ	83
13. SEZNAM GRAFŮ.....	84
14. POUŽITÁ LITERATURA.....	85

2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Farmacie

Kandidát: Jana Roubalová

Konzultant: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Název diplomové práce: Optimalizace metodiky vedoucí k hodnocení citlivosti biofilm formujících mikrobiálních agens vůči látkám s antimikrobním potenciálem

Cíl práce: Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat metodický přístup formování kvasinkových biofilmů *in vitro* na tzv. kolíčkách a na stěnách jamek 96 jamkového panelu. Tento systém formování biofilmů by měl být analogickým přístupem ke komerčně dostupnému systému *Calgary Biofilm Device*. Pro optimalizaci metodiky bylo použito 10 kmenů kvasinek rodu *Candida* a 4 různá kultivační média (nutričně chudá/bohatá). Mezi testovanými kvasinkovými kmeny byly jak kmeny referenční, tak klinické izoláty.

Metody: Schopnost formace kvasinkových biofilmů různých kmenů v různých kultivačních médiích byla hodnocena přístupem fixace, barvení formovaných biofilmů pomocí krystalové violeti a následné extrakce a spektrofotometrického proměření intenzity extrahované barvy.

Výsledky: Jednotlivé kmeny byly po kultivaci v různých médiích zařazeny do kategorií dle schopnosti tvořit biofilm. V jamkách obecně docházelo k silnější adhezí kvasinek než-li na kolíčkách, kam kvasinky adherovaly velmi slabě nebo vůbec. U většiny kmenů *Candida albicans* docházelo ke zvýšené produkci biofilmů v médiích obsahující fetální bovinní sérum, tedy v médiích MGM10 a RPMI. V případě kmene *Candida tropicalis* však docházelo ve srovnání s médiem RPMI k více jak desetinásobně vyšší adhezí na dno a stěny jamek destičky v médiu Soyabean, tedy bez přítomnosti FBS.

Závěry: U námi studovaných kvasinkových kmenů nebyla prokázána schopnost adherovat na polypropylenové kolíčky. Fetální bovinní sérum na základě statistického hodnocení prokazatelně podporovalo růst a formaci biofilmů u většiny kmenů kvasinek *Candida albicans* v jamkách mikrotitračních destiček. Testovaný kmen kvasinky *Candida tropicalis* se v médiu Soyabean projevil jako silný producent biofilmu a bude využit k další optimalizaci metodiky.

Klíčová slova: biofilm, *in vitro* testování citlivosti mikroorganismů, fyziologie biofilmů, *quorum sensing* fenomén

3. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Study program: Pharmacy

Candidate: Jana Roubalová

Consultant: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Title of thesis: Optimization of methods for sensitivity evaluation of biofilm-forming microbial agents towards substances with antimicrobial potential

Background: The aim of this diploma thesis was to optimize the methodical approach to the production of yeast biofilms in vitro on the so-called pegs and the walls of the wells of the 96-well panel. This biofilm formation system should be an analogous approach to the commercially available Calgary Biofilm Device. 10 strains of *Candida* yeast and 4 different culture media (nutritionally poor / rich) were used to optimize the methodology. Both the reference strains and the clinical isolates were among the yeast strains tested.

Methods: The ability to form yeast biofilms by different strains in different culture media was evaluated by the approach of fixation, staining of the formed biofilms by crystal violet and extraction and spectrophotometric measurement of the intensity of the extracted color.

Results: Individual strains, after cultivation in different media, were categorized according to their ability to form biofilm. Larger yeast adherence occurs in the wells than on pegs where the yeast adhered very weakly or at all. Most *Candida albicans* strains produced a larger biofilm mass in media containing fetal bovine serum, i.e. in MGM10 and RPMI media. However, in the case of *Candida tropicalis*, there was more than 10-fold higher adherence to the bottom and wells of the plate in Soyabean medium.

Conclusion: The ability to adhere to the polypropylene pins has not been demonstrated in our yeast strains. Fetal bovine serum, based on statistical evaluation, demonstrably supported the growth and formation of biofilms in most yeast *Candida albicans* strains in microtiter plate wells. The *Candida tropicalis* yeast strain tested in the Soyabean medium proved to be a strong biofilm producer and will be used to further optimize the methodology.

Key words: biofilm, in vitro testing of microbial sensitivity, physiology of biofilms, *quorum sensing* phenomenon

4. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection, Americká sbírka mikroorganismů
CCM	<u>C</u> zech <u>C</u> ollection of <u>M</u> icroorganisms, Česká sbírka mikroorganismů
CLSM	<u>C</u> onfocal <u>L</u> aser <u>S</u> canning <u>M</u> icroscopy, konfokální laserová skenovací mikroskopie
ConA	<u>C</u> oncanavaline <u>A</u> , Konkanavalin A
DMMB	<u>D</u> imethyl <u>m</u> ethylene <u>B</u> lue, dimethylmethylenová modř
DNA	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid, deoxyribonukleová kyselina
EPM	<u>E</u> xtracellular <u>P</u> olymeric <u>M</u> atrix, extracelulární polymerní matrice
EPS	<u>E</u> xtracellular <u>P</u> olymeric <u>S</u> ubstances, extracelulární polymerní látky
FBS	<u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum, fetální bovinní sérum
FDA	<u>F</u> luorescein <u>D</u> iacetate, fluorescein diacetát
FITC	<u>F</u> luorescein <u>I</u> sothiocy <u>a</u> nate, fluorescein isothiokyanát
MBEC	<u>M</u> inimum <u>B</u> iofilm <u>E</u> radication <u>C</u> oncentration, minimální koncentrace potřebná k eradikaci biofilmu
MGM	<u>M</u> inimal <u>G</u> rowth <u>M</u> edium, nutričně chudé médium
MIC	<u>M</u> inimal <u>I</u> nhibition <u>C</u> oncentration, minimální inhibiční koncentrace
OD	<u>O</u> ptical <u>D</u> ensity, optická hustota (denzita)
QS	<u>Q</u> uorum <u>S</u> ensing, mechanismus mezibuněčné komunikace
RNA	<u>R</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid, ribonukleová kyselina
rpm	<u>R</u> evolutions per <u>M</u> inute, otáčky za minutu
RPMI	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute
SA	<u>S</u> abouraud <u>A</u> gar, Sabouraudův agar
TCBD	<u>T</u> he <u>C</u> algary <u>B</u> iofilm <u>D</u> evice

5. ÚVOD

Biofilmy jsou strukturované komunity mikroorganismů pevně přichycené k povrchu, často obklopené cukernatou maticí, která je oproti planktonicky žijícím buňkám chrání před nepříznivými vlivy okolí a také před imunitními obrannými mechanismy hostitele.

V organismu se biofilmy vytváří zejména na implantátech, jako jsou umělé chlopně, katetry či kanyly, a jsou zdrojem chronických rekurentních infekcí. Bylo prokázáno, že na rozdíl od planktonické formy života, mikroorganismy žijící v biofilmu vykazují až tisíckrát vyšší rezistenci vůči antimikrobním látkám.

S rostoucí rezistencí mikroorganismů vůči běžně používaným antimikrobním látkám roste poptávka po syntéze nových antimikrobních látek, které by úspěšně bojovaly s těmito na běžně dostupné a využívané antimikrobní látky rezistentními kmeny.

Mikrobiologická laboratoř Katedry biologických a lékařských věd, Farmaceutické fakulty Univerzity (zkr. FaF HK UK) se mimo jiné zaměřuje na testování antimikrobní aktivity nově syntetizovaných látek, které v rámci výzkumu poskytují jiné pracovní skupiny FaF HK UK.

V rámci pokročilého výzkumu se nově toto pracoviště v rámci tzv. pokročilých studií také zaměřuje na testování účinnosti těchto látek na mikrobiální biofilmy v systému *in vitro*.

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat metodický přístup formování kvasinkových biofilmů *in vitro* na tzv. kolíčcích. Tento systém formování biofilmů by měl být analogickým přístupem ke komerčně dostupnému systému *Calgary Biofilm Device*.

V první fázi optimalizace bylo cílem určit vliv čtyř různých kultivačních médií na schopnost adherence a formování biofilmu deseti kvasinkových kmenů v jamkách 96 jamkové mikrotitrační destičky a na kolíčcích, jež byly součástí víčka.

Následně byla provedena kategorizace těchto kmenů dle míry adherence na neadherující, slabě adherující, středně silně adherující a silně adherující biofilmové fenotypy.

Nakonec byl vliv složení kultivačního média na schopnost adherovat u jednotlivých studovaných kmenů hodnocen statisticky.

6. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

- Řešitelka vypracuje práci v experimentální podobě.
- V teoretické části se soustředí na metodické přístupy, které se běžně volí při *in vitro* testování citlivosti biofilm-formujících mikroorganismů vůči antimikrobním látkám.
- Řešitelka bude vycházet z recentních informačních zdrojů.
- Teoretická část bude vycházet z minimálně 40 literárních odkazů.
- V experimentální části se bude věnovat formování biofilmů *in vitro* u vybraných biofilm-formujících mikroorganismů, detekci biofilmů a také hodnocení kvantity biofilmů

7. TEORETICKÁ ČÁST

7.1 BIOFILM JAKO SPOLEČENSTVÍ MIKROORGANISMŮ

Biofilm je společenství jednobuněčných organismů pevně přichycených k povrchu. Takové společenství je tvořeno agregáty mikroorganismů, které jsou mezi sebou fyzicky propojeny a které produkují extracelulární matici, jež obsahuje například proteiny, DNA a polysacharidy a ve které jsou tyto mikrobi „uzavřeni“. Přesné složení extracelulární matrice bude popsáno v další kapitole (Mah et O’Toole, 2001).

Takové společenství může být tvořeno jedním, ale také několika sty mikrobiálními druhy. Pro představu – je odhadováno, že biofilm pokrývající naše zuby je tvořen více jak 500 různými bakteriálními druhy (Whittaker, 1996).

Dalším důvodem, proč se jednobuněčné organismy raději uchylují k formování biofilmu, je jeho odolnost a stálost. Takto vytvořené společenství mikroorganismů dokáže odolávat dávkám chemoterapeutik 1000krát vyšším, než je potřeba pro eradikaci planktonicky žijících buněk (Potera, 2010).

Je nutno poznamenat, že se nejedná o antibiotickou rezistenci jako takovou, nýbrž pouze o schopnost biofilmu tolerovat vysoké dávky chemoterapeutik. Mikrobi žijící v biofilmu tedy mají tendenci přežívat chemoterapeutickou léčbu, avšak tuto vlastnost ztrácejí v momentě, kdy dojde k jeho narušení. (Bayles, 2007).

7.1.1 Vývoj éry biofilmů

Jako první, tenkrát ještě zcela nevědomky, pozoroval mikrobiální biofilm pomocí jednoduchého mikroskopu nizozemský přírodovědec a průkopník mikroskopie Antoni van Leeuwenhoek, který v roce 1683 popsal mikroorganismy přítomné v zubním plaku (Leewenhoek, 1683).

První mikrofotografie agregovaných bakterií byly pořízeny v roce 1933 Arthurem Henricim. Z mikrofotografií bylo patrné, že většina vodních bakterií existuje právě v podobě biofilmu, nikoli jako volně flotující buňky (Henrici, 1933).

V roce 1977 vydali Niels Høiby a Sante Olling publikaci, ve které popsali agregáty *Pseudomonas aeruginosa* v infikované plicní tkáni pacientů s chronickou cystickou fibrózou (Høiby *et al.*, 1977).

O rok později, tedy roku 1978, popsal Bill Costerton přítomnost k povrchu adhezaných bakterií zabudovaných do "glykokalyxu" (sítě exopolysacharidových polymerů vytvářených bakteriemi) a v roce 1981 poprvé použil pojem biofilm k popisu tohoto jevu. Tento fenomén byl Costertonem přezkoumán a v roce 1987 popsán jako „v matrix uzavřený“ způsob růstu (Costerton *et al.*, 1978, McCoy *et al.*, 1981).

Roku 1993 bylo mikrobiology z Americké společnosti pro mikrobiologii (the American Society for Microbiology) konstatováno, že výzkum biofilmu a jeho fenotypu je pro medicínu a vědu obecně velice relevantní, a schopnost tvořit biofilm byla zařazena mezi charakteristické znaky mikroorganismů (Costerton *et al.*, 1994).

V posledních 15 letech se téma biofilmů stalo velice populárním, došlo ke dramatickému zvýšení počtu publikací zabírajících se touto problematikou a do budoucna lze očekávat velice obdobný trend daný neustále narůstající antibiotickou rezistencí (Bjarnsholt, 2013).

7.2 STAVBA BIOFILMU

Dva různé biofilmy se mezi sebou mohou lišit jak vnitřní strukturou, tak chemickými, elektrickými a mnoha dalšími vlastnostmi. Každý biofilm je proto svou stavbou unikátní (Cunningham *et al.*, 2001).

Vlastnosti a složení biofilmu jsou ovlivňovány mnoha faktory – samotnými mikroby, pohyblivostí těchto mikrobů, jejich produkty, dostupnými živinami a hydrodynamickými podmínkami prostředí. Velký vliv zde má tzv. *quorum sensing* fenomén (Cunningham *et al.*, 2001).

Quorum sensing (zkr. QS) je mechanismus, jež mikroorganismům umožňuje jak mezibuněčnou komunikaci, tak vnímání vjemů z okolního prostředí (Pai *et al.*, 2012).

Vzhledem k tomu, že mikroorganismy postrádají smyslové orgány, je tento mechanismus postaven především na jejich schopnosti vylučovat a ze svého okolí přijímat nejrůznější chemické signály (Miller *et al.*, 2001).

Síla QS koreluje s počtem buněk v daném v daném kompartmentu (například v biofilmu). Pokud se v okolí nachází pouze několik málo buněk, není tento mechanismus mezibuněčného dorozumívání v důsledku nízké koncentrace vylučovaných chemických signálů aktivován. Pokud je však denzita buněk v daném okolí vysoká, bude díky QS u buněk aktivováno specifické chování. Mnoho druhů mikroorganismů využívá QS ke koordinaci genové exprese v závislosti na hustotě místní populace (Pai *et al.*, 2012).

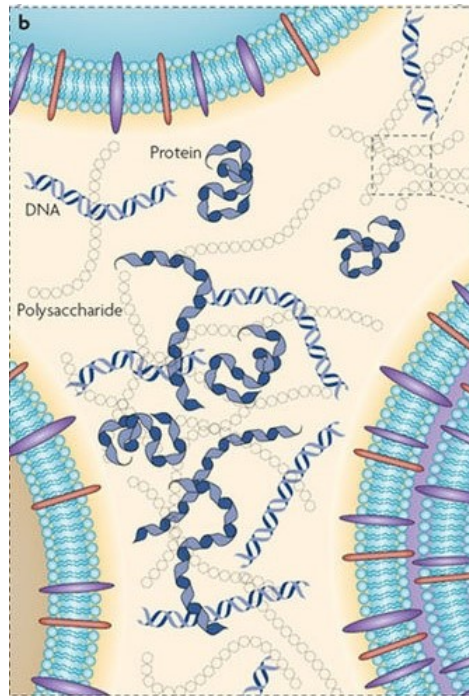
7.2.1 Extracelulární polymerní matrice

Obecně se předpokládá, že mikroorganismy jsou ve shlucích imobilizovány pomocí extracelulární polymerní matrice (zkr. EPM, z angl. *Extracellular Polymeric Matrix*).

Je to právě EPM, která definitivně odlišuje biofilm od planktonicky žijících buněk. Vzhledem ke své konzistenci je EPM často označována jako sliz (z angl. *slime*).

7.2.1.1 Složení a stavba extracelulární polymerní matrice

Nedílnou stavební složkou EPM, jejíž struktura je znázorněna na Obrázku 1, jsou mimo samotné mikroby také mikrobiálními buňkami vylučované exopolysacharidy (zkr. EPS, z angl. *Extracellular Polymeric Substances*). EPS mohou představovat 50 až 90 procent podílu celkového organického uhlíku obsaženého v biofilmu. Různé mikrobiální druhy budou produkovat různé EPS, které se mohou lišit chemickými a fyzikálními vlastnostmi (Flemming *et al.*, 2000).



Obrázek 1: Schématické znázornění struktury extracelulární polymerní matrice mikrobiálního biofilmu.

Převzato z Flemming H.S. et al., 2001, *The biofilm matrix*, a upraveno.

Vysvětlivky: **DNA** – deoxyribonukleová kyselina, **protein** – bílkovina, **polysaccharide** – polysacharid.

U gram-negativních bakteriálních biofilmů budou EPS nést převážně náboj neutrální nebo polyanionický. „Nosiči“ jsou zde hlavně uronové kyseliny (jako je kyselina D-glukuronová, D-galakturonová a manuronová) (Sutherland, 2001).

Záporný náboj, jež do biofilmu vnáší uronové kyseliny, umožňuje navázání dvojmocných kationtů, jako je vápník a hořčík, díky čemuž dochází k zesíťování kationtů s polysacharidy a vzniku větší vazebné síly uvnitř biofilmu (Flemming et al., 2000).

Opačný, tedy kladný náboj můžeme najít u gram-positivních bakteriálních biofilmů. Například sliz koaguláza-negativních stafylokoků se skládá z teichoové kyseliny smísené s malým množstvím bílkovin (Hussain et al., 1993).

Konkrétní typy polysacharidů, jež si dané společenství biofilmu tvoří, záleží na druhu přítomných mikrobů, teplotě a dostupných nutrientech (Flemming et Wingender, 2000).

Níže v Tabulce 1 lze nalézt příklady polysacharidů vyskytující se v EPM a organismy, které je produkují.

Tabulka 1: Typy polysacharidů a mikroorganismy, u nichž se vyskytují.

EXOPOLYSACHARID	DRUH MIKROORGANISMU
alginát	<i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
kurdlan	<i>Agrobacterium</i> sp., ATTC 31749
typ 1,3-β-kurdlan	<i>Cellulomonas flavigena</i>
xantan	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>
1,6-α-glukan 1,3-α-glukan	<i>Streptococcus mutans</i>
glucan altrenan dextran	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

Převzato z Lembre *et al.*, 2012, Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World, a upraveno.

EPM je schopna do své struktury navázat přes vodíkové můstky velké množství vody, které chrání biofilm v nehostinných podmínkách před jeho vysušením (Sutherland, 2001).

Součástí matrice jsou i prvky proteinového charakteru, mezi něž řadíme enzymy a strukturální proteiny (Conrad *et al.*, 2003.)

Tyto enzymy mohou být zapojeny do degradace biopolymerů na nízkomolekulární produkty, které za nepříznivých podmínek slouží jako zdroj uhlíku a energie. Některé enzymy pak naopak mohou vystupovat jako virulentní faktory, jež zvyšují patogenitu biofilmu (Wingender *et al.*, 1999).

Příkladem strukturálních proteinů, které jsou přítomny v EPM, jsou tzv. lektiny. Lektiny hrají úlohu ve formování a stabilizaci matricové sítě a zajišťují spoj mezi povrchem mikroorganismů a extracelulárními strukturami (Lynch *et al.*, 2007).

V Tabulce 2 je uveden stručný přehled jednotlivých složek EPM.

Tabulka 2: Složení extracelulární polymerní matrice.

SLOŽKA	% ZASTOUPENÍ V MATRIX
voda	až 97 %
mikrobiální buňky	2-5 %
polysacharidy	1-2 %
proteiny	<1-2 %
DNA + RNA	<1-2 %

Převzato z Muhsin *et al.*, 2015, Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections, a upraveno.

7.2.1.2 **Funkce extracelulární polymerní matrice**

Extracelulární polymerní matrice se podílí na upevnění biofilmu k povrchu, zadržuje množství vody dostatečné k přežití i v nehostinných podmínkách, zajišťuje odolnost proti nespecifickým i specifickým obranám hostitele během infekce a poskytuje toleranci vůči různým antimikrobiálním látkám. Dále umožňuje akumulaci živin z vnějšího prostředí a jejich následnou degradaci za účelem poskytnutí energie a stavebního materiálu. Vyskytne-li se biofilm v nehostinných podmínkách, může díky přítomnosti enzymů sama sloužit jako zdroj živin (Flemming *et Wingender*, 2010).

Z výše uvedeného výčtu je více než patrné, že správná funkce EPM je pro přežívání biofilmu esenciální a že narušení jeho integrity může mít pro celé společenství fatální následky.

7.3 VÝVOJ BIOFILMU

7.3.1 Přichycení bakterií k povrchu

Adheze mikroorganismů k povrchu a následné dozrávání biofilmu je souborem mnoha reverzibilních a ireverzibilních dějů. Hlavní je zde kontakt mikroorganismu

s povrchem. To, jestli k němu dojde či nikoli, záleží na mnoha okolnostech. Stěžejními se zde jeví zejména Brownův pohyb částic, gravitační síla a další okolní síly, které na mikroorganismus působí (Donlan, 2002).

Mikroorganismy se v rámci tohoto procesu setkávají s přitažlivými a odpudivými silami, které se liší v závislosti na dostupnosti živin, výši pH, iontové síle a teplotě. Tyto síly společně se složením média a přítomností pohyblivých struktur na buněčném povrchu mikrobiálního organismu ovlivňují rychlost a směr pohybu buněk. Pohyblivé bakterie vlastnící na svém povrchu bičík mají oproti bakteriím nepohyblivým konkurenční výhodu a snadněji překonávají proti nim působící odpudivé a hydrodynamické síly (Donlan, 2002).

Po zachycení k povrchu je adheze podpořena sekrecí adhezinů a aktivací povrchových buněčných struktur. Ani v tomto bodě se však ještě nejedná o nevratný jev. Mikroorganismy se mohou od povrchu oddělit a připojit se zpět k planktonické populaci. Děje se tak v případě, že jsou od povrchu odštipnuty proudem okolní kapaliny, nebo na ně začnou působit větší odpudivé síly, kterým nejsou schopny nadále odolávat, případně tak reagují na aktuální dostupnost živin (Dunne, 2002).

Teprve v případě, že mikroorganismy dokáží odolávat smykovému tření vznikajícímu mezi nimi osidlovaným povrchem a proudící kapalinou, může dojít k jejich pevnému připojení k tomuto povrchu (Kostakioti *et al.*, 2013).

7.3.2 Zrání biofilmu

Kontakt mikroorganismu s povrchem vyvolá spuštění procesů, které vedou ke změnám jeho genové exprese. U takového mikroorganismu dochází k potlačení genů vyskytujících se u planktonicky žijících buněk, a naopak ke zvýšené expresi genů podporujících jeho přisedlý způsob života, kterými jsou například geny podílející se na tvorbě EPM (Kostakioti *et al.*, 2013).

Tvorba EPM je následována formováním vodných kanálků, jež na povrchu biofilmu ústí v podobě pórů. Tyto vodné kanálky lze vnímat jako analogie oběhové soustavy. Jejich úkolem je distribuce nutrientů do všech mikrokolonií uvnitř biofilmu a následné odvádění odpadních produktů (Donlan, 2002; Parsek *et Singh*, 2003).

Biofilm, v němž došlo k formaci mikrokolonií a jejich následnému propojení pomocí vodních kanálků nazýváme biofilmem zralým neboli maturovaným (Donlan, 2002).

Mikroorganismy v maturovaném biofilmu vytvářejí živou komunitu, která si mezi sebou aktivně vyměňuje a sdílí produkty, jež hrají klíčovou roli v udržování příznivého životního prostředí (Kostakioti *et al.*, 2013).

7.3.3 Odlučování buněk

Je důležité si uvědomit, že mikroorganismus, jenž se stal součástí biofilmu, v něm není uvězněn na vždy. Jednou z možností buněk ukotvených v EPM je návrat k planktonické populaci (Kostakioti *et al.*, 2013).

Děje se tak buď pasivně, kdy jsou buňky strhávány z povrchu biofilmu proudící kapalinou, nebo je tento děj iniciován samotnými mikroorganismy. Ty jsou totiž schopny vnímat změny životního prostředí a posoudit, zda je pro ně stále výhodné být součástí biofilmu, nebo zda by více profitovali ze života volně se pohybujících buněk (Kostakioti *et al.*, 2013).

Rozptýlení biofilmu se tak děje na základě podnětů, mezi něž například patří změny v dostupnosti živin, fluktuace kyslíku, zvýšení toxických produktů nebo jiné stresory (Hall-Stoodley *et al.*, 2005).

7.4 KVASINKOVÉ BIOFILMY

Bakteriální biofilmy byly v uplynulých letech intenzivně studovány. Za tu dobu se podařilo nahromadit široké množství informací týkající se vlastností a struktury bakteriálních biofilmů, které objasňují jejich roli v patogenezi infekčních onemocnění (Douglas, 2003).

Mnohem méně je toho však známo o kvasinkových biofilmech, na které je pozornost vědců a výzkumných pracovníků zaměřena v současné době. Nejčastěji jsou předmětem zkoumání kvasinky rodu *Candida* spp. (Douglas, 2003).

Existuje relativně málo pro člověka patogenních druhů kvasinek rodu *Candida*, které mohou způsobovat jak povrchové, tak závažné systémové infekce. V současné

době se však kvasinky rodu *Candida* řadí mezi jedny z hlavních infekčních agens vyvolávající nozokomiální nákazy (Douglas, 2003).

Jedná se o oportunní patogeny, které nejčastěji napadají imunokompromitované nebo jinak oslabené pacienty. Například terapie silnými antibiotiky, která vybíjí přirozenou bakteriální mikroflóru, dává prostor pro přemnožení kvasinek a následnému vzniku infekce (Douglas, 2003).

Tyto mikroorganismy velmi často osidlují chirurgické implantáty jako jsou například močové a centrální žilní katetry a umělé chlopně či kloubní náhrady, jejichž povrch je ideální pro uchycení mikroorganismů a následné formování biofilmu (Donlan, 2001).

Terčem biofilm-formujících kvasinek však nejsou pouze povrchy implantátů. Kvasinkové biofilmy byly detekovány i ve tkáních postižených chronickou infekcí, například u pacientů s cystickou fibrózou (Donlan *et Costerton*, 2002).

Hlavním patogenem z rodu *Candida* je kvasinka *Candida albicans*. Tato kvasinka vyvolává povrchové infekce jako je moučnivka neboli orální kandidóza, jenž často postihuje novorozence s nedovyvinutým imunitním systémem, ale také systémové, život ohrožující infekce (Douglas, 2003).

Formování kvasinkového biofilmu začíná adhezí kvasinkových buněk k povrchu, které následně pokračuje tvořením hyf a pseudohyf. Celá buněčná populace je uzavřena v EPM a vytváří tak velmi odolnou, k povrchu přisedlou komunitu, což jí tvoří obtížně mechanicky odstranitelnou. Navíc jsou kvasinkové biofilmy vysoce rezistentní k většině antifungálních látek (Řičicová *et al.*, 2010).

7.4.1 Morfologie kvasinky *Candida albicans*

Candida albicans je polymorfní mikroorganismus – jejím výrazným znakem je schopnost růst v několika morfologických formách. Její tvar se pohybuje od pučících oválných jednobuněčných kvasinek tzv. blastospor až po vláknité pravé hyfy s paralelními stěnami. Mezi těmito dvěma extrémy tvoří *Candida albicans* také nepravé hyfy, tzv. pseudohyfy. Všechny tyto tři fenotypy hrají důležitou roli v její patogenitě a schopnosti přežít v lidském organismu (Sudbery *et al.*, 2004).

Oválné pučící kvasinkové buňky (zachycené na Obrázku 2) lze pozorovat při kultivaci *Candida albicans* za standardních laboratorních podmínek na Sabouraudově agaru. Této morfologie využívá *Candida albicans* pro šíření infekce krevním oběhem a kolonizování povrchů sliznic (Sudbery *et al.*, 2004.)

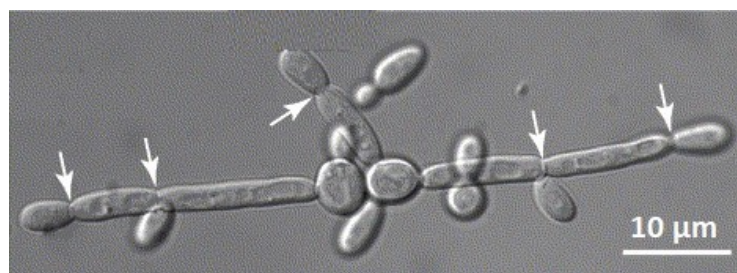


Obrázek 2: Pučící kvasinka *Candida albicans*.

Snímek pořízen pomocí světelné mikroskopie. Převzato ze Sudbery et al., 2004, The distinct morphogenic states of Candida albicans, a upraveno.

Pseudohyfy svým tvarem připomínají pravé hyfy, ale ve skutečnosti se jedná o zřetěžené kvasinkové buňky. Jsou v podstatě výsledkem nedokonalého pučení, kdy dochází k prodlužování buněk a vytvoření septa mezi mateřskou a dceřinou buňkou, ale nedochází k jejich oddělení (Sudbery *et al.*, 2004).

Kvasinkové pseudohyfy jsou zachyceny na Obrázku 3.

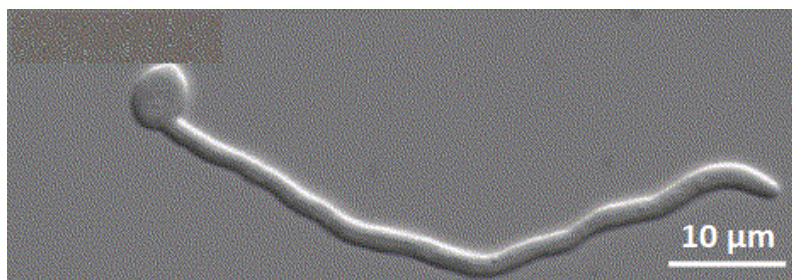


Obrázek 3: Pseudohyfy kvasinky *Candida albicans*.

Septa jsou znázorněna šipkami. Snímek pořízen pomocí světelné mikroskopie. Převzato ze Sudbery et al., 2004, The distinct morphogenic states of Candida albicans, a upraveno.

Pravé hyfy a pseudohyfy můžeme společně nazývat jako vláknité formy. Pravé hyfy (zachycené na Obrázku 4) představují ze všech tří morfologických forem tu

nejinvasivnější a v lidském organismu je jejich úkolem rozrušování epitelu a pronikání do tkání (Sudbery *et al.*, 2004).



Obrázek 4: Pravá hyfa kvasinky *Candida albicans*.

Snímek pořízen pomocí světelné mikroskopie. Převzato ze Sudbery et al., 2004, The distinct morphogenic states of Candida albicans, a upraveno.

7.5 MODELÝ BIOFILMŮ

7.5.1 Statické *in vitro* metody

7.5.1.1 Formování biofilmu v mikrotitračních destičkách

Zdaleka nejčastěji se pro *in vitro* modelování biofilmů používají mikrotitrační destičky.

Mikrotitrační destička je uzavřený systém, v němž nedochází k proudění kapaliny, jako je tomu u níže popsaných dynamických *in vitro* modelů. Kultivační médium je do jamek přidáno jednorázově na začátku experimentu, tudíž v průběhu dochází v jamkách k odčerpávání nutrientů a hromadění odpadních látek (Sharma *et al.*, 2017).

Biofilmy jsou formovány buďto přímo na dnech a stěnách jamek mikrotitrační destičky (nejčastěji využívané jsou 96 jamkové destičky) nebo na inzertu umístěném na dně jamky (nejčastěji 6, 12 nebo 24 jamkové destičky) (Heersink *et Goeres*, 2003).

Tento typ *in vitro* modelování je ideální ke screeningu účinnosti antimikrobních látek. Poskytuje možnost provádět najednou velké množství testů při nízkých finančních nákladech, jelikož k jejich provedení je za potřebí pouze malých objemů reakčních činidel (Niu *et Gilbert*, 2004).

Další výhodou je možnost jednoduše upravovat kultivační podmínky jako složení živného média, teplotu, vlhkost a koncentraci O₂ a CO₂ (Krom *et al.*, 2007).

Zároveň lze jamky destiček potahovat či impregnovat různými látkami, čehož lze využít při hledání optimálních podmínek pro formování biofilmů (Chandra *et al.*, 2001)

7.5.1.2 **Formování biofilmu na kolíčkách**

Jednou z variací klasického modelu mikrotitrační destičky pro *in vitro* formování biofilmů je model destičky s víčkem, ve kterém jsou zabudovány kolíčky, tzv. *The Calgary Biofilm Device* (zkr. TCBD), prodáváný pod komerčním názvem *MBEC Assay System* (z angl. *Minimal Biofilm Eradication Concentration*) společností Innovotech.

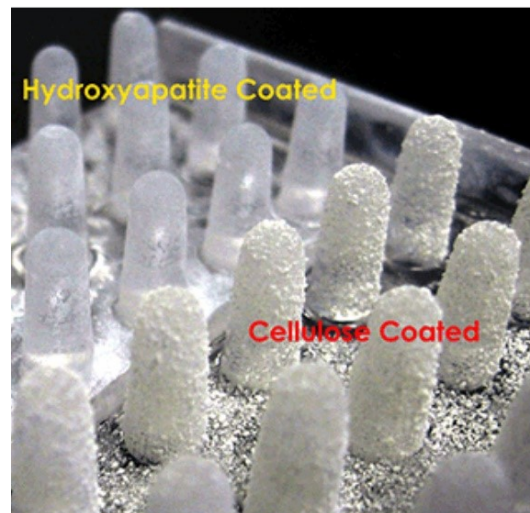
TCBD se používá ke stanovování minimální inhibiční koncentrace, minimální biocidní koncentrace či minimální koncentrace pro eradikaci biofilmu antimikrobních látek, desinficiencí či těžkých kovů. Dále nachází uplatnění ve výzkumu fyziologie a genetiky biofilmů a lze jím také porovnávat schopnost různých izolátů tvořit biofilm v identické kultuře. V neposlední řadě ho lze využít pro identifikaci synergických interakcí mezi antimikrobiálními látkami (Innovotech Inc., 2015).

TCBD sestává ze dvou částí. Horní část tvoří polystyrenové víko, jež je opatřeno kolíčky. Kolíčky jsou navrženy tak, aby přesně zapadaly do spodní části. Ta se vyrábí ve dvou provedeních, a to buďto s 96 oddělenými jamkami (viz Obrázek 7), což umožňuje kultivovat několik různých kmenů v rámci jednoho experimentu, nebo s otevřenými žlábkami (viz Obrázek 8), kam lze inokulovat pouze jeden kmen. Zároveň jsou kolíčky víka kompatibilní se standardní 96 jamkovou mikrotitrační destičkou (Innovotech Inc., 2015; Ceri *et al.*, 1999).

Srovnání průřezů obou provedení naleznete na Obrázku 6.

K dispozici jsou i varianty s kolíčky potaženými například celulórou nebo hydroxyapatitem (viz Obrázek 5). Toto potahování se provádí zejména za účelem usnadnění a urychlení růstu biofilmů. Kolíčků potažených celulórou lze využít například při testování antimikrobních látek proti rostlinným patogenům, kdy se potahem kolíčků

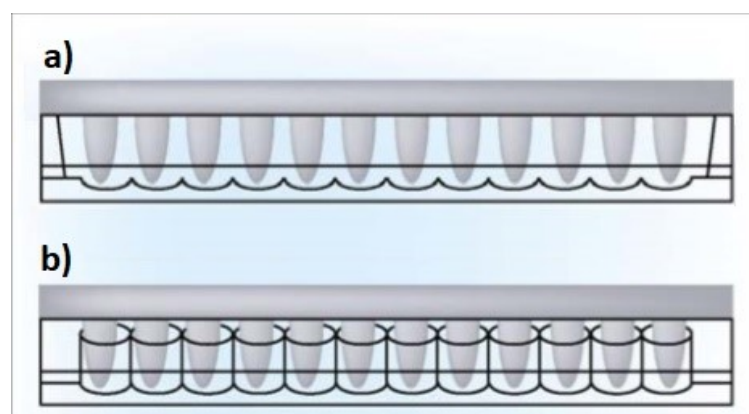
simulují přirozené podmínky růstu těchto patogenních mikrobů (Innovotech Inc., 2015; Macia *et al.*, 2014).



Obrázek 5: Kolíčky potažené hydroxyapatitem (Hydroxyapatite Coated) a celulózu (Cellulose Coated).

Převzato z MBEC™ Assay, For High-Throughput Antimicrobial Susceptibility Testing of Biofilms, 2015, a upraveno.

TCBD musí být po celou dobu kultivace umístěn na třepače, díky jejíž pohybu vzniká mezi kolíčky a živným médiem smykové tření, které je nezbytné pro vznik ekvivalentních biofilmů na všech 96 kolíčcích. (Ceri *et al.*, 1999).



Obrázek 6: Ilustrativní průřez *The Calgary Biofilm Device*.

Převzato z MBEC™ Assay, For High-Throughput Antimicrobial Susceptibility Testing of Biofilms, 2015, a upraveno.

Vysvětlivky: a) provedení s otevřenými žlábký, b) provedení s 96 jamkami.



Obrázek 7: The Calgary Biofilm Device.

Provedení s 96 oddělenými jamkami. Převzato z MBEC™ Assay, For High-Throughput Antimicrobial Susceptibility Testing of Biofilms, 2015, a upraveno.



Obrázek 8: The Calgary Biofilm Device.

Provedení s otevřenými žlábkami. Převzato z MBEC™ Assay, For High-Throughput Antimicrobial Susceptibility Testing of Biofilms, 2015, a upraveno.

Po kultivaci je víčko s kolíčky obalenými biofilmem přeneseno na destičku, jejíž jamky obsahují testovanou antimikrobní látku. Navrhované ředění antimikrobní látky je znázorněno na Obrázku 9 (Coeney et Nelis, 2010).

Následně je víko přeneseno na destičku obsahující čerstvé médium a případné pozůstatky biofilmů jsou sonifikací uvolněny z kolíčků do média. Víko s kolíčky je odstraněno, nahrazeno standardním víkem a destička je inkubována za podmínek vhodných pro růst testovaného mikroorganismu (Innovotech Inc., 2015).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
B	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50		
C	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	SC	SC
D	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	SC	SC
E	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	SC	SC
F	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	GC	BGC
G	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	GC	BGC
H	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	GC	BGC

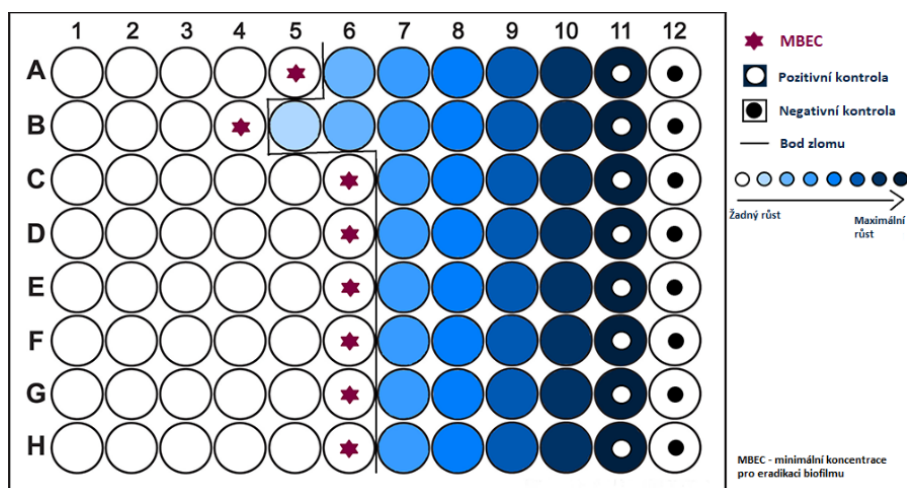
Obrázek 9: Způsob ředění testované antimikrobní látky v 96 jamkové destičce.

Převzato z MBEC™ Assay, For High-Throughput Antimicrobial Susceptibility Testing of Biofilms, 2015, a upraveno.

Vysvětlivky: **SC** – kontrola sterility, **GC** – kontrola růstu, **BGC** – kontrola růstu biofilmu.

V případě, že dojde k úplné eradikaci biofilmu, je po inkubaci mikrotitrační destičky médium v jamkách čiré. Případný zákal signalizuje obnovený buněčný růst a pak koncentrace antimikrobní látky v poslední nezakalené jamce odpovídá MBEC, tedy minimální koncentraci potřebné pro eradikaci biofilmu (Innovotech Inc., 2015).

Odpočet MBEC je znázorněn na Obrázku 10.



Obrázek 10: Znázornění odečtu minimální koncentrace pro eradikaci biofilmu.

Převzato z Anonymus, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) Assay, a upraveno.

Pozn.: Obr. 10 nekoresponduje s Obr. 9. Ředění antimikrobní látky zde probíhalo zleva doprava, zatímco na Obr. 9 shora dolů.

Pokud je cílem experimentu pouze analýza vzniklého biofilmu, jsou kolíčky z víka odříznuty a biofilmová masa zanalyzována pod mikroskopem (Coeney *et Nelis*, 2010).

7.5.2 Dynamické *in vitro* metody

7.5.2.1 Průtoková komora

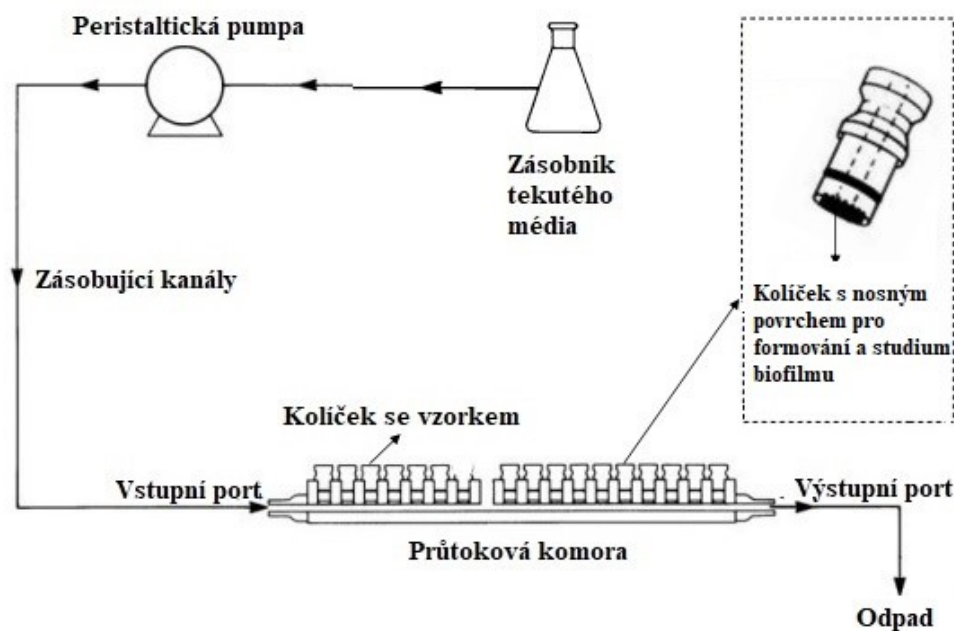
Model průtokové komory (z angl. *Flow Cell System*) je jeden z nejvyžívanějších dynamických modelů pro *in vitro* formování mikrobiálních biofilmů. Tento model vynalezl a poprvé použil Jim Robbins v 80. letech 20. století a pojmenoval ho „Robbins Device“ (McCoy *et al.*, 1981).

Toto zařízení se skládá ze zásobníku tekutého média, peristaltické pumpy, která umožňuje velice přesné dávkování média, zásobujících kanálů a průtokové komory. Průtoková komora je obdélníkového tvaru a vkládají se do ní vyjímatelné kolíčky se vzorky, na kterých následně dochází k formaci samotného biofilmu (McBain, 2009).

Schématické znázornění modelu průtokové komory lze vidět na Obrázku 11.

Peristaltická pumpa čerpá roztok (kultivační médium) ze zásobníku, následně ho řízeně přivádí přes vstupní port do průtokové komory, v níž na povrchu kolíčků ponořených pod hladinou proudící kapaliny dochází k vázání biofilm-formujících mikrobů. Po kultivaci se kolíček z komory vyjme a následně se na něm utvořený biofilm zanalyzuje (McBain, 2009).

Jednou z největších výhod modelu průtokové komory je, že za použití vhodného snímkovacího zařízení (nejčastěji konfokálního mikroskopu) lze zachycovat různé fáze formování biofilmu (například adhezi, dělení buněk, produkci EPS buňkami biofilmu) v reálném čase (Busscher *et Van Der Mei*, 1995).



Obrázek 11: Schématické znázornění modelu průtokové komory.

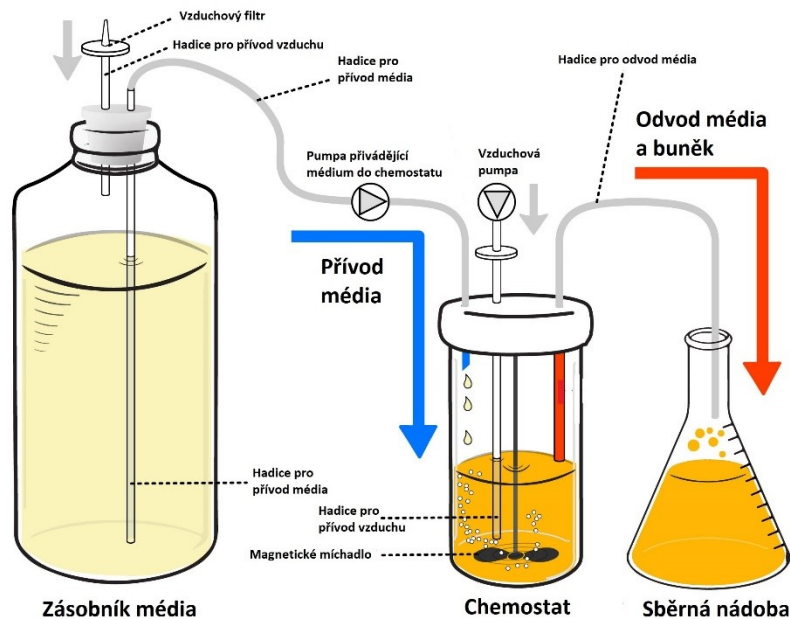
Převzato z Bailey, 2001, *Biofilms: formation, development and properties*, a upraveno.

Mimo studia jednotlivých fází formování biofilmu či testování antimikrobiálních látek lze tento model použít také k hodnocení architektury, genotypu či fenotypu biofilmu. Uppuluri *et al.* (2009) a Ramage *et al.* (2008) ve svých studiích hodnotili kvalitativní rozdíly biofilmů kvasinky *Candida albicans* zformovaných za použití jak statických, tak dynamických modelů. Uppuluri *et al.* pozorovali, že při použití modelu průtokové cely docházelo k formování komplexních trojrozměrných biofilmů se zvýšeným obsahem EPS, a Ramage *et al.* demonstroval, že dynamicky vytvořené biofilmy jsou oproti statickým až dvakrát tlustší.

7.5.2.2 Chemostat

Chemostat je druh bioreaktoru často využívaný v mikrobiologii. Všechny zde probíhající biologické a biochemické procesy jsou pečlivě sledovány a důsledně kontrolovány (Martin *et al.*, 2004).

Schématické znázornění chemostatu naleznete na Obrázku 12.



Obrázek 12: Schématické znázornění chemostatu.

Převzato z Gresham et Hong, 2014, The functional basis of adaptive evolution in chemostats, a upraveno.

Jedná se v podstatě o kultivační nádobu opatřenou otvorem pro přísun média ze zásobníku a otvorem pro odtok vyčerpaného média, buněk a jejich pozůstatků (Dykhuizen *et* Hartl, 1983).

Mikroorganismy lze v chemostatu kultivovat jak suspendovaně, tak imobilizovaně. V prvním případě se jedná o kultivaci mikroorganismů v planktonickém stavu – buňky jsou volně rozsuspendované v kultivačním médiu chemoreaktoru. Imobilizovaně, tedy přidáním tělesa z vhodného kolonizovatelného materiálu do kultivační nádoby chemostatu, k němuž následně adherují mikroorganismy, se kultivují biofilmy (Wirthlin *et al.*, 2005).

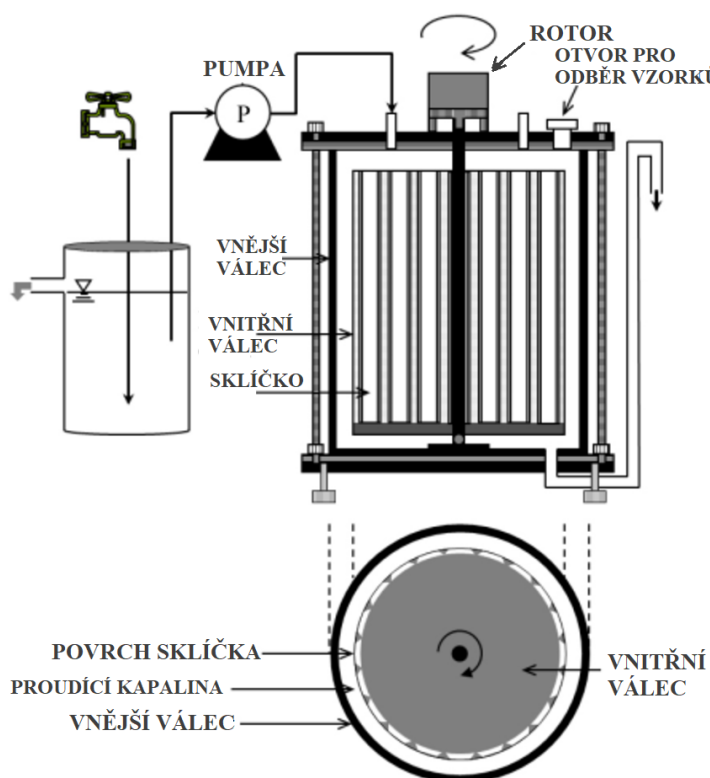
Stálý kultivační objem je v chemostatu zaručen díky kontinuálnímu přísunu čerstvého média za současného odvodu zbytkové kultivační tekutiny. Dále zde lze ovlivňovat faktory jako výši pH, tlak a teplotu (Dykhuizen *et* Hartl, 1983).

7.5.2.3 Rotační prstencový reaktor

Rotační prstencový reaktor (z angl. *Rotating Annular Reactor*) se využívá především k simulaci tvorby biofilmů přirozeně se vyskytujících ve vodním prostředí (vodovodní potrubí, říční ekosystémy, trup lodi) (Bailey, 2011).

Schématické znázornění rotačního prstencového reaktoru naleznete na Obrázku 13.

Rotační prstencový reaktor se skládá z vnějšího statického a vnitřního pohyblivého válce, který je opatřen rotorem. Mezi válce je přiváděna kapalina (například pitná voda při testování její nezávadnosti), a pohybem rotoru dochází mezi válci k proudění kapaliny simulující například průtok vody vodovodním potrubím. Na rotujícím válci jsou umístěna sklíčka, na nichž dochází k formování biofilmů. Sklíčko se poté z reaktoru odebere příslušným otvorem a vzniklý biofilm se podrobí analýze (Burne *et al.*, 2016).



Obrázek 13: Schématické znázornění rotujícího prstencového reaktoru.

Převzato z Park et al., 2015, Growth kinetics and chlorine resistance of heterotrophic bacteria isolated from young biofilms formed on a model drinking water distribution system., a upraveno.

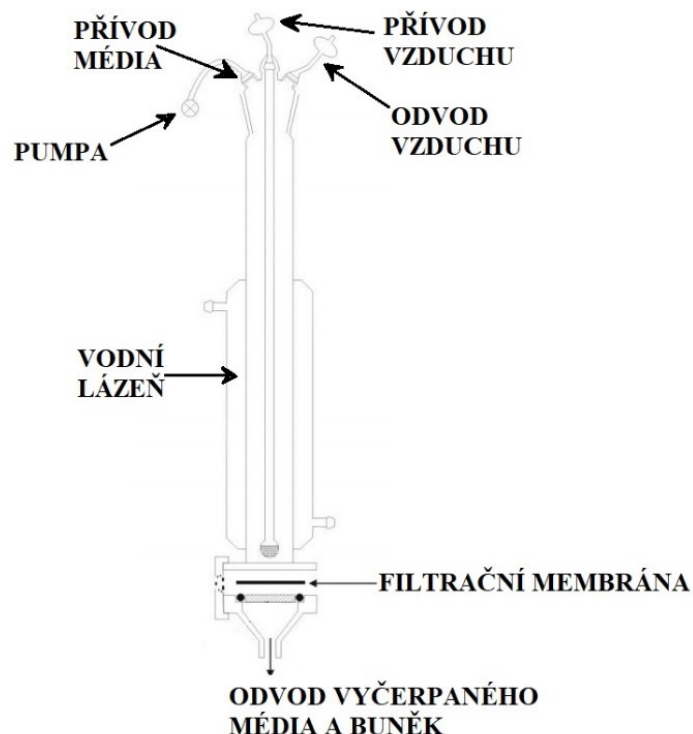
7.5.2.4 Membránový bioreaktor

V membránovém bioreaktoru (z angl. *Perfuse Biofilm Fermenter*) dochází k růstu biofilmu přímo na propustné celulózové membráně (McBain, 2009).

Teplota experimentu je regulována umístěním bioreaktoru do vodní lázně. Membrána bioreaktoru je předem inokulována mikroorganismy. Médium je kontrolovaně čerpáno pumpou a vedeno skrz membránu. Mladé či slabě adherované buňky jsou proudem média unášeny z membrány do sběrné nádoby. Filtrát ze sběrné nádoby je následně kvantifikován (McBain, 2009).

V momentě, kdy již nedochází k nárůstu počtu buněk ve filtrátu, lze o biofilmu tvrdit, že dosáhl takzvaného ustáleného stavu, což znamená, že v průběhu času nedochází k nárůstu biomasy ani k odlučování buněk (Rittmann *et* McCarty, 1980).

Schéma membránového bioreaktoru naleznete na Obrázku 14.



Obrázek 14: Schéma membránového reaktoru.

Převzato z Bailey, 2001, *Biofilms: formation, development and properties*, a upraveno.

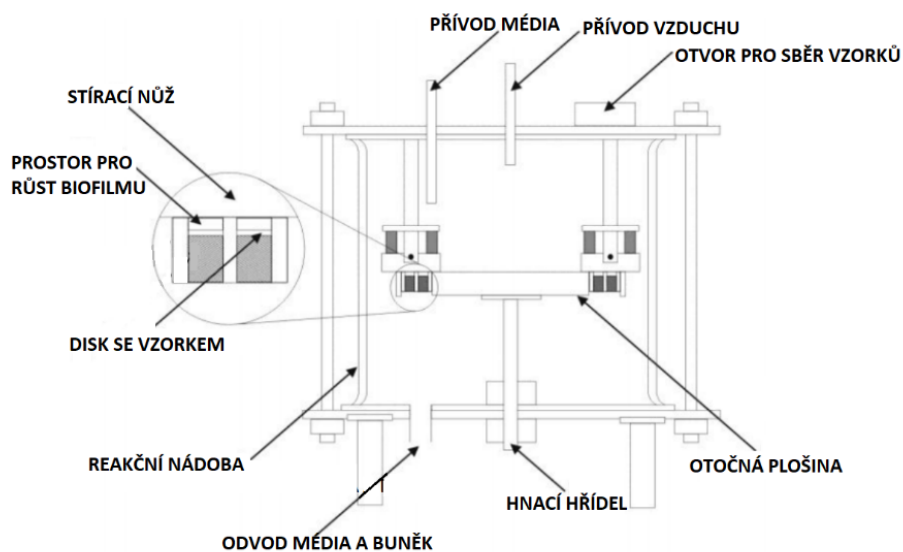
7.5.2.5 *Bioreaktor pro tvorbu biofilmu s konstantní tloušťkou*

V bioreaktoru pro tvorbu biofilmu s konstantní tloušťkou (z angl. *Constant Depth Film Fermenter*) je možnost kultivace biofilmů o předem stanovené tloušťce, jež mají sloužit k simulaci klinicky se vyskytující biofilmů (Sharma *et al.*, 2017).

Biofilmy jsou kultivovány na dně jamek, jejichž hloubka odpovídá požadované tloušťce biofilmu. Jakmile biofilm přeroste okraj jamky, je seříznut stíracím nožem a společně s vyčerpaným médiem opouští reakční nádobu (Sharma *et al.*, 2017).

Tloušťka biofilmu může být následně měřena konfokálním mikroskopem nebo optickou koherentní tomografií (Sharma *et al.*, 2017).

Schéma bioreaktoru pro tvorbu biofilmu s konstantní tloušťkou naleznete na Obrázku 15.



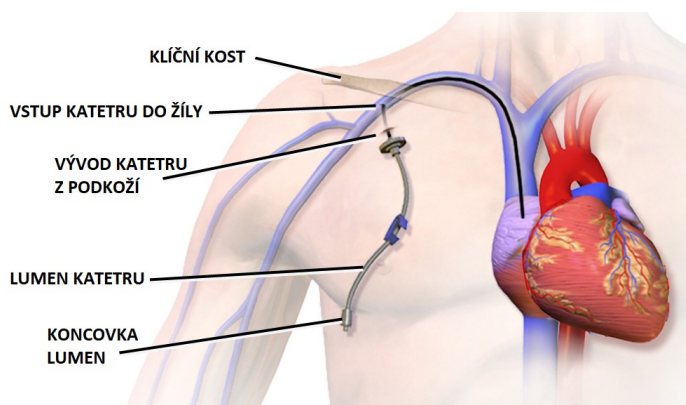
Obrázek 15: Schéma bioreaktoru pro tvorbu biofilmu s konstantní tloušťkou.
Převzato z Bailey, 2001, *Biofilms: formation, development and properties*, a upraveno.

7.5.3 *In vivo* modely s využitím obratlovců

7.5.3.1 *Modely biofilmů na centrálních žilních katetrech*

Centrální žilní katetr je polyuretanová hadička, která se pacientovi zavádí do velkých žil v případě potřeby zajištění dlouhodobého žilního vstupu. Centrálním žilním katetrem lze podávat léky nebo tekutiny, které není pacient schopen přijímat per os. Dále ho lze využít k odběru krve a k měření centrálního žilního tlaku. (Doeffinger *et al.*, 2002).

Ilustrativní snímek žilního katetru zavedeného do podklíčkové žíly naleznete na Obrázku 16.



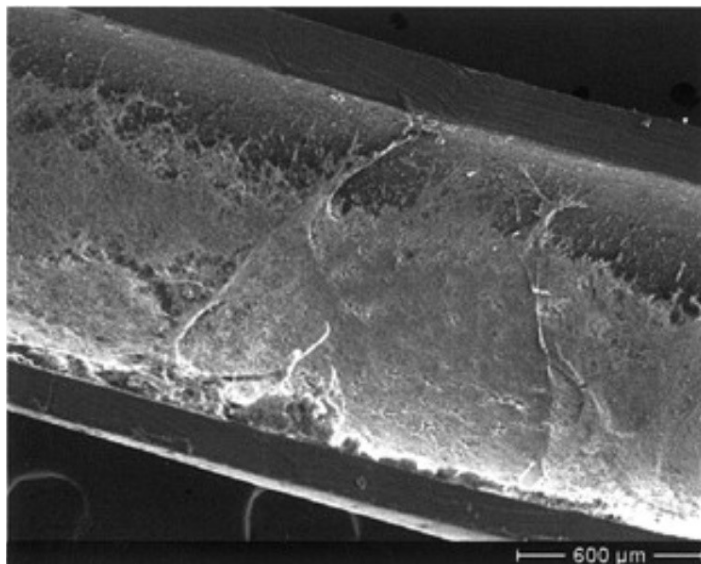
Obrázek 16: Ilustrativní snímek žilního katetru zavedeného do podklíčkové žíly.

Převzato z *Blauhausen.com*, 2014, *Medical gallery of Blausen Medical 2014*, a upraveno.

Nepřetržité proudění krve a povrch polyuretanové hadičky vytváří ideální podmínky pro formování biofilmu na povrchu katetru. Takovéto osídlení je často příčinou rekurentních infekcí s vysokou morbiditou a mortalitou (Donlan, 2008).

Prvním modelovým organismem zvoleným pro *in vivo* formování biofilmů byl potkan. Ulphani *et Rupp* (1999) zavedli do jeho vnější hrdelní žíly silikonový katetr, který následně infikovali bakterií *Staphylococcus aureus*. Tento model našel široké uplatnění při testování citlivosti biofilmů zlatého stafylokoka vůči rozličným antimikrobním látkám.

Další častý původce infekcí centrálních žilních katetrů jsou kvasinky rodu *Candida*. Obrázek 17 zachycuje biofilm zformovaný kvasinkou *Candida glabrata* v lumen katetru. (Donlan, 2008).



Obrázek 17: Lumen katetru kolonizovaný kvasinkou *Candida glabrata*.

Snímek pořízen skenovací elektronovou mikroskopií. Převzato z Nett et al., 2007, B-1,3 *Glucan as a Test for Central Venous Catheter Biofilm Infection, a upraveno.*

K modelaci kvasinkových biofilmů se nejčastěji využívají králíci a potkani. Na těchto modelech byla prozkoumána *in vivo* citlivost kvasinkových biofilmů k základním antifungálním látkám jako jsou amfotericin B a flukonazol. Kromě testování citlivosti pomohli tyto modely rozšířit znalosti o úloze specifických adhezínů při tvorbě kvasinkových biofilmů a také získat lepší obraz o změnách v genové expresi *in vivo* biofilmů v průběhu času (Coeney et Nelis, 2010).

7.5.3.2 **Modely biofilmů na podkožních implantátech**

Do podkožní kapsy modelového organismu (nejčastěji morčete, křečka, myši, králíka nebo potkana) je vložen implantát, jehož povrch následně slouží jako substrát pro růst biofilmu (Coeney et Nelis, 2010).

Jako implantáty lze použít například polyuretanové katetry, chirurgické sítky, ocelové drátky nebo různá teflonová tělíska (Coeney et Nelis, 2010).

Umístění implantátu (konkrétně nastříhaných kousků katetru) v podkožní kapse je zachyceno na Obrázku 18.

Poškození tkáně živočicha při vkládání implantátu vyvolá v místě insertu zánětlivou reakci, která může mít u méně virulentních kmenů (např. u *Candida albicans*) za následek potlačení růstu biofilmu. Tuto skutečnost lze jednoduše vyřešit nasazením imunosupresivní léčby před zavedením podkožních implantátů. (Řičicová *et al.*, 2010).



Obrázek 18: Umístění implantátu v podkožní kapse hlodavce.

Převzato z Coeney *et Nelis*, 2010, *In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation, a upraveno.*

7.6 DETEKCE BIOFILMŮ

7.6.1 Konfokální laserová skenovací mikroskopie

Konfokální laserová skenovací mikroskopie (zkr. CLSM, z angl. *Confocal Laser Scanning Microscopy*) využívá k osvětlení preparátu laserového paprsku, který přes bodovou (konfokální) clonu osvětluje zkoumaný objekt a skenuje jeho povrch (Fellers *et Davidson*, 2007).

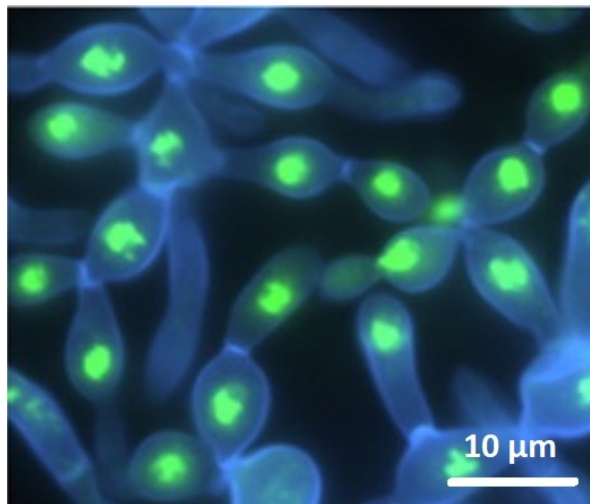
CLSM umožňuje přímé a neinvazivní pozorování živých preparátů. V různých hloubkách zkoumaného objektu zachycuje jeho dvourozměrné mikrofotografie, ze kterých lze následně sestavit trojrozměrné vizualizace (Gonçalves *et al.*, 2014).

CLSM je při studiu biofilmů s výhodou využívána právě díky své neinvazivnosti, kdy nedochází k narušení přirozené struktury biofilmu, a možnosti jeho 3D zobrazení (Ragazzi *et al.*, 2014).

Fotodetektor detekuje buďto (obdobně jako je tomu u světelného mikroskopu) světlo odražené nebo, v případě přítomnosti přírodních či přidaných fluoroforů, světlo fluorescenční. Fluorofor je molekula schopná absorbovat energii na ní dopadajícího světelného záření, které se prakticky okamžitě zbavuje v podobě záření fluorescenčního. Fluorofory se k analyzovanému vzorku přidávají za účelem zvýraznění vybraných struktur (Ragazzi *et al.*, 2014; Stockert *et Blázquez-Castro*, 2017).

Pro ilustraci lze zmínit například kalkofluorovou bělobu, což je fluorescenční barvivo, jež se váže na struktury obsahující chitin a celulózu, nebo fluorofor Sytox Green tvořící vazby s nukleovými kyselinami, tedy zvýrazňující jádro a chromozomy (Stockert *et Blázquez-Castro*, 2017).

Kombinace těchto dvou fluoroforů byla použita Waltonem (2006) při studiu kvasinky *Cryptococcus neoformans* a je zachycena na Obrázku 19.



Obrázek 19: Pseudohyfy kvasinky *Cryptococcus neoformans*.

Jádra obarvena fluoroforem Sytox Green, stěny a septa kalkofluorovou bělobou. Snímek pořízen fluorescenční mikroskopií. Převzato z Walton, 2006, Conserved Elements of the RAM Signaling Pathway Establish Cell Polarity in the Basidiomycete *Cryptococcus neoformans* in a Divergent Fashion from Other Fungi, a upraveno.

7.6.2 Kvantifikace biomasy biofilmů a mikrobů obsažených v biofilmech

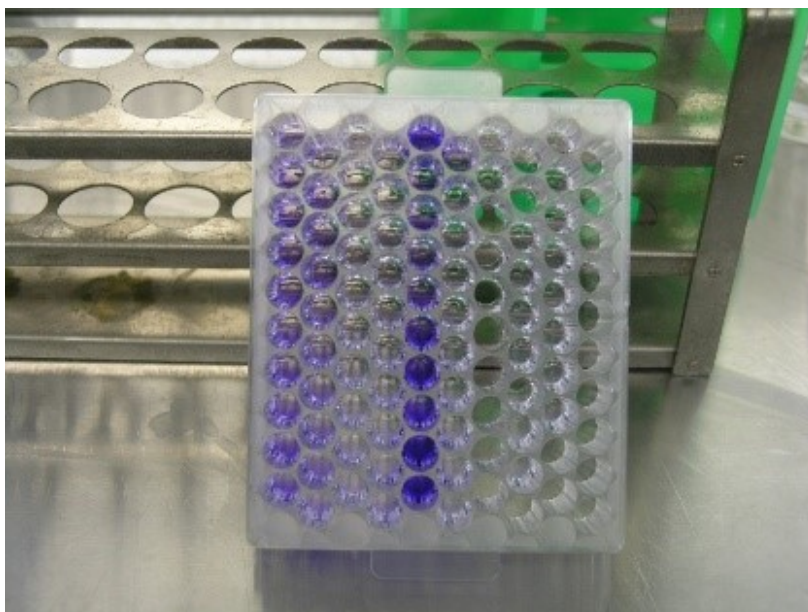
Současně dostupné metody umožňují hodnotit buďto celou biomasu (tyto metody jsou založeny na kvantifikaci matrice a všech živých i neživých buněk), pouze živé buňky (na základě jejich metabolismu) nebo pouze samotnou matici, kde se využívá barvení jejích specifických komponent (Peeters *et al.*, 2008).

7.6.2.1 Detekce celé biomasy biofilmu

7.6.2.1.1 Detekce krystalovou violetí

Barvení krystalovou violetí bylo poprvé použito v roce 1985. Tato metoda barvení prošla od té doby řadou modifikací a dnes se jedná o velice přesnou metodu s vysokou reprodukovatelností umožňující kvantifikaci celé biomasy biofilmu (Christensen *et al.*, 1985; Stepanovic *et al.*, 2000).

Krystalová violet je barvivo, které se váže k povrchu všech negativně nabitých molekul a polysacharidů v extracelulární matrici. Vzhledem k tomu, že se váže jak na živé, tak na mrtvé buňky, se nejedná o vhodný přístup při hodnocení účinnosti antimikrobních látek, kde je kýženým cílem studium ztráty viability mikroorganismů. Barvení krystalovou violetí je vhodné v případech, kdy nás zajímá celkový nárůst biomasy, což je například při hodnocení optimalizace podmínek pro růst mikroorganismů. Po vazbě krystalové violeti dochází k její následné extrakci (viz Obrázek 20), kdy je kvantifikována intenzita barvy pomocí spektrofotometrie (Li, 2003; Pitts *et al.*, 2003).



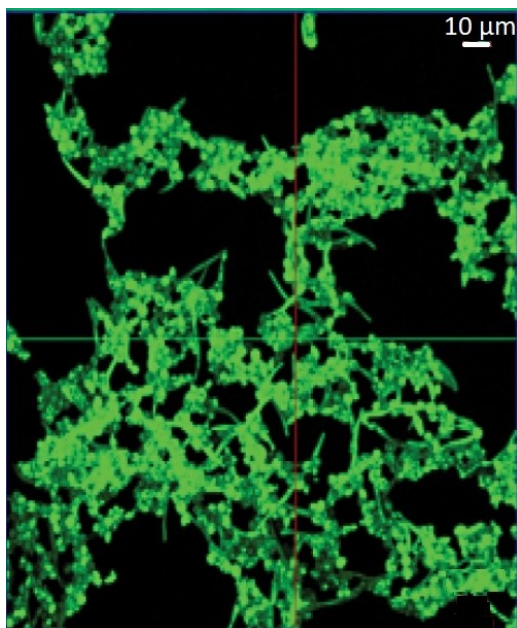
Obrázek 20: Barvení krystalovou violetí.

Poskytnuto RNDr. Klárou Konečnou, Ph.D. Krystalová violeť extrahovaná roztokem ethanolu s acetonem z fixovaných biofilmů.

7.6.2.1.2 **Syto9 esej**

Syto9 je zelené fluorogenní barvivo, které pasivně difunduje přes buněčné membrány životaschopných i mrtvých buněk a váže se na jejich DNA (deoxyribonukleová kyselina). Jelikož je volná DNA i součástí EPM, poskytuje toto barvení, stejně jako barvení krystalovou violetí, informaci o celkové biomase biofilmu (Whitchurch, 2002; Peeters *et al.*, 2008).

Snímek kvasinkového biofilmu barveného Syto9 naleznete na Obrázku 21.

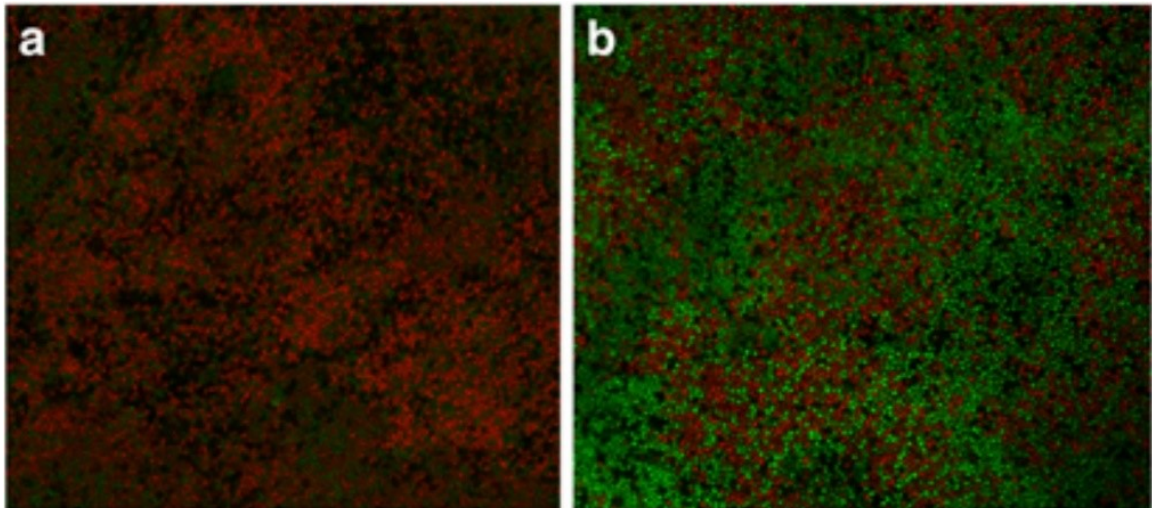


Obrázek 21: Biofilm kvasinky *Candida albicans*.

Barveno Syto9. Snímek pořízen konfokální laserovou skenovací mikroskopií. Převzato z Ranjith et al., 2018, Temporal Expression of Genes in Biofilm-Forming Ocular Candida albicans Isolated From Patients With Keratitis and Orbital Cellulitis, a upraveno.

Za účelem rozlišení živých a mrtvých buněk je barvivo Syto9 kombinováno s propidium jodidem a tato kombinace je prodávána pod komerčním názvem LIVE/DEAD™ BacLight™, jenž se používá k barvení bakterie, a LIVE/DEAD™ Yeast Viability Kit, jenž je určena pro kvasinky (Stocks, 2004).

Propidium jodid je červené fluorescentní barvivo, jež se sice také váže na DNA, dostává se však pouze do buněk s kompromitovanou cytoplazmatickou membránou. Tento kit nám tedy umožňuje rozeznat životaschopné buňky (zeleně obarvené barvivem Syto9) od červeně obarvených mrtvých buněk (viz Obrázek 22) (Boulous *et al.*, 1999).



Obrázek 22: Biofilm vytvořený bakterií *Klebsiella pneumoniae*.

Barveno LIVE/DEAD™ BacLight™. Snímek pořízen konfokální laserovou skenovací mikroskopií. Zvětšeno 60x. Převzato ze Singla et al., 2014, *Artificial Klebsiella pneumoniae biofilm model mimicking in vivo system: altered morphological characteristics and antibiotic resistance*, a upraveno.

Vysvětlivky: a) maturovaný biofilm, b) mladý biofilm.

7.6.2.2 **Kvantifikace viabilních buněk biofilmu na základě detekce metabolické aktivity**

Jednou z možností pro rozlišení mezi živými a mrtvými buňkami jsou eseje postavené na kolorimetrické detekci metabolické aktivity životaschopných buněk (Peeters et al., 2008).

7.6.2.2.1 **XTT esej**

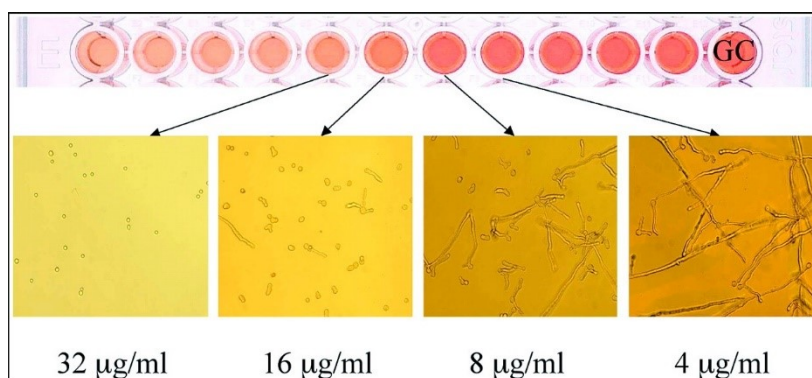
XTT je tetrazoliová sůl, chemickým názvem 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-5-[(fenylamino)karbonyl]-2H-tetrazolium hydroxid. Tato metoda je založena na redukci XTT životaschopnými buňkami na ve vodě rozpustný formazan. Absorbance supernatantu je poté přímo úměrná počtu metabolicky aktivních buněk (Peeters et al., 2008).

XTT esej je velice cenným nástrojem ke zkoumání jak volně flotujících kvasinek, tak kvasinkových biofilmů (Kuhn et al., 2003, Kuhn et al., 2002a).

Redukci XTT na formazan primárně zajišťují mitochondriální dehydrogenázy a enzymy dýchacího řetězce umístěné v cytoplazmatické membráně (McCluskey *et al.*, 2005).

Ve vodě rozpustný formazan je snadno měřitelný v buněčném supernatantu. Není tedy třeba jakkoli zasahovat do samotného biofilmu – ten zůstává netknutý. Tato esej se tedy hodí k následnému studiu struktury biofilmu, stejně tak jako k testování citlivosti biofilmů na antimikrobní látky bez narušení jeho struktury (Kuhn *et al.*, 2002a).

Antachopoulos *et al.* ve své studii testovali citlivost plísně *Mucor circinelloides* vůči vorikonazolu. Na Obrázku 23 je zachycena část mikrotitrační destičky, na níž lze pouhým okem pozorovat barevné změny v jamkách, a to od světle oranžové po tmavě červenou. S klesající koncentrací vorikonazolu (z leva doprava) přežívá více buněk, které jsou schopny metabolické aktivity, tudíž zredukuje více XTT a supernatant je tím pádem více zbarven do červena. Na přiložených mikroskopických snímcích je zároveň vidět, že nízká koncentrace vorikonazolu nezabránila klíčení konidií a došlo tedy v jejich přeměnu v hyfy (Antachopoulos *et al.*, 2006).



Obrázek 23: XTT esej.

Testování citlivosti plísně *Mucor circinelloides* vůči vorikonazolu. Snímky pořízeny světelnou mikroskopií, zvětšeno 82x. Převzato z Antachopoulos *et al.*, 2006, *Rapid Susceptibility Testing of Medically Important Zygomycetes by XTT Assay*, a upraveno.

Pozn.: GC = kontrola růstu, klesající koncentrace vorikonazolu označena popisky 32, 16, 8 a 4 µg/ml.

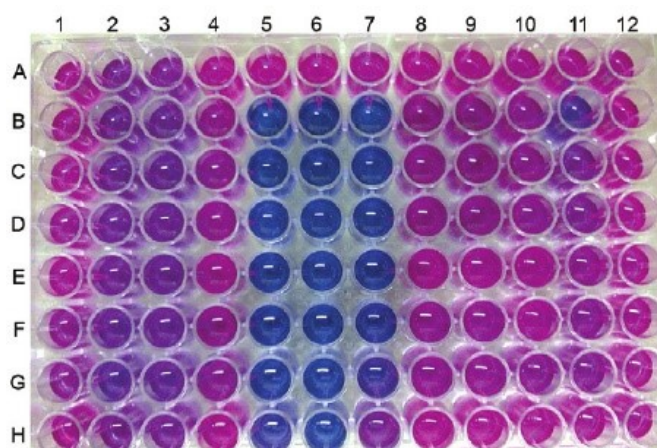
Nutno však zmínit jeden velice podstatný nedostatek. Tato esej je vhodná pouze v případech, kdy se v jamce nachází pouze jeden mikrobiální kmen. Každý kmen totiž

disponuje individuálními metabolickými schopnostmi, tedy metabolizuje XTT různě rychle, a nelze tedy říci, že závislost výše absorbance na počtu buněk je u všech kvasinek stejná. V případě testování několika kmenů v rámci jedné jamky mikrotitrační destičky by tedy docházelo k odečtu zkreslených počtů metabolicky aktivních buněk, nehledě na to, že výsledek může být ovlivněn i skutečností, že i živé buňky mohou být metabolicky inaktivní (Kuhn *et al.*, 2003).

7.6.2.2.2 *Esej s resazurinem*

Barvení resazurinem, známým též pod názvem alamarová modř (Alamar blue), je další možností kvantifikace životaschopných buněk na základě jejich metabolické aktivity. Jejím principem je redukce modrého resazurinu na růžový fluorescentní resorufin (viz Obrázek 24) (Peeters *et al.*, 2008).

Resazurin je oproti XTT méně toxický a levnější, zároveň je tato esej uživatelsky přívětivější a méně časově náročnější (Peeters *et al.*, 2008).



Obrázek 24: Esej s resazurinem.

Převzato z Coban et al., 2012, Comparative evaluation of the microplate nitrate reductase assay and the resazurin microtitre assay for the rapid detection of multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates., a upraveno.

Pozn.: Pokud je v jamce přítomen živý, metabolicky aktivní mikroorganismus, obsah jamky zrudne.

Překročili-li se však maximální délka inkubace stanovená výrobcem, může velmi snadno dojít ke zkreslení výsledků experimentu. Dlouhá inkubace totiž akceleruje

redukci růžového resorufinu na bezbarvý nefluorescentní hydro-resorufin, což se projeví snížením měřené absorbance (Pace *et Burg*, 2015).

7.6.2.2.3 **FDA esej**

Životaschopné buňky jsou též schopné přeměňovat bezbarvé nefluorescentní barvivo fluorescein diacetát (FDA) na žluté, vysoce fluorescenční barvivo pomocí nespecifických intracelulárních a extracelulárních esteráz (Peeters *et al.*, 2008).

FDA esej je metoda s vysokou reprodukovatelností a využívá se hlavně k měření celkové mikrobiální aktivity v půdě a odpadu (Peeters *et al.*, 2008; Adam a Duncan, 2001).

7.6.2.3 **Kvantifikace matrice biofilmu**

7.6.2.3.1 **DMMB esej**

Tato metoda umožňuje za použití barviva 1,9-methylmethylenové modři (DMMB) kvantifikovat pouze samotnou matici biofilmu (Peeters *et al.*, 2008).

Polysacharidy mají po vodě a mikrobiálních buňkách třetí největší podíl na chemickém složení extracelulární matrice. DMMB tvoří se sulfátovými skupinami polysacharidů nerozpustný komplex. Množství barviva uvolněné přidáním dekomplexačního roztoku odpovídá množství sulfatovaných polysacharidů obsažených v matici biofilmu (Barbosa, 2003).

Tato metoda vykazuje vysokou reprodukovatelnost, avšak nehodí se pro kvantifikaci kvasinkových biofilmů (Peeters *et al.*, 2008).

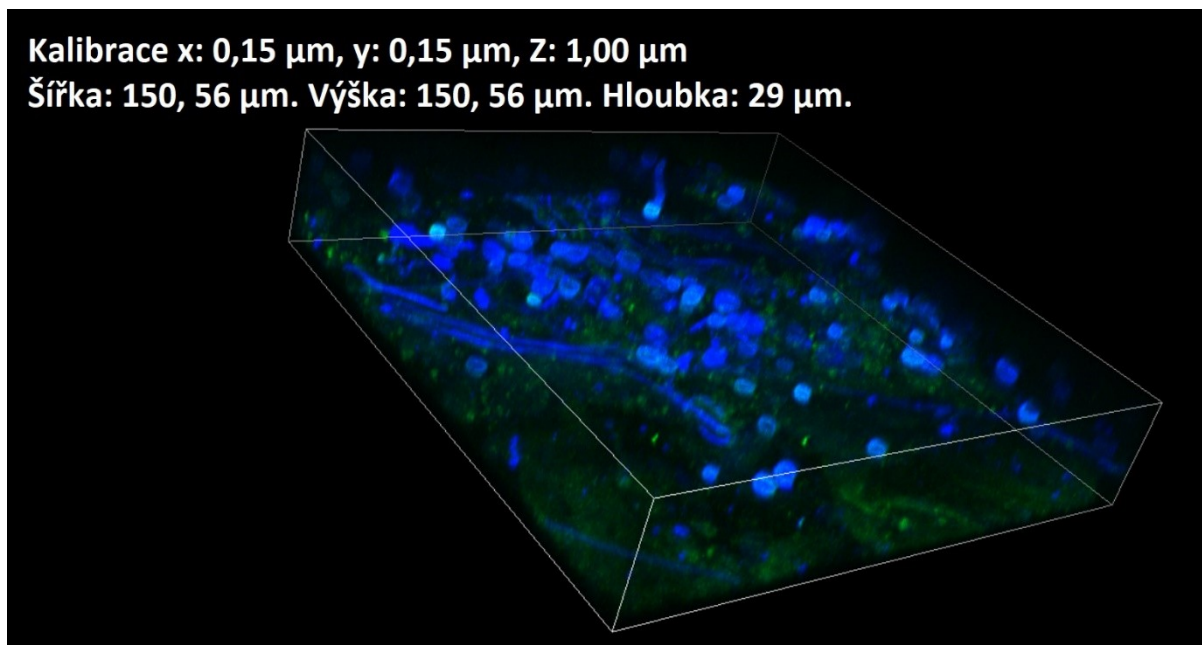
7.6.2.3.2 **Esej s využitím konjugátu Konkanavalinu A s fluorescein isothiokyanátem**

Konkanavalin A (zkr. ConA, z angl. *Concanavalin A*) je přírodní látka izolovaná ze semen subtropické rostliny *Canavalia ensiformis*. ConA patří mezi lektiny a dokáže se specificky vázat na α -D-mannosylové a α -D-glukosylové konce nejrůznějších cukrů, glykoproteinů a glykolipidů. ConA tedy lze využít ke kvantifikaci EPM, jež je z velké části tvořena polysacharidy (Coulibaly *et Youan*, 2014).

ConA není sám o sobě schopen fluorescence a ve vzorku by tedy byl obtížně detekovatelný. Konjuguje se proto s fluorofory, aby bylo množství navázaného ConA snadno kvantifikovatelné. Ke konjugaci s ConA se využívá například fluorescein isothiokyanát (zkr. FITC, z angl. *Fluorescein Isothiocyanate*) (Kania *et al.*, 2007).

FITC je derivát fluoresceinu, jehož molekula je obohacená o funkční isothiokyanátovou skupinu (-N = C = S). Jedná se o zeleně fluoreskující barvivo (Kania *et al.*, 2007).

Na Obrázku 25 je zachycen 3D snímek biofilmu zformovaného kvasinkou *Candida glabrata* na tkáňovém explantu kuřecí kůže.



Obrázek 25: Biofilm kvasinky *Candida glabrata* na tkáňovém explantu kuřecí kůže.

Barveno kalkofluorovou bělobou (kvasinkové buňky) a konjugátem konkanavalinu A s fluorescein isothiokyanátem (zelená barva, matrice biofilmu). Snímek pořízen konfokální laserovou skenovací mikroskopií. Poskytnuto RNDr. Klárou Konečnou, Ph.D.

8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1 POUŽITÝ MATERIÁL

Pomůcky:

- destička „Honeycomb“ (Oy Growth Curves Ab Ltd., Finland)
- eppendorfký (Gamedium, Česká republika)
- jednorázové očkovací kličky (Gamedium, Česká republika)
- mikropipety (Fischer Scientific s.r.o., Česká republika)
- plotny se Sabouraud agarem (připraveno paní laborantkou Ivou Dufkovou)
- polypropylenové kolíčky (Hard-Shell® PCR Plates, 96-Well Low-Profile, Semi-Skirted, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)
- sterilní mikrotitrační destičky bez víček (Gamedium, Česká republika)
- sterilní OD zkumavky (Gamedium, Česká republika)
- stojánky na zkumavky (Gamedium, Česká republika)

Přístroje:

- denzitometr DEN-1B McFarland Densitometer Biosan (dodavatel – P-LAB, Česká republika)
- iontoměnič Barnstead Smart2Pure (dodavatel – Thermo Scientific, Germany)
- kývačka MR-1 Mini Rocker-Shaker (Biosan, Litva)
- laminární box Esco Class II type A2 (dodavatel - Dynex laboratorie s.r.o., Česká republika)
- pH metr BT-675 (Boeco, Germany)
- spektrofotometr Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd., Finland)
- termostat Binder WTB (dodavatel - Fisher Scientific s.r.o., Germany)
- třepací inkubátor Heidolph Inkubator 1000 (Heidolph, Germany)
- vortex MS2 Minishaker IKA (dodavatel - P-LAB, Česká republika)

- software GraphPad Prism 7.0 (USA)

Suroviny a chemikálie:

- D-(+)-glukóza (Sigma, USA)
- Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (Becton, Dickinson and Company, USA)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Dr. Kulich Pharma s.r.o., Česká republika)
- ethanol (Penta, Česká republika)
- fetální bovinní sérum (Sigma, USA)
- chlorid vápenatý (Sigma, USA)
- krystalová violeť (P-LAB, Česká republika)
- kyselina octová (Penta, Česká republika)
- kyselina peroctová (Penta, Česká republika)
- methanol (Penta, Česká republika)
- RPMI-1640, R8758 s L-glutaminem a NaHCO₃ (Sigma, USA)
- sterilní deionizovaná voda (připravena pomocí iontoměniče Barnstead Smart2Pure)
- Soyabean Casein Digest Medium (Himedia, India)
- triethanolamin (Sigma, USA)

8.2 POUŽITÉ KMENY KVASINEK

Tabulka 3: Modelové kmeny

PRACOVNÍ OZNAČENÍ	ROD, DRUH	KÓD	POSKYTOVATEL
165-2016	<i>Candida albicans</i>	CCM 8261 ATCC 90028	Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita Brno
169-2016	<i>Candida krusei</i>	CCM 8271 ATCC 6258	Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita Brno

CCM = Czech Collection of Microorganisms (Česká sbírka mikroorganismů), ATCC = American Type Culture Collection

Tabulka 4: Klinické poševní izoláty (chronické infekce)

PRACOVNÍ OZNAČENÍ	ROD, DRUH	POSKYTOVATEL
7-2014	<i>Candida albicans</i>	Fakultní nemocnice Hradec Králové
16-2014	<i>Candida albicans</i>	Fakultní nemocnice Hradec Králové
170-2017	<i>Candida albicans</i>	Fakultní nemocnice Hradec Králové
171-2017	<i>Candida albicans</i>	Fakultní nemocnice Hradec Králové

Tabulka 5: Klinické izoláty z kanyl a katetrů

PRACOVNÍ OZNAČENÍ	ROD, DRUH	TYP IZOLÁTU	POSKYTOVATEL
69-2016	<i>Candida albicans</i>	močový katetr	Fakultní nemocnice Hradec Králové
89-2016	<i>Candida tropicalis</i>	kanyla	Fakultní nemocnice Hradec Králové
67-2016	<i>Candida albicans</i>	žilní katetr	Fakultní nemocnice Hradec Králové
88-2016	<i>Candida albicans</i>	kanyla	Fakultní nemocnice Hradec Králové

8.3 POUŽITÁ KULTIVAČNÍ MÉDIA

8.3.1 Soyabean médium

Soyabean médium je komplexní nutričně bohaté kultivační médium obsahující kaseinový hydrolyzát, papaický digest sójových bobů, chlorid sodný, hydrogenfosforečnan draselný a glukózu v koncentraci 0,25 %, tj. 2,5g v jednom litru připraveného média.

Kombinace kaseinového hydrolyzátu a papaický digest jsou zdrojem aminokyselin a peptidů s dlouhými řetězci, glukóza a hydrogenfosforečnan draselný slouží jako pufr a zdroj uhlíku zároveň. Chlorid sodný upravuje osmotický tlak v médiu.

Soyabean médium je výrobcem dodáváno jako nažloutlý sypký prášek. Připravené médium je žluté a neobsahuje žádný precipitát. Výsledné pH média při 25 °C bylo výrobcem stanoveno na $7,3 \pm 0,2$ (HiMedia Laboratories, 2015).

8.3.2 Médium RPMI-1640, R8758 s L-glutaminem a NaHCO_3

RPMI-1640 je médium složené z širokého spektra aminokyselin a vitamínů, dále obsahuje glukózu v koncentraci 0,2 %, tj. 2 g v jednom litru média a anorganické soli, z nichž hydrogenuhličitan sodný slouží jako pufr.

RPMI-1640 je výrobcem dodáváno jako hotové sterilní médium. Jedná se o čirý roztok s hodnotou pH $7,3 \pm 0,3$ (Sigma, 2016).

Pozn. Název toho média je odvozen od názvu instituce, v níž byl vyvinut – *Roswell Park Memorial Institute* (proto akronym RPMI).

8.3.3 MGM20 médium

MGM20 (minimální růstové médium, z angl. *Minimal Growth Medium*) je pracovní označení pro nutričně chudé médium připravované z komerčně vyráběného Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (zkr. YNB).

YNB obsahuje síran amonný, jež slouží jako zdroj dusíku, stopové prvky jako například bor, mangan, molybden, a anorganické soli, z nichž hydrogenuhličitan sodný

slouží jako pufr. Připravené médium MGM20 obsahuje navíc glukózu v koncentraci 2 %, tj. 20 g v jednom litru média.

YNB je výrobcem dodáván jako bílý sypký prášek. Připravené médium je bezbarvé a čiré. Výsledné pH média při 25 °C bylo výrobcem stanoveno na $5,4 \pm 0,2$ (Becton, Dickinson and Company, 2016).

8.3.4 MGM10 médium

Toto médium je analogické k médiu MGM20 s tím rozdílem, že koncentrace glukózy je pouze 1 %, tj. 10 g v jednom litru média.

Finální médium použité pro kultivaci je navíc v čas potřeby částečně suplementováno fetálním bovinním sérem (zkr. FBS). (viz Příprava kultivačních médií).

8.4 PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ

8.4.1 Soyabean médium

Pro přípravu tohoto média bylo do kádinky naváženo 30 gramů komerčně vyráběného prášku, který byl následně rozpuštěn v 1000 mililitrech destilované vody.

Obsah kádinky se během rozpouštění mírně zahříval. Tím bylo docíleno urychlení a usnadnění rozpouštění.

Následně bylo připravené médium přelito do Erlenmayerovi baňky a sterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Poté bylo uchováváno při teplotě 2-8 °C po dobu maximálně 6 týdnů.

8.4.2 MGM20 médium

Pro přípravu tohoto média bylo do kádinky naváženo 6,7 gramů YNB a 20 gramů glukózy. Navážené suroviny byly následně rozpuštěny v 1000 mililitrech destilované vody.

Obsah kádinky se během rozpouštění mírně zahříval. Tím bylo docíleno urychlení a usnadnění rozpouštění.

Následně bylo připravené médium sterilizováno filtrací přes filtrační membránu s porozitou 0,22 μm a uchováváno při teplotě 2-8 °C po dobu maximálně 6 týdnů.

8.4.3 MGM10 médium

Pro přípravu tohoto média bylo do kádinky naváženo 6,7 gramů YNB a 10 gramů glukózy. Navážené suroviny byly následně rozpuštěny v 1000 mililitrech destilované vody.

Obsah kádinky se během rozpouštění mírně zahříval. Tím bylo docíleno urychlení a usnadnění rozpouštění.

Následně bylo připravené médium sterilizováno filtrací přes filtrační membránu s porozitou 0,22 μm a uchováváno při teplotě 2-8 °C po dobu maximálně 6 týdnů.

Suplementace FBS se prováděla až v čas potřeby. Do zkumavky byly napipetovány 3 ml MGM10. Za účelem dosažení 10 % koncentrace FBS ve výsledném médiu bylo odpipetováno 0,3 ml MGM10 a objem byl zpět doplněn na 3 ml přidáním 0,3 ml FBS.

8.5 PŘÍPRAVA KALCIFIKAČNÍHO ROZTOKU

Kalcifikační roztok byl použit k potažení polypropylenových kolíčků hydroxyapatitem, který by měl dle dostupných informací potencovat vazbu kvasinek na abiotický povrch. Jamky destiček a kolíčky potažené hydroxyapatitem byly využity v rámci další studie, která ovšem není součástí této práce.

Námi připravený kalcifikační roztok o objemu 600 ml se skládal z chloridu vápenatého (koncentrace 2,5 mmol/l), dihydrogenfosforečnanu draselného (koncentrace 7,5 mmol/l) a triethanolaminu (koncentrace 250 mmol/l) a destilované vody (složení převzato od Schilling *et al.*, 1994).

Triethanolamin byl naředěn destilovanou vodou do objemu 500 ml. Poté byly přidány a rozpuštěny navážené anorganické složky (chlorid vápenatý a dihydrogenfosforečnan draselný), pH kalcifikačního roztoku bylo dotitrováno kyselinou chlorovodíkovou na pH 7,4 a roztok doplněn destilovanou vodou na výsledný objem 600 ml.

V roztoku došlo k vysrážení malého množství hydroxyapatitu, který byl odstraněn dekantací. Takto připravený zásobní roztok byl následně uchováván v lednici.

Výpočty navážek pro přípravu 600 ml roztoku:

- **chlorid vápenatý (CaCl₂):**

$$c = 2,5 \text{ mmol/l} \quad \text{tj. } 0,0025 \text{ mol v } 1000 \text{ ml}$$

$$\text{tj. } 0,00025 \text{ mol ve } 100\text{ml} \quad \text{tj. } \mathbf{0,0015 \text{ mol v } 600 \text{ ml}}$$

$$M(\text{CaCl}_2) = 110,9840 \quad n = \frac{m(\text{CaCl}_2)}{M(\text{CaCl}_2)} \quad m(\text{CaCl}_2) = n * M(\text{CaCl}_2)$$

$$m(\text{CaCl}_2) = 0,0015 * 110,9840 \quad \mathbf{m(\text{CaCl}_2) = 0,1665\text{g}}$$

- **dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄):**

$$c = 7,5 \text{ mmol/l} \quad \text{tj. } 0,0075 \text{ mol v } 1000 \text{ ml}$$

$$\text{tj. } 0,00075 \text{ mol ve } 100\text{ml} \quad \text{tj. } \mathbf{0,0045 \text{ mol v } 600 \text{ ml}}$$

$$M(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 136,0855 \quad n = \frac{m(\text{KH}_2\text{PO}_4)}{M(\text{KH}_2\text{PO}_4)} \quad m(\text{KH}_2\text{PO}_4) = n * M(\text{KH}_2\text{PO}_4)$$

$$m(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0,0045 * 136,0855 \quad \mathbf{m(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0,6124\text{g}}$$

- **triethanolamin:**

$$c = 250 \text{ mmol/l} \quad \text{tj. } 0,25 \text{ mol v } 1000 \text{ ml}$$

$$\text{tj. } 0,025 \text{ mol ve } 100\text{ml} \quad \text{tj. } \mathbf{0,15 \text{ mol v } 600 \text{ ml}}$$

$$M(\text{triethanolamin}) = 149,19 \quad n = \frac{m(\text{triethanolamin})}{M(\text{triethanolamin})}$$

$$m(\text{triethanolamin}) = n * M(\text{triethanolamin})$$

$$m(\text{triethanolamin}) = 0,15 * 149,19 \quad \mathbf{m(\text{triethanolamin}) = 22,3785\text{g}}$$

$$\rho(\text{triethanolamin}) = 1,124\text{g} * \text{ml}^{-1} \quad \rho(\text{triethanolamin}) = \frac{m(\text{triethanolamin})}{V(\text{triethanolamin})}$$

$$V(\text{triethanolamin}) = \frac{m(\text{triethanolamin})}{\rho(\text{triethanolamin})} \quad V(\text{triethanolamin}) = \frac{22,3785}{1,124}$$

$$\mathbf{V(\text{triethanolamin}) = 19,9\text{ml}}$$

8.6 METODIKA

8.6.1 Formace biofilmů na kolíčcích a v jamkách mikrotitračních destiček

Všechny použité kmeny byly kryoprezervovány v mikrozkuvkách a uchovávány při -80 °C.

Po rozmražení byly kmeny vysety z mikrozkuvek na plotny se Sabouraud agarem (zkr. SA) (Obrázek 26) a kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C maximálně po dobu 48 hodin.

Ze všech čtyř médií byly z kultur vykultivovaných na SA připraveny kvasinkové suspenze o optické densitě (OD) 1 a dle schématu na Obrázku 27 byly mikrotitrační destičky zaočkovány po 120 µl suspenze na jamku v triplikátech společně s negativní kontrolou (pouze čistá média).

Na takto naočkované destičky byly přiloženy panely s kolíčky přes noc vysterylizované pomocí kyseliny peroctové.

Mikrotitrační destičky s panely s kolíčky byly za mírného výkyvného třepání (150 rpm) kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 96 hodin.



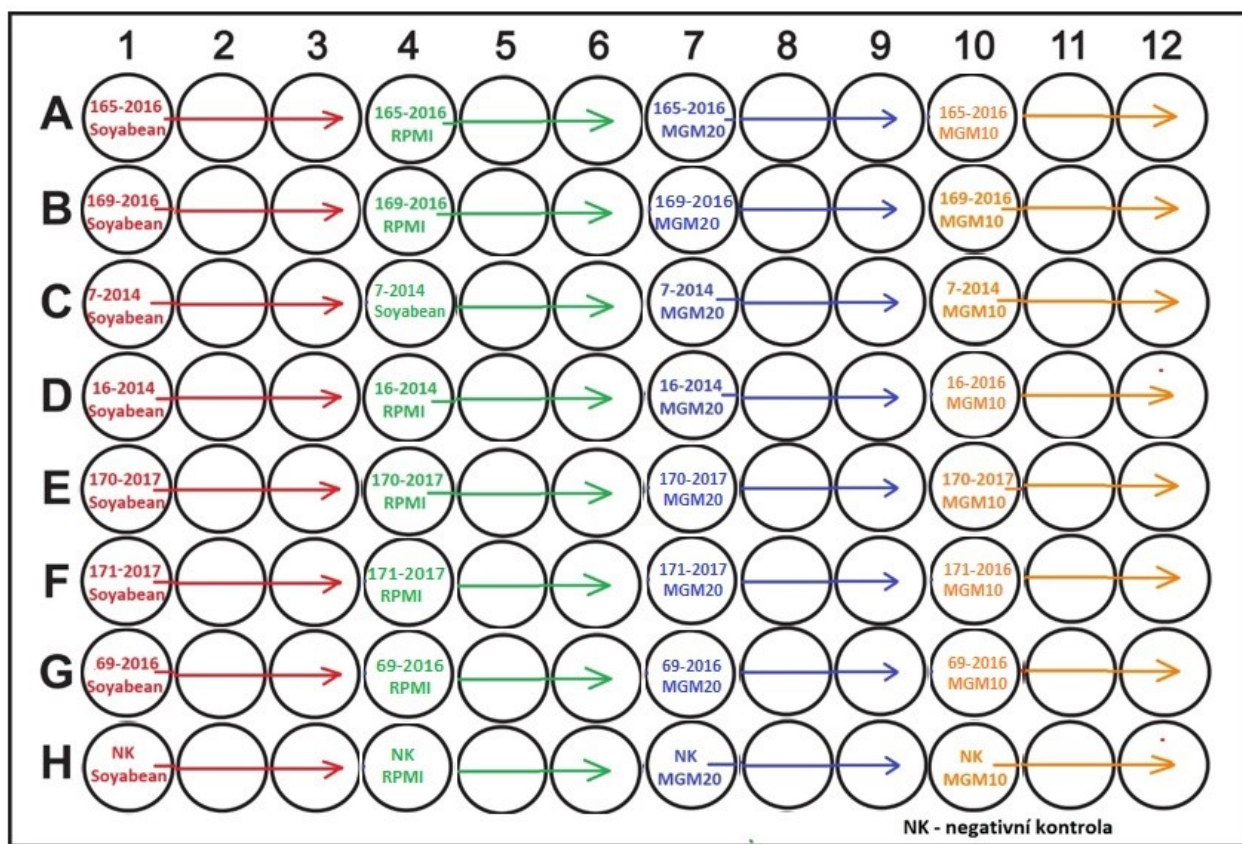
Obrázek 26: Výsev kvasinek *Candida albicans* a *Candida tropicalis* na Sabouraudově agaru.

Snímek poskytnut RNDr. Klárou Konečnou, Ph.D.

Vysvětlivky: **CDA** – *Candida albicans*, **CDTR** – *Candida tropicalis*.

Po kultivaci byly kolíčky a jamky destičky dvakrát promyty sterilní deionizovanou vodou.

Následně byla provedena fixace biofilmu na kolíčcích a v jamkách mikrotitračních destiček. Nejprve byly panely s kolíčky a mikrotitrační destičky vloženy na 10 minut do termostatu vyhřátého na 60 °C. Poté bylo do každé jamky obou mikrotitračních destiček napipetováno 150 µl methanolu. Následně byly panely s kolíčky přiloženy na mikrotitrační destičky (kolíčky byly ponořeny do methanolu) a vloženy do lednice, kde probíhala fixace po dobu dalších 15 minut.



Obrázek 27: Schéma očkování mikrotitrační destičky.

Pozn. Na jednu mikrotitrační destičku bylo naočkováno 7 kmenů ve 4 různých mediích. Zbytek kmenů bylo naočkováno na další destičku.

Mikrotitrační destička a panely s kolíčky byly poté řádně vysušeny.

Dalším krokem bylo barvení biofilmu krystalovou violetí. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 µl 0,05% roztoku krystalové violeti a následně na ně byly přiloženy panely s kolíčky. Barvení probíhalo po dobu 20 minut.

Nenavázaná krystalová violet byla následně z kolíčků a jamek odmyta sterilní deionizovanou vodou.

Posledním krokem byla extrakce krystalové violeti. Jako extrakční činidlo byl použit roztok ethanol-aceton v poměru 80:20.

Extrakce krystalové violeti z jamek mikrotitrační destičky probíhala následovně. Do jamek mikrotitračních destiček bylo napipetováno po 190 μ l extrakčního roztoku. Po 15 minutách se z každé jamky přepipetovalo 120 μ l roztoku s extrahovanou barvičkou do Honeycomb destičky, ve které se následně měřila jeho absorbance při 580 nm.

Extrakce krystalové violeti z kolíčků probíhala následovně. Panely s kolíčky byly přiloženy na mikrotitrační destičku, v jejichž jamkách bylo napipetováno po 190 μ l extrakčního činidla. Po 15 minutách byly panely s kolíčky sejmuty a z každé jamky se přepipetovalo 120 μ l roztoku s extrahovanou barvičkou do Honeycomb destičky, ve které se následně měřila jeho absorbance při vlnové délce 580 nm.

8.6.2 Hodnocení schopnosti kvasinek adherovat k povrchu

K vyhodnocení schopnost kvasinek adherovat k povrchu kolíčků a jamek destiček bylo potřeba porovnat hodnoty OD blanku (blank = čisté nezaočkované médium), jež je vypočtena jako průměr OD negativních kontrol, k němuž je přičten trojnásobek směrodatné odchylky negativní kontroly (rovnici vyjádřeno jako $OD_{\text{blank}} = \mu OD_{\text{NK}} + 3 \cdot \sigma_{\text{NK}}$, kdy μ = průměr, σ = směrodatná odchylka, NK = negativní kontrola) s OD vzorku. Kritéria pro následnou kategorizaci jednotlivých kmenů jsou uvedena na Obrázku 28.

$OD \leq OD_c$	NEADHERUJÍCÍ
$OD_c < OD \leq 2 \cdot OD_c$	SLABĚ ADHERUJÍCÍ
$2 \cdot OD_c < OD \leq 4 \cdot OD_c$	STŘEDNĚ SILNĚ ADHERUJÍCÍ
$4 \cdot OD_c < OD$	SILNĚ ADHERUJÍCÍ
OD = optická denzita vzorku	
Odc = optická denzita blanku	

Obrázek 28: Kritéria pro hodnocení míry adheze kvasinek.

Převzato ze Stepanovic et al., 2000, A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, a upraveno.

Na Obrázcích 29 a 30 je pro ilustraci uveden způsob vyhodnocování získaných dat pomocí tabulky uvedené na Obrázku 28.

KOLÍČKY												
165-2016 bez hydroxyapatitu												
Pokus 180-2017												
	soyabean			MGM20			MGM10 FBS			RPMI FBS		
	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5	Well 6	Well 7	Well 8	Well 9	Well 10	Well 11	Well 12
580 nm	0,07	0,072	0,084	0,071	0,089	0,078	0,084	0,077	0,078	0,074	0,074	0,073
OD (průměr vzorku)	0,07533			0,07933			0,07967			0,07367		
ODc (průměr blanku)	0,10333			0,07733			0,095			0,08133		
	NEADHERUJÍCÍ			SLABĚ ADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ		
Pokus 183-2017												
	soyabean			MGM20			MGM10 FBS			RPMI FBS		
	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5	Well 6	Well 7	Well 8	Well 9	Well 10	Well 11	Well 12
	0,072	0,073	0,072	0,072	0,071	0,073	0,078	0,077	0,074	0,073	0,073	0,075
OD (průměr vzorku)	0,07233			0,072			0,07633			0,07367		
ODc (průměr blanku)	0,078			0,08267			0,08433			0,07567		
	NEADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ		
	soyabean			MGM20			MGM10 FBS			RPMI FBS		
	Well 25	Well 26	Well 27	Well 28	Well 29	Well 30	Well 31	Well 32	Well 33	Well 34	Well 35	Well 36
	0,073	0,077	0,079	0,08	0,079	0,078	0,075	0,075	0,076	0,073	0,074	0,077
OD (průměr vzorku)	0,07633			0,079			0,07533			0,07467		
ODc (průměr blanku)	0,078			0,08267			0,08433			0,07567		
	NEADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ		
169-2016 bezhydroxyapatitu												
Pokus 180-2017												
	soyabean			MGM20			MGM10 FBS			RPMI FBS		
	Well 13	Well 14	Well 15	Well 16	Well 17	Well 18	Well 19	Well 20	Well 21	Well 22	Well 23	Well 24
	0,09	0,091	0,077	0,077	0,078	0,083	0,087	0,075	0,083	0,073	0,072	0,075
OD (průměr vzorku)	0,086			0,07933			0,08167			0,07333		
ODc (průměr blanku)	0,10333			0,07733			0,095			0,08133		
	NEADHERUJÍCÍ			SLABĚ ADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ		
Pokus 183-2017												
	soyabean			MGM20			MGM10 FBS			RPMI FBS		
	Well 13	Well 14	Well 15	Well 16	Well 17	Well 18	Well 19	Well 20	Well 21	Well 22	Well 23	Well 24
	0,073	0,073	0,075	0,084	0,078	0,078	0,076	0,084	0,082	0,073	0,072	0,072
OD (průměr vzorku)	0,07367			0,08			0,08067			0,07333		
ODc (průměr blanku)	0,078			0,08267			0,08433			0,07567		
	NEADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ		
Pokus 169-2017												
	soyabean			MGM20			MGM10 FBS			RPMI FBS		
	Well 61	Well 62	Well 63	Well 64	Well 65	Well 66	Well 67	Well 68	Well 69	Well 70	Well 71	Well 72
	0,101	0,077	0,088	0,082	0,074	0,084	0,077	0,076	0,074	0,076	0,073	0,075
OD (průměr vzorku)	0,08867			0,08			0,07567			0,07467		
ODc (průměr blanku)	0,078			0,08267			0,08433			0,07567		
	SLABĚ ADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ		

Obrázek 29: Ilustrace vyhodnocení a kategorizace kmenů 165-2016 (*C. albicans* ATCC 90028) a 169-2016 (*C. krusei* ATCC 6258) do skupin na základě schopnosti adherovat ke kolíčkům.

Vysvětlivky: **OD** – optická denzita vzorku, **ODc** – optická denzita blanku, **RPMI FBS** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10 FBS**- minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

165-2016 bez hydroxyapatitu												
<i>Pokus 180-2017</i>												
	soybean			MGM20			MGM10 FBS			RPMI FBS		
580 nm	Well 101	Well 102	Well 103	Well 104	Well 105	Well 106	Well 107	Well 108	Well 109	Well 110	Well 111	Well 112
	0,263	0,21	0,472	0,18	0,225	0,125	0,995	0,68	0,801	0,191	0,126	0,141
OD (průměr vzorku)	0,315			0,17667			0,82533			0,15267		
ODc (průměr blanku)	0,14467			0,12467			0,139			0,13433		
	STŘEDNĚ SILNĚ ADHERUJÍCÍ			SLABĚ ADHERUJÍCÍ			SILNĚ ADHERUJÍCÍ			SLABĚ ADHERUJÍCÍ		
<i>Pokus 183-2017</i>												
	soybean			MGM20			MGM10 FBS			RPMI FBS		
	Well 125	Well 126	Well 127	Well 128	Well 129	Well 130	Well 131	Well 132	Well 133	Well 134	Well 135	Well 136
	0,09	0,099	0,093	0,082	0,084	0,099	0,318	0,367	0,282	0,104	0,092	0,108
OD (průměr vzorku)	0,094			0,08833			0,32233			0,10133		
ODc (průměr blanku)	0,105			0,092			0,10633			0,09733		
	NEADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ			STŘEDNĚ SILNĚ ADHERUJÍCÍ			SLABĚ ADHERUJÍCÍ		
	soybean			MGM20			MGM10 FBS			RPMI FBS		
	Well 137	Well 138	Well 139	Well 140	Well 141	Well 142	Well 143	Well 144	Well 145	Well 146	Well 147	Well 148
	0,094	0,09	0,098	0,086	0,084	0,084	0,455	0,361	0,49	0,124	0,096	0,102
OD (průměr vzorku)	0,094			0,08467			0,43533			0,10733		
ODc (průměr blanku)	0,105			0,092			0,10633			0,09733		
	NEADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ			SILNĚ ADHERUJÍCÍ			SLABĚ ADHERUJÍCÍ		
169-2016 without hydroxyapatite												
<i>Pokus 180-2017</i>												
	soybean			MGM20			MGM10 FBS			RPMI FBS		
	Well 113	Well 114	Well 115	Well 116	Well 117	Well 118	Well 119	Well 120	Well 121	Well 122	Well 123	Well 124
	0,861	0,508	0,482	0,251	0,187	0,192	0,313	0,279	0,239	0,095	0,097	0,141
OD (průměr vzorku)	0,617			0,21			0,277			0,111		
ODc (průměr blanku)	0,08867			0,08633			0,09367			0,09067		
	SILNĚ ADHERUJÍCÍ			STŘEDNĚ SILNĚ ADHERUJÍCÍ			STŘEDNĚ SILNĚ ADHERUJÍCÍ			SLABĚ ADHERUJÍCÍ		
<i>Pokus 183-2017</i>												
	soybean			MGM20			MGM10 FBS			RPMI FBS		
	Well 113	Well 114	Well 115	Well 116	Well 117	Well 118	Well 119	Well 120	Well 121	Well 122	Well 123	Well 124
	0,192	0,163	0,129	0,454	0,424	0,151	0,195	0,197	0,158	0,097	0,091	0,093
OD (průměr vzorku)	0,16133			0,343			0,18333			0,09367		
ODc (průměr blanku)	0,105			0,092			0,10633			0,09733		
	SLABĚ ADHERUJÍCÍ			STŘEDNĚ SILNĚ ADHERUJÍCÍ			SLABĚ ADHERUJÍCÍ			NEADHERUJÍCÍ		
<i>Pokus 180-2017</i>												
	soybean			MGM20			MGM10 FBS			RPMI FBS		
	Well 173	Well 174	Well 175	Well 176	Well 177	Well 178	Well 179	Well 180	Well 181	Well 182	Well 183	Well 184
	0,1	0,082	0,093	0,088	0,085	0,088	0,374	0,318	0,244	0,095	0,101	0,102
OD (průměr vzorku)	0,09167			0,087			0,312			0,09933		
ODc (průměr blanku)	0,08867			0,08633			0,09367			0,09067		
	SLABĚ ADHERUJÍCÍ			SLABĚ ADHERUJÍCÍ			STŘEDNĚ SILNĚ ADHERUJÍCÍ			SLABĚ ADHERUJÍCÍ		

Obrázek 30: Ilustrace vyhodnocení a kategorizace kmenů 165-2016 (*C. albicans* ATCC 90028) a 169-2016 (*C. krusei* ATCC 6258) do skupin na základě schopnosti adherovat ke dnu a stěnám jamek mikrotitrační destičky.

Vysvětlivky: **OD** – optická denzita vzorku, **ODc** – optická denzita blanku, **RPMI FBS** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10 FBS**- minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

8.6.3 Syntéza hydroxyapatitu *in-situ* na kolíčcích

Do každé jamky 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 170 μ l kalcifikačního roztoku. Panel s kolíčky byl přiložen k mikrotitrační destičce tak, aby byly kolíčky ponořeny pod hladinu napipetovaného roztoku. Tato sestava byla následně umístěna na 1 hodinu do třepacího inkubátoru nastaveného na 65 °C. Tento proces se s každým panelem s kolíčky opakoval celkem pět krát.

Poté byl panel s kolíčky umístěn do termostatu nastaveného na 75 °C, v němž po dobu 1 hodiny docházelo k finálnímu vypékání hydroxyapatitu na kolíčky.

Nakonec se panel s kolíčky promyl destilovanou vodou a nechal se uschnout na vzduchu.

Vzhledem k časové náročnosti nebylo hodnocení schopnosti adherence na kolíčky a stěny jamek mikrotitrační destičky provedeno a není uvedeno v rámci této diplomové práce.

8.6.4 Hodnocení a výsledky

V Tabulkách 6 a 7 jsou uvedeny biofilmové fenotypy jednotlivých kmenů kvasinek ve 4 různých kultivačních médiích určených na základě hodnocení spektrofotometricky získaných dat (viz kapitola 8.6.2).

Hodnocen byl soubor dat, který vycházel z minimálně tří na sobě nezávislých pokusů, kde každé měření v rámci jednoho pokusu bylo provedeno minimálně třikrát (triplikáty).

Tabulka 6: Kategorizace biofilmových fenotypů jednotlivých kmenů dle míry adherence ke kolíčkům.

kmen	Soyabean	MGM20	MGM10 FBS	RPMI FBS		
165-2016 (<i>C. albicans</i> ATCC 90028)						
169-2016 (<i>C. krusei</i> ATCC 6258)						
7-2014 (<i>C. albicans</i> , poševní izolát)						
16-2014 (<i>C. albicans</i> , poševní izolát)						
170-2017 (<i>C. albicans</i> , poševní izolát)						
171-2014 (<i>C. albicans</i> , poševní izolát)						
69-2016 (<i>C. albicans</i> , močový katetr)						neadherující
89-2016 (<i>C. tropicalis</i> , kanyla)						slabě adherující
67-2016 (<i>C. albicans</i> , katetr)						středně silně adherující
88-2016 (<i>C. albicans</i> , kanyla)						silně adherující

Vysvětlivky: **RPMI FBS** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10 FBS** – minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

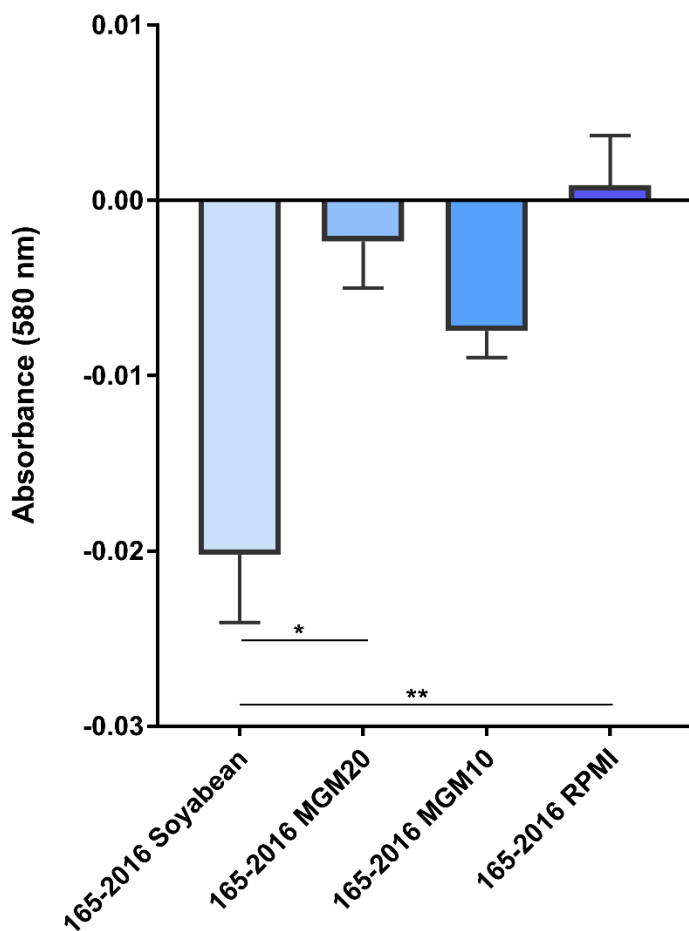
Tabulka 7: Kategorizace biofilmových fenotypů jednotlivých kmenů dle míry adherence ke dnu a stěnám mikrotitrační destičky.

kmen	Soyabean	MGM20	MGM10 FBS	RPMI FBS		
165-2016 (<i>C. albicans</i> ATCC 90028)						
169-2016 (<i>C. krusei</i> ATCC 6258)						
7-2014 (<i>C. albicans</i> , poševní izolát)						
16-2014 (<i>C. albicans</i> , poševní izolát)						
170-2017 (<i>C. albicans</i> , poševní izolát)						
171-2014 (<i>C. albicans</i> , poševní izolát)						
69-2016 (<i>C. albicans</i> , močový katetr)						neadherující
89-2016 (<i>C. tropicalis</i> , kanyla)						slabě adherující
67-2016 (<i>C. albicans</i> , katetr)						středně silně adherující
88-2016 (<i>C. albicans</i> , kanyla)						silně adherující

Vysvětlivky: **RPMI FBS** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10 FBS** – minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

Pro statistické hodnocení byl volen program GraphPad Prism 7.0 Software (USA), všechna data jsou znázorněna jako průměr standardní chyby průměru (zkr. \pm SEM, z angl. *Standard Error of the Mean*). Vícenásobná analýza dat byla provedena pomocí jednorozměrné ANOVA (pouze analýza rozptylu, z angl. *Analysis of Variance*). V případě splnění testu normálního rozdělení dat šlo o Tukeyův test, v případě nenormálního rozložení dat byl volen pro mnohonásobné porovnávání Kruskal-Wallisův test.

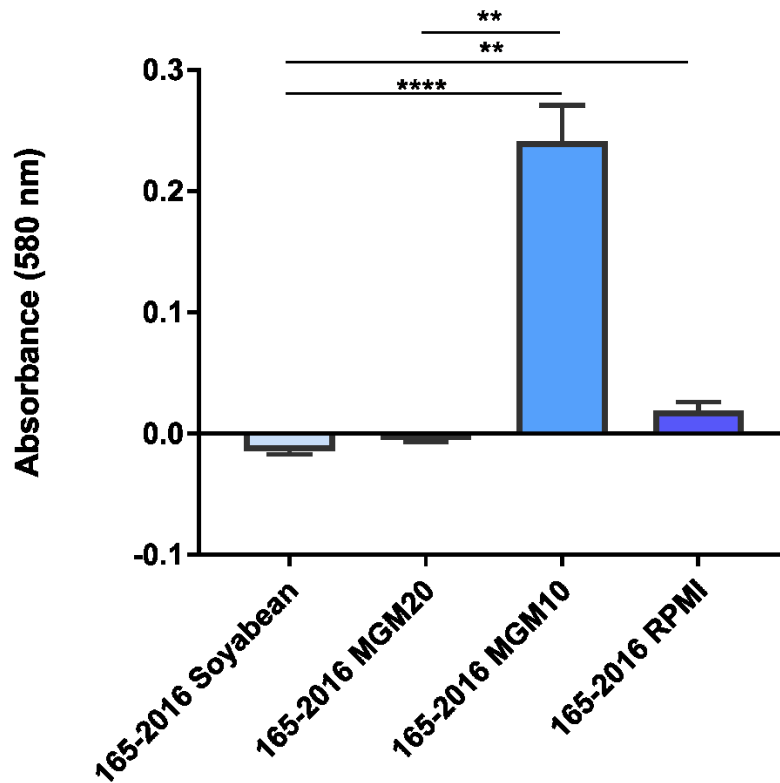
Z Grafu 1 je patrné, že v případě kmene *Candida albicans* (165-2016, ATCC 90028) obecně nedochází k adhezí na kolíčky v žádném z použitých médií.



Graf 1: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida albicans* (165-2016, ATCC 90028) adherovat na kolíčky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

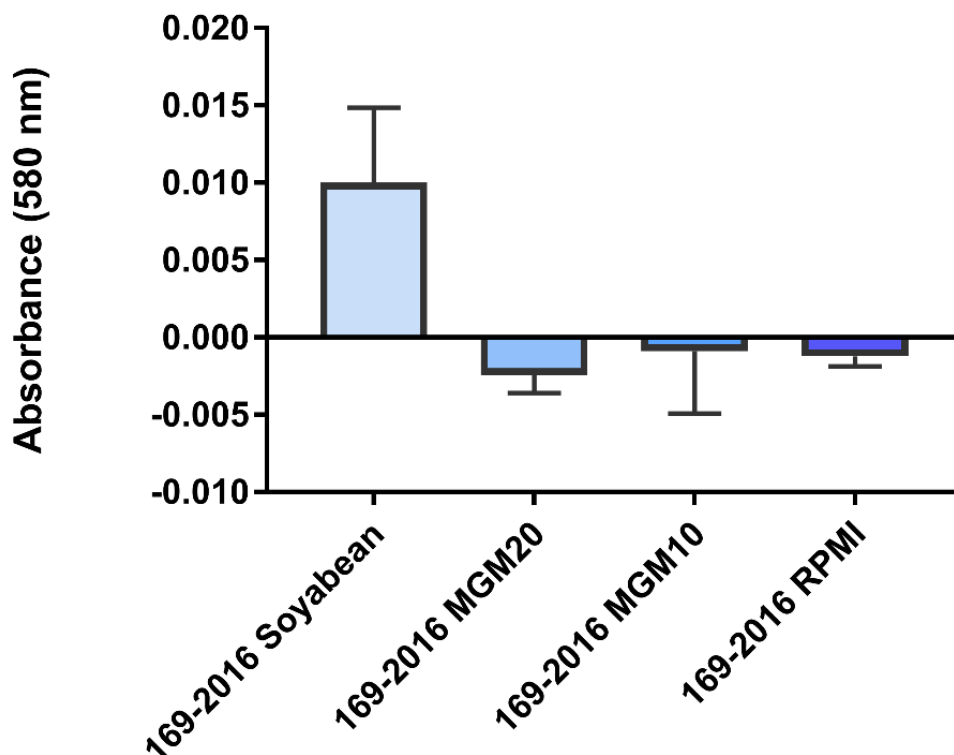
Z Grafu 2 je patrné, že v případě kmene *Candida albicans* (165-2016, ATCC 90028) obecně nedochází v případě využití kultivačního média Soyabean, MGM20 či RPMI k výrazné adhezenci na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky. Oproti tomu, v případě média MGM10, bylo statisticky prokázáno, že toto médium potencuje schopnost tohoto kmene adherovat na stěny jamek destičky.



Graf 2: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida albicans* (165-2016, ATCC 90028) adherovat na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

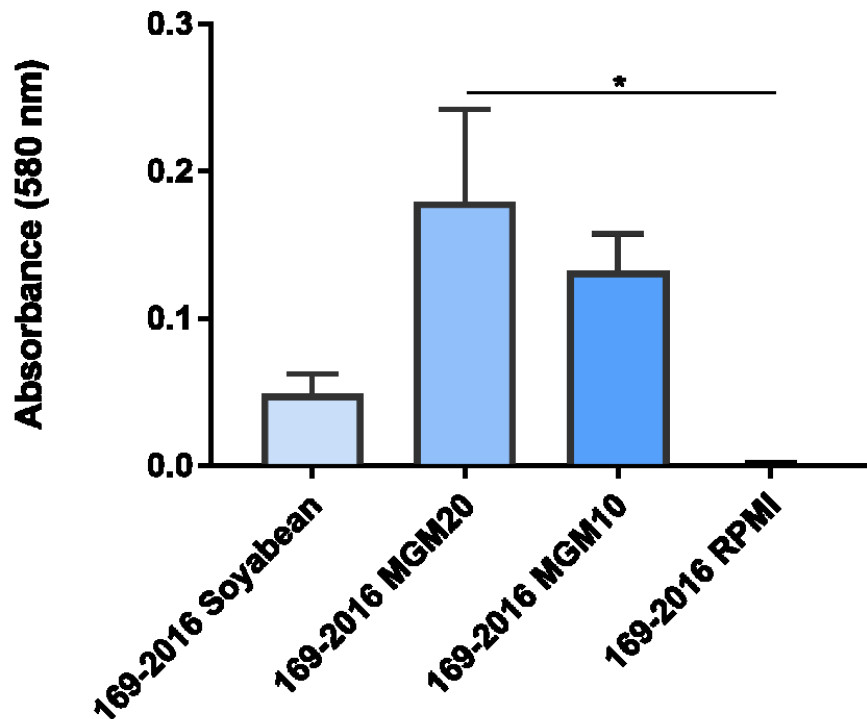
Z Grafu 3 je patrné, že v případě kmene *Candida krusei* (169-2016, ATCC 6258) obecně nedochází k výrazné adhezivnosti na kolíčky v žádném z použitých médií.



Graf 3: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida krusei* (169-2016 ATCC 6258) adherovat na kolíčky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

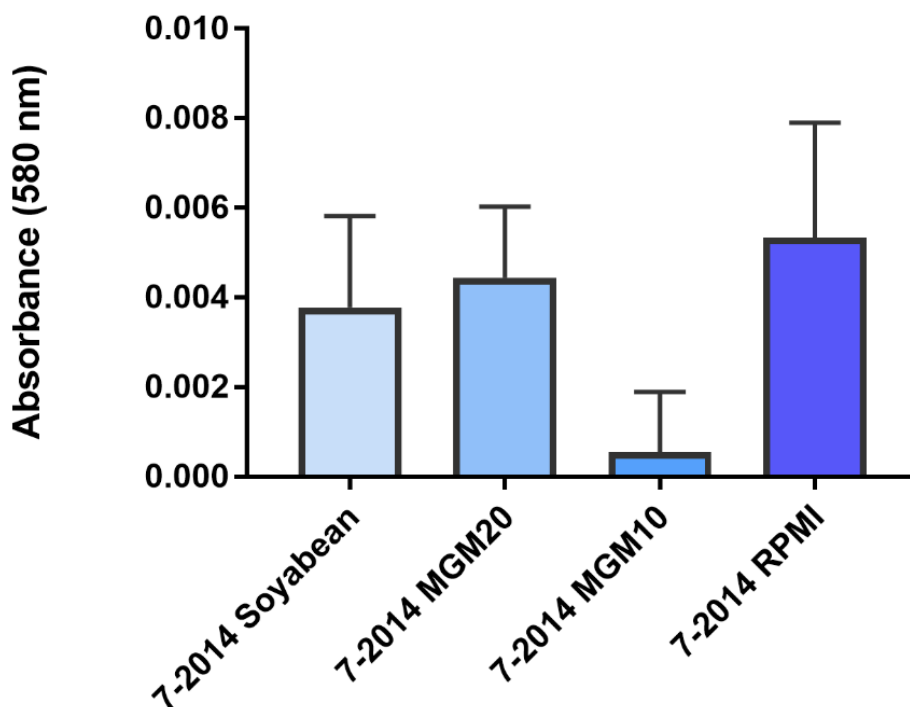
V Grafu 4 je demonstrována schopnost kmene *Candida krusei* (169-2016, ATCC 6258) adherovat na dno a stěny mikrotitrační destičky. Nejvýraznější adherenci vykazuje tento kmen v médiu MGM20. Naopak nejnižší schopnost adherence na dno a stěny mikrotitrační destičky vykazuje v médiu RPMI.



Graf 4: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida krusei* (169-2016 ATCC 6258) adherovat na dno stěny jamek mikrotitrační destičky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

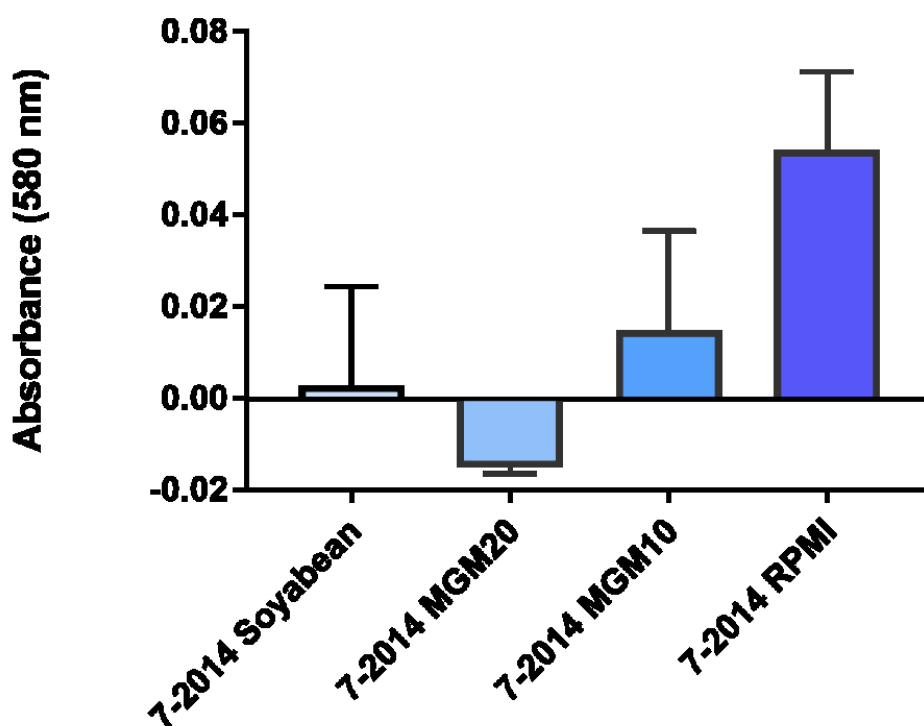
Z Grafu 5 je patrné, že v případě kmene *Candida albicans* (7-2014, poševní izolát) obecně dochází k velmi nízké adhezenci na kolíčky ve všech použitých médiích.



Graf 5: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida albicans* (7-2014, poševní izolát) adherovat na kolíčky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

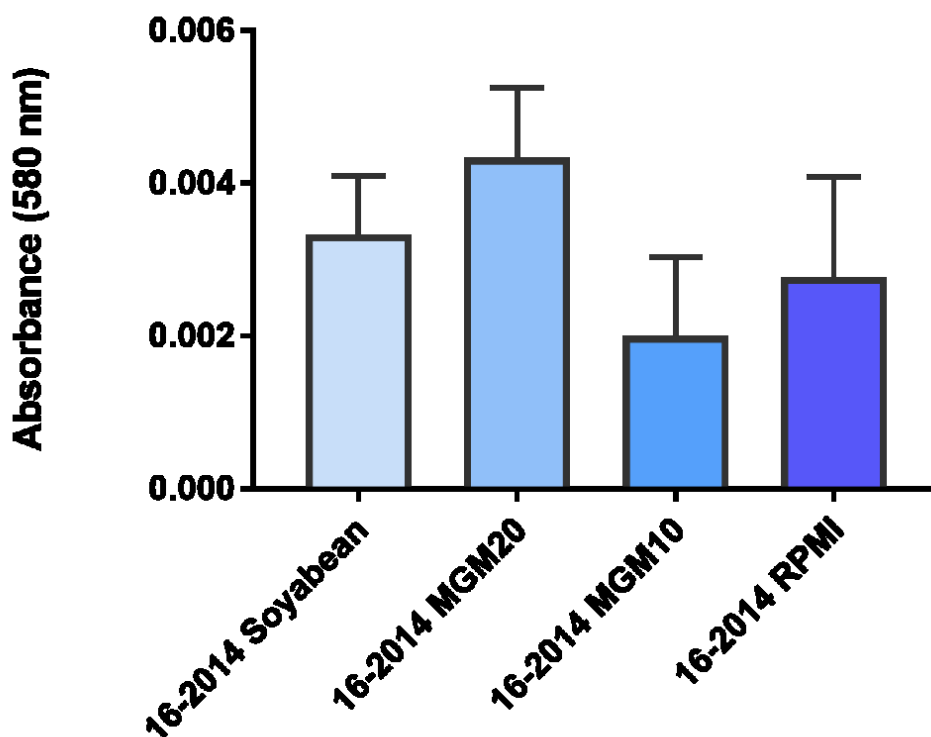
Z Grafu 6 je patrné, že v případě kmene *Candida albicans* (7-2014, poševní izolát) obecně nedochází v případě využití kultivačních médií Soyabean a MGM20 k výrazné adhezenci na dno a stěny mikrotitrační destičky. Oproti tomu, v případě médií MGM10 a RPMI, k adhezenci na stěny mikrotitrační destičky dochází (u MGM10 slabě, u RPMI středně silně), avšak ani pro jedno z těchto médií nebyla schopnost potencovat vazbu kvasinky na dno a stěny mikrotitrační destičky statisticky prokázána.



Graf 6: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida albicans* (7-2014, poševní izolát) adherovat na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

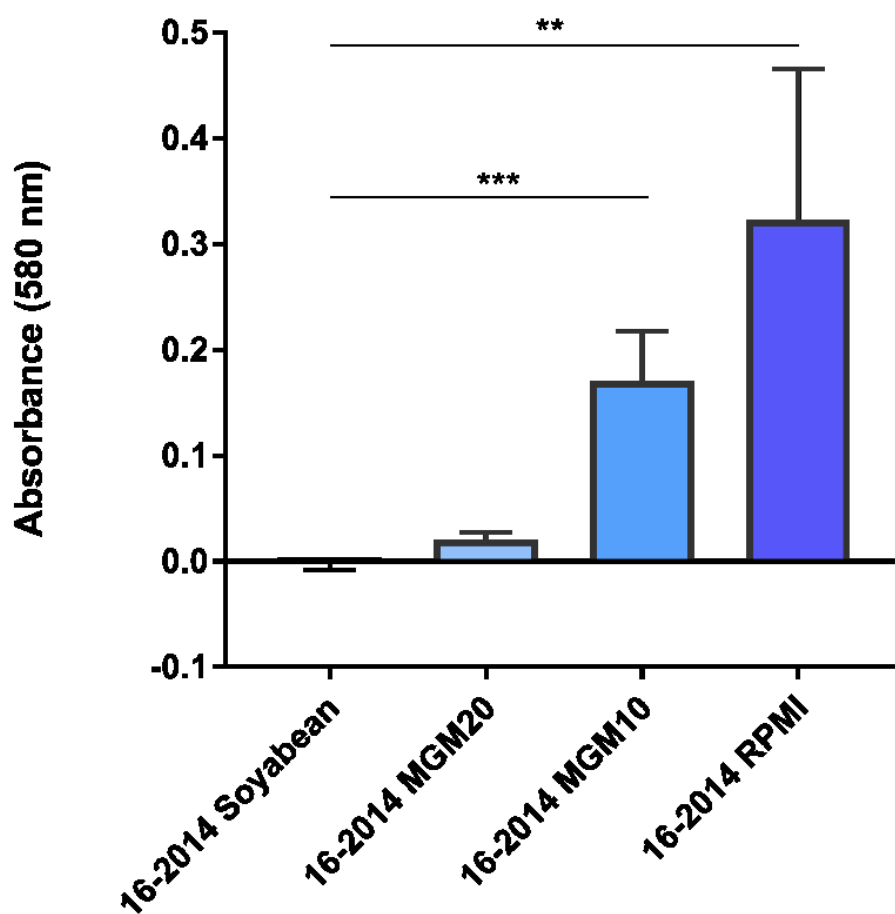
Z Grafu 7 je patrné, že v případě kmene *Candida albicans* (16-2014, poševní izolát) obecně dochází k velmi nízké adhezenci na kolíčky ve všech použitých médiích.



Graf 7: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida albicans* (16-2014, poševní izolát) adherovat na kolíčky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

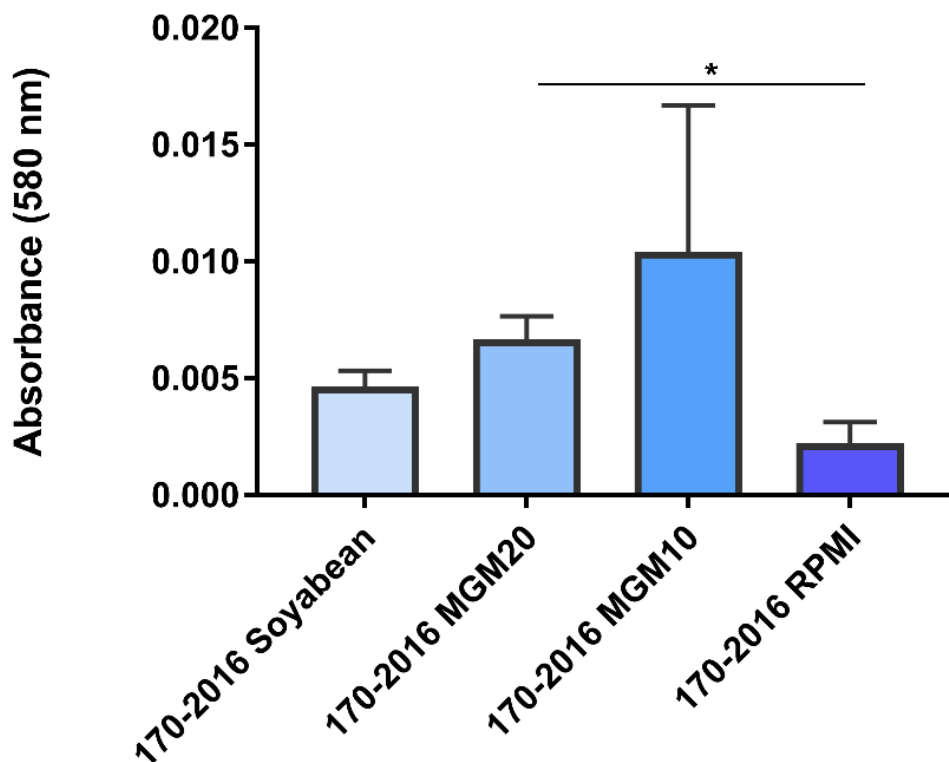
Z Grafu 8 je patrné, že v případě kmene *Candida albicans* (16-2014, poševní izolát) obecně nedochází v případě využití kultivačních médií Soyabeen a MGM20 k výrazné adhezenci na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky. Oproti tomu, v případě médií MGM10 a RPMI, bylo statisticky prokázáno, že tato média potencují schopnost tohoto kmene adherovat na dno a stěny jamek destičky.



Graf 8: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida albicans* (16-2014, poševní izolát) adherovat na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

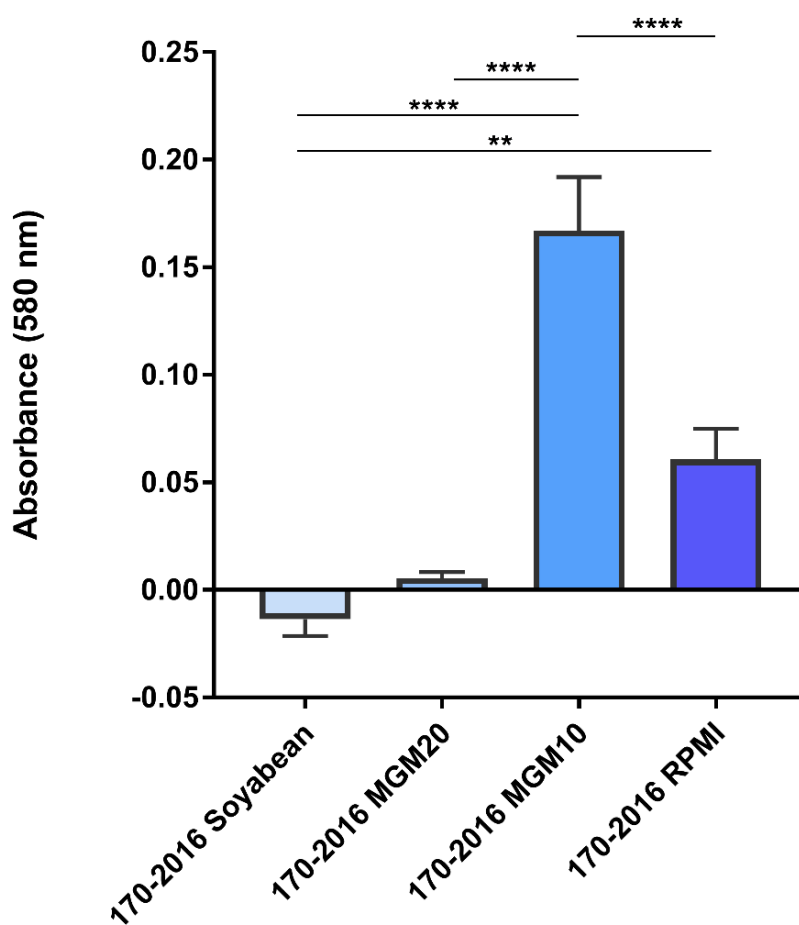
Z Grafu 9 je patrné, že v případě kmene *Candida albicans* (170-2016, poševní izolát) obecně dochází k velmi nízké adhezenci na kolíčky ve všech použitých médiích.



Graf 9: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida albicans* (170-2016, poševní izolát) adherovat na kolíčky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

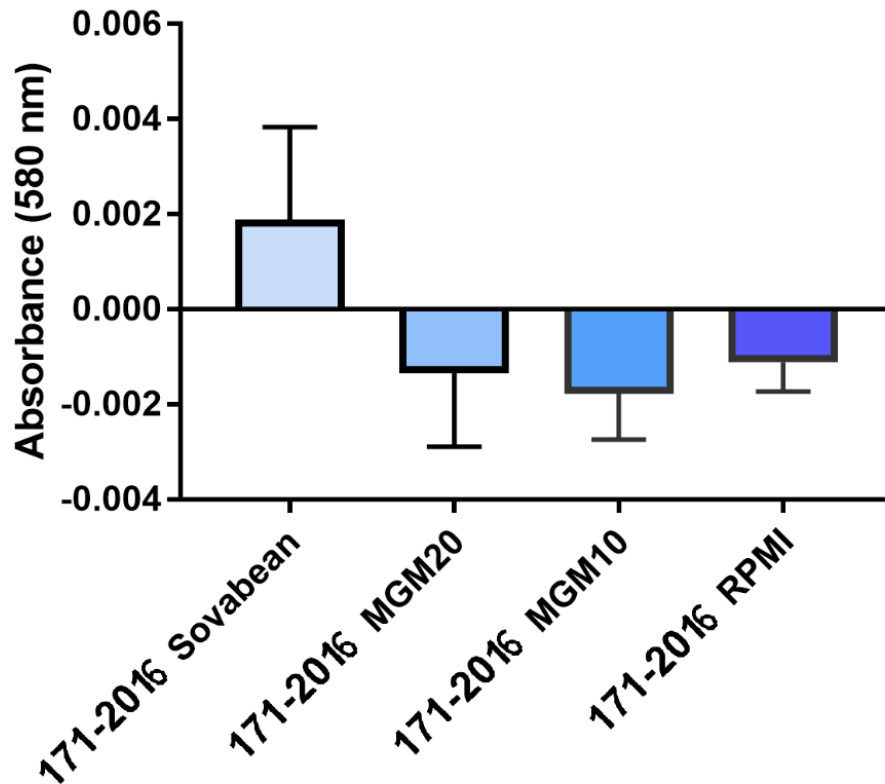
Z Grafu 10 je patrné, že v případě kmene *Candida albicans* (170-2016, poševní izolát) obecně nedochází v případě využití kultivačních médií Soyabean a MGM20 k výrazné adhezenci na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky. Naopak v médiu RPMI dochází ke slabé adhezenci a v médiu MGM10 dokonce ke středně silné adhezenci na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky a bylo prokázáno, že toto médium statisticky významně potencuje schopnost tohoto kmene adherovat na dno a stěny jamek destičky.



Graf 10: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida albicans* (170-2016, poševní izolát) adherovat na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

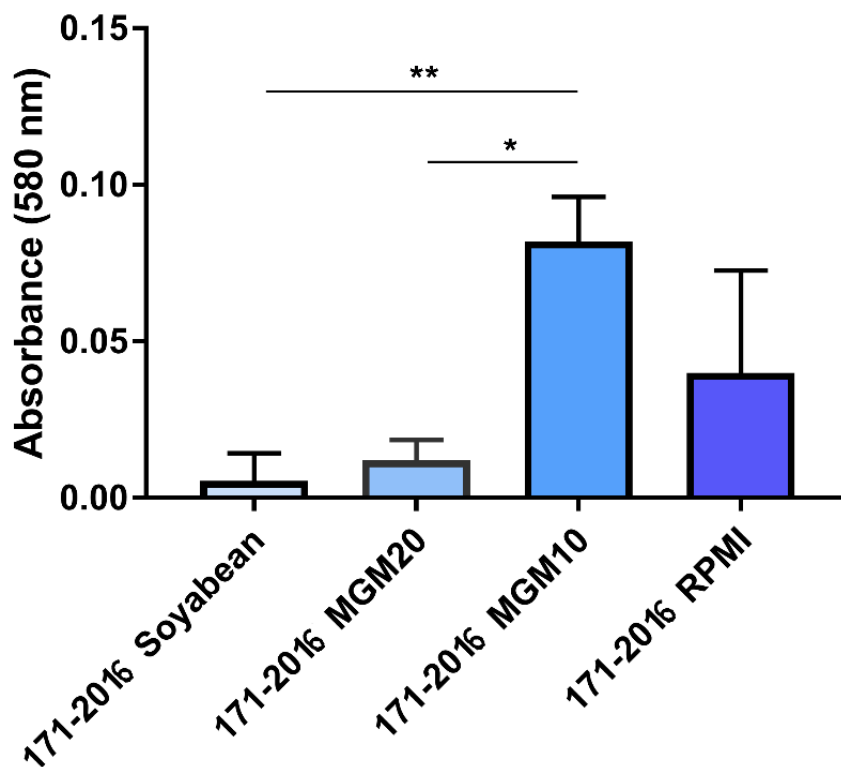
Z Grafu 11 je patrné, že v případě kmene *Candida albicans* (171-2016, poševní izolát) obecně nedochází k adhezii na kolíčky v žádném z použitých médií.



Graf 11: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida albicans* (171-2016, poševní izolát) adherovat na kolíčky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

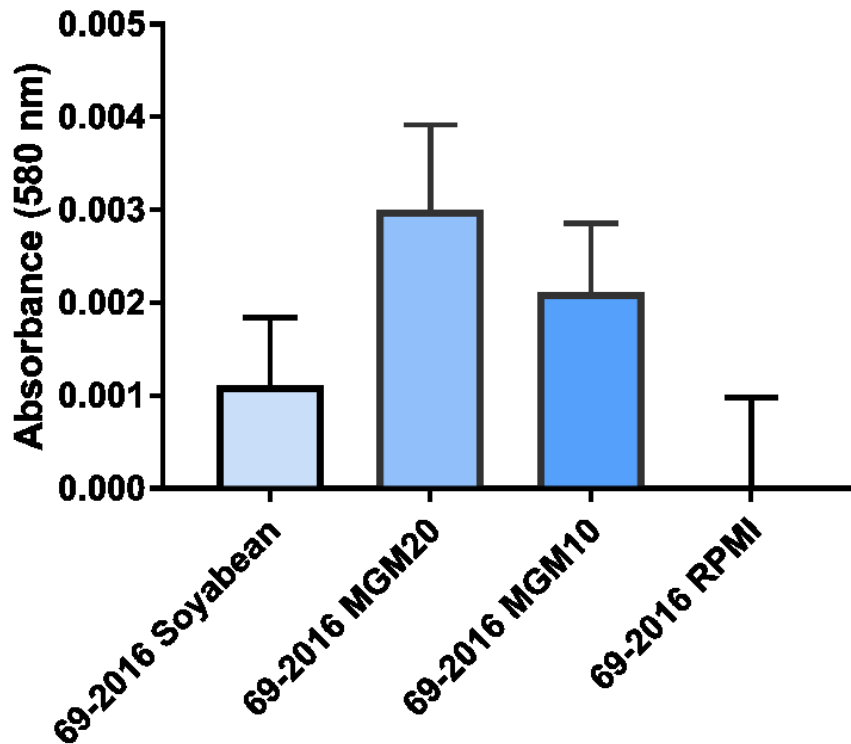
Z Grafu 12 je patrné, že v případě kmene *Candida albicans* (171-2016, poševní izolát) dochází v případě využití kultivačního média Soyabean a MGM20 k zanedbatelné či velmi slabé adhezenci na dno a stěny destičky. V médiích MGM10 a RPMI dochází ke středně silné adhezenci a v případě média MGM10 bylo dokonce statisticky prokázáno, že potencuje schopnost tohoto kmene adherovat na dno a stěny jamek destičky.



Graf 12: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida albicans* (171-2016, poševní izolát) adherovat na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

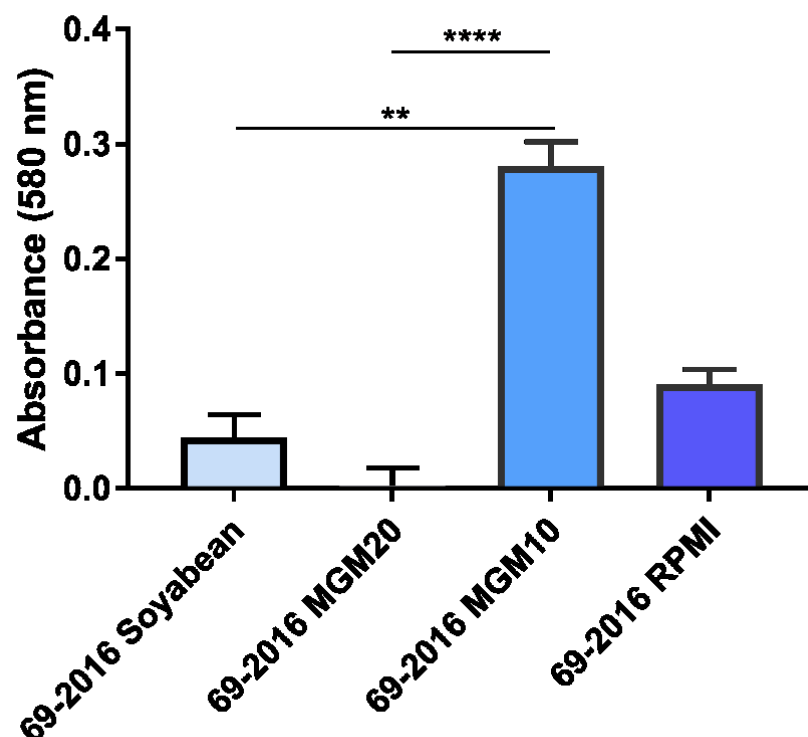
Z Grafu 13 je patrné, že v případě kmene *Candida albicans* (69-2016, klinický izolát z močového katetru) obecně dochází k velmi nízké adhezenci na kolíčky ve všech použitých médiích.



Graf 13: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida albicans* (69-2016, klinický izolát z močového katetru) adherovat na kolíčky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

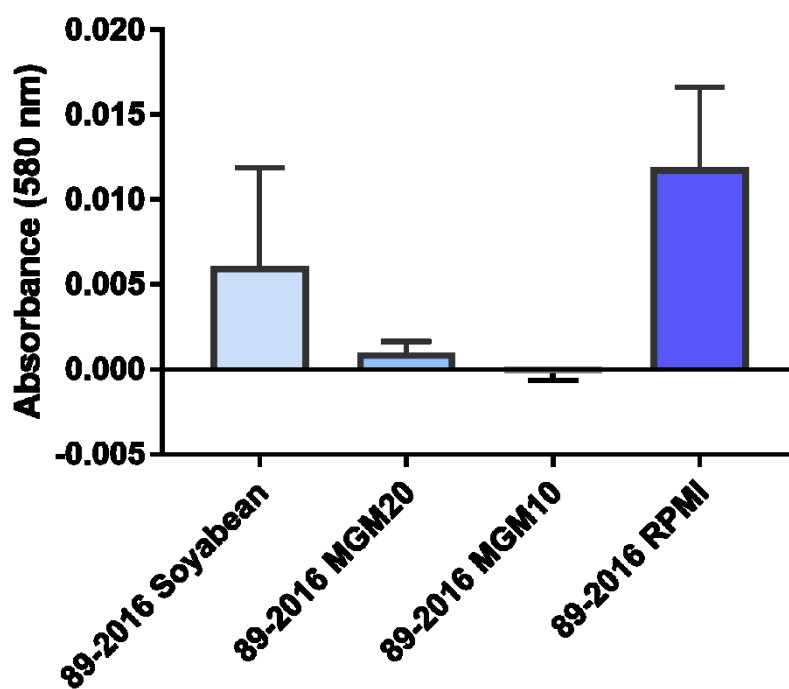
Z Grafu 14 je patrné, že v případě kmene *Candida albicans* (69-2016, klinický izolát z močového katetru) dochází v případě využití kultivačního média Soyabean a MGM20 k zanedbatelné či velmi slabé adhezenci na dno a stěny destičky. V médiích MGM10 a RPMI dochází ke středně silné adhezenci. I zde bylo statisticky prokázáno, že u tohoto kmene dochází v médiu MGM10 oproti médiím Soyabean a MGM20 k výrazně vyšší adhezenci na dno a stěny jamek destičky.



Graf 14: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida albicans* (69-2016, klinický izolát z močového katetru) adherovat na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

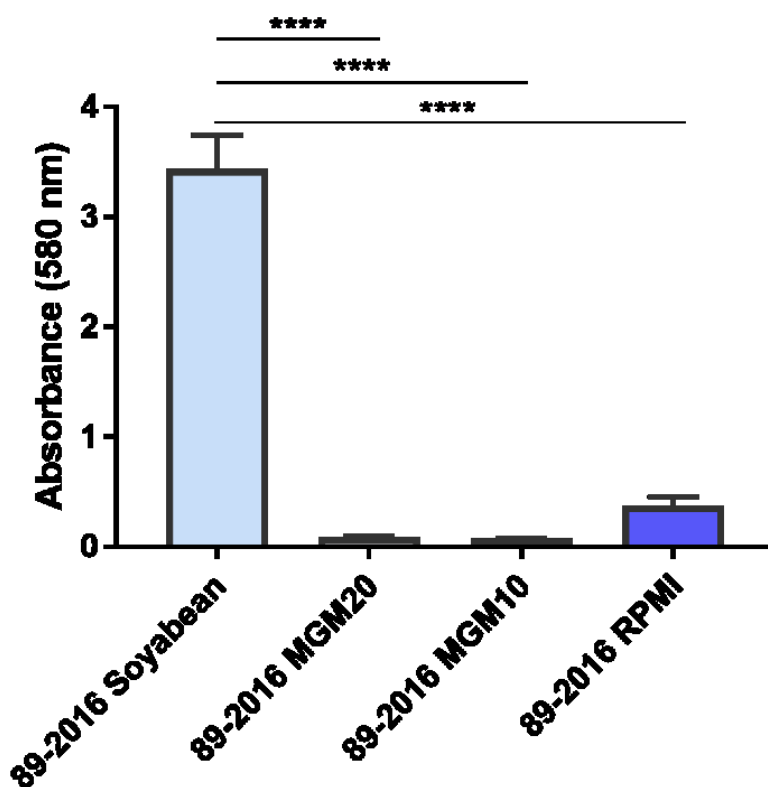
Z Grafu 15 je patrné, že v případě kmene *Candida tropicalis* (89-2016, klinický izolát z kanyly) obecně dochází k velmi nízké adhezenci na kolíčky ve všech použitých médiích. Nebyl zde statisticky prokázán žádný rozdíl ve vlivu média na adhezenci studovaného kmene, přesto lze z grafu vyčíst, že v médiu RPMI docházelo vyšší adhezenci než-li v médiu MGM10.



Graf 15: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida tropicalis* (89-2016, klinický izolát z kanyly) adherovat na kolíčky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

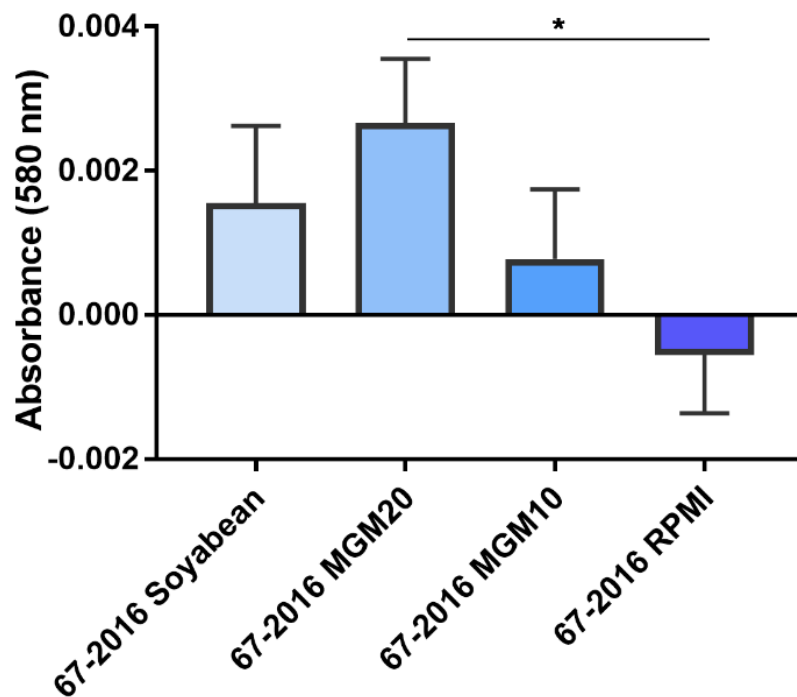
Z Grafu 16 je patrné, že v případě kmene *Candida tropicalis* (89-2016, klinický izolát z kanyly) dochází v případě využití kultivačních médií MGM20 a MGM10 ke slabé adhezenci na stěny jamek mikrotitrační destičky. Oproti tomu, v případě médií RPMI a Soyabean dochází k silné adhezenci kvasinek ke dnu a stěnám destičky. V případě média Soyabean bylo statisticky prokázáno, že oproti ostatním médiím významně potencuje schopnost tohoto kmene adherovat. Médium RPMI zřejmě též potencuje adhezenci, nejedná se však o statisticky významný rozdíl oproti ostatním médiím.



Graf 16: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida tropicalis* (89-2016, klinický izolát z kanyly) adherovat na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

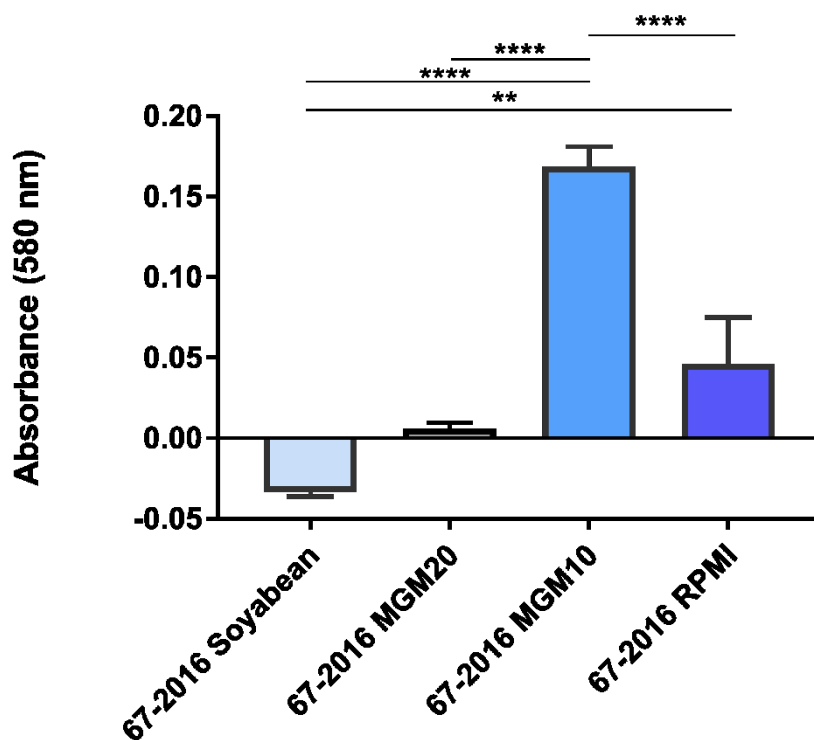
Z Grafu 17 je patrné, že v případě kmene *Candida albicans* (67-2016, klinický izolát z katetru) obecně dochází v případě použití médií MGM10 a RPMI k velmi nízké, téměř zanedbatelné adhezenci na kolíčky. V případě využití kultivačních médií Soyabean a MGM20 však dochází ke slabé adhezenci a zároveň médium MGM20 statisticky významně podporuje adhezenci tohoto kmene ve srovnání s médiem RPMI.



Graf 17: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida albicans* (67-2016, klinický izolát z katetru) adherovat na kolíčky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

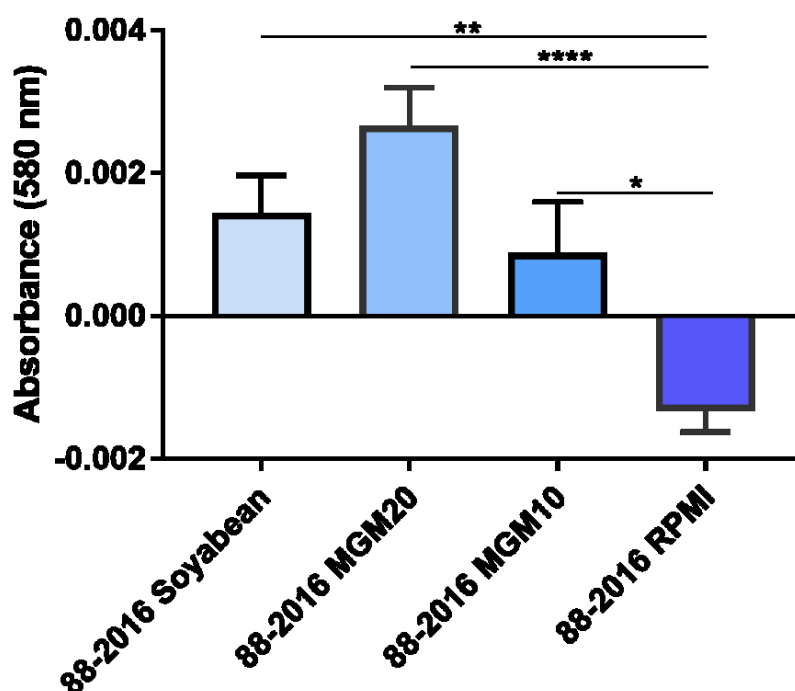
Z Grafu 18 je patrné, že výsledek překvapivě nekorresponduje s modelem stejného kmene na kolíčcích. V případě kmene *Candida albicans* (67-2016, klinický izolát z katetru) obecně nedochází v případě využití kultivačního média Soyabean a MGM20 k výrazné adherenci na stěny jamek mikrotitrační destičky. Oproti tomu, v případě média RPMI dochází ke slabé a v případě média MGM10 dokonce ke středně silné adherenci kvasinek ke dnu a stěnám destičky. U média MGM10 bylo statisticky prokázáno, že oproti ostatním médiím významně potencuje schopnost tohoto kmene adherovat a zároveň médium RPMI statisticky významně podporuje adherenci tohoto kmene ve srovnání se Soyabean médiem.



Graf 18: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida albicans* (67-2016, klinický izolát z katetru) adherovat na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

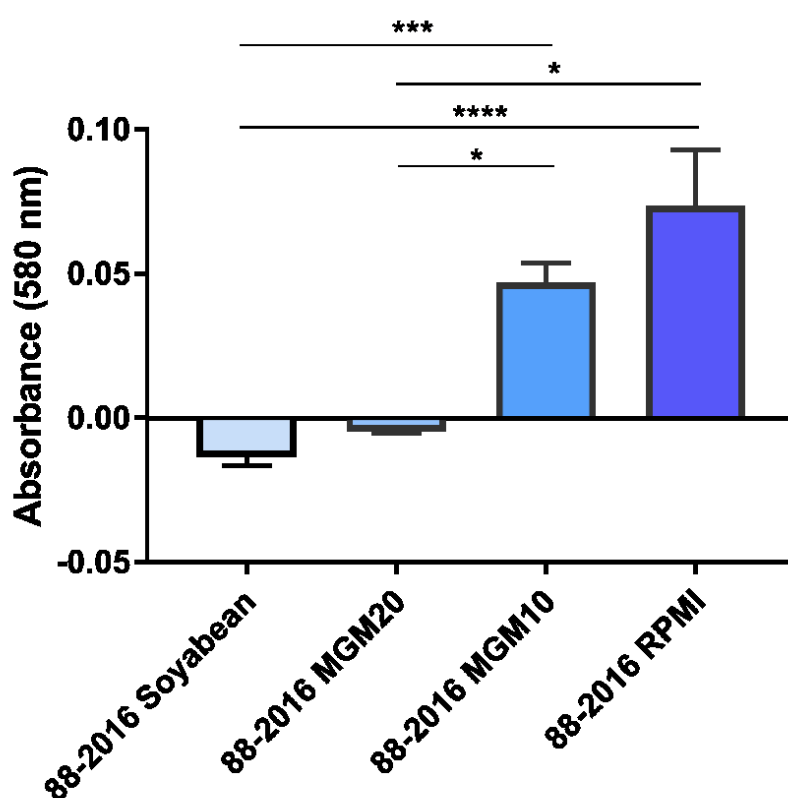
Z Grafu 19 je patrné, že v případě kmene *Candida albicans* (88-2016, klinický izolát z kanyly) dochází v případě využití kultivačních média Soyabean, MGM10 a RPMI k zanedbatelné či velmi slabé adhezenci, ale v případě média MGM20 dochází alespoň ke slabé adhezenci na kolíčky. U médií Soyabean, MGM20 a MGM10 bylo statisticky prokázáno, že ve srovnání médiem RPMI podporují adhezenci tohoto kmene na kolíčky.



Graf 19: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida albicans* (88-2016, klinický izolát z kanyly) adherovat na kolíčky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

Z Grafu 20 je patrné, že výsledek opět nekoresponduje s modelem stejného kmene na kolíčcích. V případě kmene *Candida albicans* (88-2016, klinický izolát z kanyly) dochází v případě využití kultivačních média Soyabean a MGM20 k zanedbatelné či velmi slabé adhezenci na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky. V případě médií MGM10 a RPMI dochází ke slabé adhezenci a bylo statisticky prokázáno, že tato média potencují oproti médiím Soyabean a MGM20 schopnost tohoto kmene adherovat na dno a stěny jamek destičky.



Graf 20: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky *Candida albicans* (88-2016, klinický izolát z kanyly) adherovat na stěny jamek mikrotitrační destičky.

Vysvětlivky: **RPMI** – RPMI 1640 médium, suplementováno fetálním bovinním sérem, **MGM20** – minimální růstové médium, 20% koncentrace glukózy; **MGM10** - minimální růstové médium, 10% koncentrace glukózy, suplementováno fetálním bovinním sérem.

9. DISKUSE

Cílem našeho výzkumu byla optimalizace metodiky inspirovaná *The Calgary Biofilm Device*. Tento model využívá pro formování biofilmů polystyrenových kolíčků, jejichž povrch může být upravován potahováním nejrůznějšími materiály, například celulózou či hydroxyapatitem (Innovotech Inc., 2015).

V rámci naší optimalizace byly použity kolíčky z polypropylenu, aniž by byl jejich povrch jakkoli modifikován. Z výše uvedených grafů lze vyčíst, že absorpance eluátů získaných extrakcí krystalové violeti z kolíčků, na kterých se měl formovat biofilm, tedy schopnost kvasinek rodu *Candida* adherovat k polypropylenovému povrchu a tvořit na tomto typu kolíčků biofilmy, je často velmi nízká, ne-li zanedbatelná.

Tento fakt lze vysvětlit hned několika způsoby. Je nutné si uvědomit, že kvasinky jsou, například ve srovnání s bakteriemi, relativně velké mikroorganismy. Průměr kvasinkové buňky se pohybuje zhruba kolem 10-12 μm , zatímco buňky bakteriální mají v průměru 0,2-2 μm , tedy až o dva řády méně. Kvasinkové buňky navíc oproti některým bakteriím přirozeně postrádají pohyblivé struktury (bičíky). Neochota kvasinek, jakožto těžkých a nepohyblivých mikroorganismů, adherovat ke kolíčkům a formovat na nich biofilm, je tedy zcela pochopitelná (Soifer *et al.*, 2016).

Další faktor, jež může radikálně ovlivňovat formování biofilmů, je složení kultivačního média. V našem případě však absence biofilmů na kolíčcích nebude způsobena jeho nevhodným výběrem - v jamkách mikrotitračních destiček k adherenci a formování biofilmů bez pochyb docházelo (viz Tabulka 7).

Neméně významnou roli, v našem případě nejspíše dokonce stěžejní, má struktura povrchu kolíčku. Obecně lze tvrdit, že čím víc je povrch zdrsňený, tím lépe k němu mikroorganismy adherují (Gharechami *et al.*, 2014).

Povrch polypropylenových kolíčku je tedy zřejmě příliš hladký a pravděpodobně by nebyl optimální ani pro *in vitro* kultivaci menších pohyblivých mikroorganismů.

Možností, jak zvýšit adhezi kvasinek k polypropylenovým kolíčkům, je úprava jejich povrchu podobným způsobem, jako je tomu u TCBD, tedy jejich potažením hydroxyapatitem.

Optimalizace metodiky na kolíčcích potažených hydroxyapatitem však již není předmětem této diplomové práce.

Formování biofilmu je jev kmenově specifický. V rámci jednoho druhu či rodu lze často rozlišit různě silné producenty biofilmů (Mathur *et al.*, 2006).

Pro optimalizaci metodiky jsme použili celkem 10 kmenů kvasinek rodu *Candida*. V osmi případech se jednalo o různé kmeny *C. albicans* (konkrétně 1 referenční kmen, 4 klinické poševní izoláty, 1 klinický izolát z katetru, 1 klinický izolát z žilního katetru a 1 klinický izolát z kanyly). Dále byl použit kmen *C. krusei* (referenční kmen) a kmen *C. tropicalis* (klinický izolát z kanyly).

Navzdory tomu, že ani jeden kmen neformoval biofilmy na kolíčcích, byla proměřením absorbancí eluátů získaných extrakcí krystalové violeti z jamek mikrotitračních destiček získána velice zajímavá data.

Všechny použité kmeny *C. albicans* v rámci naší optimalizace vykazovaly statisticky významně vyšší produkci biofilmů v médiích obohacených o FBS, tedy v médiích MGM10 a RPMI.

FBS zřejmě obsahuje složky, v jejichž přítomnosti je zvýšena exprese genů, jež přepínají kvasinky do filamentární podoby a podporují tak tvorbu biofilmu. Takovou schopnost, tedy přepínání kvasinky do filamentárního stylu růstu, řadíme mezi faktory virulence (Calderone *et Fonzi*, 2001).

Pozitivní vliv FBS na formování biofilmu pozorovali i Tammer *et al.* (2014), kteří zkoumali, zdali budou cévní protézy potažené stříbrem, jež vykazuje silnou antimikrobiální aktivitu, odolnější vůči kolonizaci kvasinkami a následné tvorbě biofilmu.

Při inkubování materiálu v médiu bez přídavku FBS stříbro skutečně vykazovalo silný antimikrobní efekt. Přidáním FBS však došlo k signifikantnímu podpoření růstu biofilmů (Tammer *et al.*, 2014).

Ke stejnému závěru došli i Kuhn *et al.* (2002), kteří se zabývali problematikou osidlování implantovaných zařízení rezistentními kvasinkovými biofilmy. Cílem jejich snažení bylo vyvinout co nejpřesnější fyziologický model kvasinkového biofilmu, který měl zároveň umožnit jeho detailní kvantifikaci.

Ve svém experimentu použili klinické izoláty rozličných kmenů rodu *Candida* a jako médium zvolili *Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids* obohacený o glukózu, se kterým jsme pracovali i my v rámci naší optimalizace. Jako substrát použili silikon, z něhož jsou běžně vyráběny například žilní katetry (Kuhn *et al.*, 2002b).

Kuhn *et al.* (2002b) zjistili, že suplementace kultivačního média fetálním bovinním sérem u některých kmenů významně podporuje formování biomasy biofilmu. Nechávali proto silikonové disky, na nichž následně formovali biofilmy, přes noc preinkubovat právě ve FBS. Získali tak masivnější biofilmy, jež mohly být detailněji prozkoumány.

Zatímco většina kmenů *C. albicans* evidentně profitovala z přítomnosti FBS v kultivačním médiu, u kvasinky *C. tropicalis* byla situace odlišná.

V kultivačním médiu RPMI, jež obsahovalo přídavek FBS, sice byl tento kmen zařazen do kategorie silně adherujících biofilmových fenotypů, ale vzhledem k tomu, že v kultivačním médiu MGM10, rovněž obohaceném o FBS, docházelo ke stejně silné adhezi kvasinek jako v neobohaceném médiu MGM20, nelze tvrdit, že to bylo právě FBS, které v médiu RPMI způsobilo jeho silnou adhezi ke dnu a stěnám destičky.

Použitý kmen *C. tropicalis* naopak jako jediný produkoval masivní biomasu i bez přítomnosti FBS, konkrétně v Soyabean médiu, bez kterého by ostatní použité kmeny nebyly schopny tak silné tvorby biofilmu.

Schopnost masivní produkce biofilmu z tohoto kmene tak činí vysoce virulentní kmen a s největší pravděpodobností bude jakož to nejsilnější producent biofilmu použita při optimalizaci procesu potahování kolíčků.

10. ZÁVĚR

- Pro optimalizaci metodiky bylo použito 10 kmenů kvasinek rodu *Candida* a 4 různá kultivační média.
- Mezi použitými kmeny byly jak kmeny referenční, tak klinické izoláty.
- Optimalizace metodiky inspirovaná *The Calgary Biofilm Device* probíhala na polypropylenových kolíčkách a 96 jamkových mikrotitračních destičkách.
- Na polypropylenových kolíčkách nedocházelo k tvorbě biofilmů.
- Potahování kolíčků hydroxyapatitem s největší pravděpodobností zdrsnil povrch a umožnil lepší adhezi kvasinek.
- Schopnost kvasinek formovat biofilm v jamkách byla o jeden až dva řády vyšší než na kolíčkách.
- Kvasinky kmene *Candida albicans* vykazovaly největší produkci biomasy biofilmu v médiích MGM10 a RPMI, která byla oproti zbylým dvěma médiím obohacena přísadkou FBS.
- FBS na základě statistického hodnocení prokazatelně podporovalo u většiny kvasinek kmene *Candida albicans* růst a formování biofilmu.
- Použitý kmen kvasinky *Candida tropicalis*, jež se v Soyabean médiu projevil jako velice silný producent biofilmu, bude použit pro další optimalizaci metodiky.

11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Typy polysacharidů a mikroorganismy, u nichž se vyskytují.	16
Tabulka 2: Složení extracelulární polymerní matrice.....	17
Tabulka 3: Modelové kmeny.....	47
Tabulka 4: Klinické poševní izoláty (chronické infekce).....	47
Tabulka 5: Klinické izoláty z kanyl a katetrů.....	47
Tabulka 6: Kategorizace biofilmových fenotypů jednotlivých kmenů dle míry adherence ke kolíčkům.....	58
Tabulka 7: Kategorizace biofilmových fenotypů jednotlivých kmenů dle míry adherence ke dnu a stěnám mikrotitrační destičky.....	58

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schématické znázornění struktury extracelulární polymerní matrice mikrobiálního biofilmu.	15
Obrázek 2: Pučící kvasinka <i>Candida albicans</i>	21
Obrázek 3: Pseudohyfy kvasinky <i>Candida albicans</i>	21
Obrázek 4: Pravá hyfa kvasinky <i>Candida albicans</i>	22
Obrázek 5: Kolíčky potažené hydroxyapatitem (<i>Hydroxyapatite Coated</i>) a celulózu (<i>Celulose Coated</i>).	24
Obrázek 6: Ilustrativní průřez <i>The Calgary Biofilm Device</i>	24
Obrázek 7: <i>The Calgary Biofilm Device</i>	25
Obrázek 8: <i>The Calgary Biofilm Device</i>	25
Obrázek 9: Způsob ředění testované antimikrobní látky v 96 jamkové destičce.	26
Obrázek 10: Znázornění odečtu minimální koncentrace pro eradikaci biofilmu.....	26
Obrázek 11: Schématické znázornění modelu průtokové komory.	28
Obrázek 12: Schématické znázornění chemostatu.	29
Obrázek 13: Schématické znázornění rotujícího prstencového reaktoru.....	30
Obrázek 14: Schéma membránového reaktoru.	31
Obrázek 15: Schéma bioreaktoru pro tvorbu biofilmu s konstantní tloušťkou.	32
Obrázek 16: Ilustrativní snímek žilního katetru zavedeného do podklíčkové žíly.	33
Obrázek 17: Lumen katetru kolonizovaný kvasinkou <i>Candida glabrata</i>	34
Obrázek 18: Umístění implantátu v podkožní kapse hlodavce.	35
Obrázek 19: Pseudohyfy kvasinky <i>Cryptococcus neoformans</i>	36
Obrázek 20: Barvení krystalovou violetí.	38
Obrázek 21: Biofilm kvasinky <i>Candida albicans</i>	39
Obrázek 22: Biofilm vytvořený bakterií <i>Klebsiela pneumoniae</i>	40
Obrázek 23: XTT esej.	41
Obrázek 24: Esej s resazurinem.	42
Obrázek 25: Biofilm kvasinky <i>Candida glabrata</i> na tkáňovém explantu kuřecí kůže.	44
Obrázek 26: Výsev kvasinek <i>Candida albicans</i> a <i>Candida tropicalis</i> na Sabouraudově agaru....	52
Obrázek 27: Schéma očkování mikrotitrační destičky.	53

Obrázek 28: Kritéria pro hodnocení míry adheze kvasinek.	54
Obrázek 29: Ilustrace vyhodnocení a kategorizace kmenů 165-2016 (<i>C. albicans</i> ATCC 90028) a 169-2016 (<i>C. krusei</i> ATCC 6258) do skupin na základě schopnosti adherovat ke kolíčkům.	55
Obrázek 30: Ilustrace vyhodnocení a kategorizace kmenů 165-2016 (<i>C. albicans</i> ATCC 90028) a 169-2016 (<i>C. krusei</i> ATCC 6258) do skupin na základě schopnosti adherovat ke dnu a stěnám jamek mikrotitrační destičky.....	56

13. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida albicans</i> (165-2016,)	59
Graf 2: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida albicans</i> (165-2016,)	60
Graf 3: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida krusei</i> (169-2016.....)	61
Graf 4: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida krusei</i> (169-2016.....)	62
Graf 5: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida albicans</i> (7-2014, poševní izolát) adherovat na kolíčky.	63
Graf 6: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida albicans</i> (7-2014, poševní izolát) adherovat na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky.....	64
Graf 7: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida albicans</i> (16-2014, poševní izolát) adherovat na kolíčky.	65
Graf 8: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida albicans</i> (16-2014, poševní izolát) adherovat na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky.....	66
Graf 9: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida albicans</i> (170-2016, poševní izolát) adherovat na kolíčky.	67
Graf 10: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida albicans</i> (170-2016, poševní izolát) adherovat na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky.....	68
Graf 11: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida albicans</i> (171-2016, poševní izolát) adherovat na kolíčky.	69
Graf 12: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida albicans</i> (171-2016, poševní izolát) adherovat na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky.....	70
Graf 13: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida albicans</i> (69-2016, klinický izolát z močového katetru) adherovat na kolíčky.	71
Graf 14: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida albicans</i> (69-2016, klinický izolát z močového katetru) adherovat na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky.....	72
Graf 15: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida tropicalis</i> (89-2016, klinický izolát z kanyly) adherovat na kolíčky.....	73
Graf 16: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida tropicalis</i> (89-2016, klinický izolát z kanyly) adherovat na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky.	74
Graf 17: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida albicans</i> (67-2016, klinický izolát z katetru) adherovat na kolíčky.	75
Graf 18: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida albicans</i> (67-2016, klinický izolát z katetru) adherovat na dno a stěny jamek mikrotitrační destičky.....	76
Graf 19: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida albicans</i> (88-2016, klinický izolát z kanyly) adherovat na kolíčky.....	77
Graf 20: Vliv kultivačního média na schopnost kvasinky <i>Candida albicans</i> (88-2016, klinický izolát z kanyly) adherovat na stěny jamek mikrotitrační destičky.	78

14. POUŽITÁ LITERATURA

ADAM, Gillian a Harry DUNCAN. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2001, 33(7-8), 943-951. ISSN 00380717. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071700002443>

ANONYMOUS. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) Assay. [cit. 10.3.2018], Dostupné z: <https://emerypharma.com/biology/minimum-inhibitory-concentration/>

ANTACHOPOULOS, C., J. MELETIADIS, E. ROILIDES, T. SEIN a T. J. WALSH. Rapid Susceptibility Testing of Medically Important Zygomycetes by XTT Assay. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2006, 44(2), 553-560. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.44.2.553-560.2006>

ASAHI, Yoko, Jiro MIURA, Tetsuya TSUDA, et al. Simple observation of *Streptococcus mutans* biofilm by scanning electron microscopy using ionic liquids. *AMB Express* [online]. 2015, 5(1). ISSN 2191-0855. Dostupné z: <http://www.amb-express.com/content/5/1/6>

BAILEY, William C. Biofilms: formation, development and properties,, Pavarina et al.: Chapter 3 - Dynamic Models for In Vitro Biofilm Formation. New York: Nova Science Publishers. 2011. Biotechnology in agriculture, industry and medicine series. ISBN 978-1-61728-293-5.

BARBOSA, I. Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology* [online]. 2003, 13(9), 647-653. ISSN 1460-2423. Dostupné z: <https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/cwg082>

BAYLES, Kenneth W. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2007, 5(9), 721-726. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrmicro1743>

BECTON, DICKINSON AND COMPANY. Difco™ & BBL™ Manual, 2nd Edition. 2016. Dostupné z: http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/233510.pdf

BEVERIDGE, TJ. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic and Histochemistry* [online]. 2001, 76(3), 111-118. ISSN 1052-0295. Abstrakt databáze PubMed.

BJARNSHOLT, Thomas The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS* [online]. 2013, 121, 1-58. ISSN 09034641. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/apm.12099>

BLAUHAUSEN.COM STAFF. Medical gallery of Blausen Medical. *WikiJournal of Medicine*. 2014, 1 (2): 10. ISSN 2002-4436.

BOULOS, Lina, Michèle PRÉVOST, Benoit BARBEAU, Josée COALLIER a Raymond DESJARDINS. LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 1999, 37(1), 77. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701299000482>

BURNE, Robert A., Yi-Ywan M. CHEN a Jana E.C. PENDERS. Analysis of Gene Expression in *Streptococcus Mutans* in Biofilms in Vitro. *Advances in Dental Research* [online]. 2016, 11(1), 100-109. ISSN 0895-9374. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/08959374970110010101>

CALDERONE, Richard A a William A FONZI. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* [online]. 2001, 9(7), 327-335. ISSN 0966842X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X01020947>

CERI H., OLSON M.E., STREMIK C., READ R.R., MORCK D., BURET A. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, 37(6):1771-1776. PMID: PMC84946.

COBAN, Ahmet Yilmaz, Meltem UZUN, Alper AKGUNES a Belma DURUPINAR. Comparative evaluation of the microplate nitrate reductase assay and the rezasurin microtitre assay for the rapid detection of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online]. 2012, 107(5), 578-581. ISSN 0074-0276.

COBAN, Ahmet Yilmaz, Aydin DEVECI, Ahmet Tevfik SUNTER, Juan Carlos PALOMINO a Anandi MARTIN. Resazurin microtiter assay for isoniazid, rifampicin, ethambutol and streptomycin resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: Updated meta-analysis. *International Journal of Mycobacteriology* [online]. 2014, 3(4), 230. ISSN 22125531.

COENYE, Tom a Hans J. NELIS. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2010, 83(2), 89-105. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701210002848>

CONRAD, Arnaud, Merja KONTRO, Minna M. KEINÄNEN, Aurore CADORET, Pierre FAURE, Laurence MANSUY-HUAULT a Jean-Claude BLOCK. Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids* [online]. 2003, 38(10), 1093-1105. ISSN 0024-4201. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11745-006-1165-y>

COSTERTON, J. W., G. G. GEESEY a K.-J. CHENG. How Bacteria Stick. *Scientific American* [online]. 1978, 238(1), 86-95. ISSN 0036-8733. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/scientificamerican0178-86>

COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI Z, DEBEER D, CALDWELL D, KORBER D, JAMES G. Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*. 1994;176(8):2137-2142. PMID: PMC205331

COULIBALY, Fohona S. a Bi-Botti C. YOUAN. Concanavalin A–Polysaccharides binding affinity analysis using a quartz crystal microbalance. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2014, 59, 404-411. ISSN 09565663. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566314002218>

CUNNINGHAM Alfred B., John E. LENNOX, Rockford J. ROSS. What are key characteristics of biofilms., 2001 [cit 18. 2. 2018]. Dostupné z: <https://www.cs.montana.edu/webworks/projects/biofilmbook/contents/chapters/chapter001/section004/green/page001.html>

DOEFFINGER, Joachim a Franz JESCH, et al. *Intensivmedizinisches Notizbuch*. 4. vydání. Wiesbaden : Abbott GMBH, 2002. ISBN 3-926035-35-8.

DONLAN, R. M. Biofilms on Central Venous Catheters: Is Eradication Possible?. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2008. ISBN 978-3-540-75417-6. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-75418-3_7

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases* Volume 7, Issue 2. 2001, Pages 277-281. PMID: PMC2631701.

DONLAN, R. M. a J. W. COSTERTON. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2002, 15(2), 167-193. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>

DONLAN, Rodney M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2002, 8(9), 881-890. ISSN 1080-6040. Dostupné z: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/9/02-0063_article.htm

DOUGLAS, L. Julia. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology* [online]. 2003, 11(1), 30-36. ISSN 0966842x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X02000021>

DUNNE, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2002, 15(2), 155-166. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002>

DYKHUIZEN D. E., HARTL D.L. Selection in chemostats. *Microbiological Reviews*. 1983, 47(2):150-168. PMID: PMC281569

FELLERS T.J., DAVIDSON M.W. Introduction to Confocal Microscopy. Olympus Fluoview Resource Center. National High Magnetic Field Laboratory. Retrieved 2007-07-25.

FLEMMING, H.-C., WINGENDER J., GRIEGBE, Mayer C. Physico-chemical properties of biofilms. In: Evans LV, editor. *Biofilms: recent advances in their study and control*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. 2000, 19–34.

FLEMMING, Hans-Curt a Jost WINGENDER. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2010, 8(9), 623-633. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrmicro2415>

GHARECHAHI, Maryam, Horieh MOOSAVI a Maryam FORGHANI. Effect of Surface Roughness and Materials Composition. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* [online]. 2012, 03(04), 541-546. ISSN 2158-7027. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/jbnb.2012.324056>

GONÇALVES, Letícia M., Altair A. DEL BEL CURY, Andréa A. DE VASCONCELLOS, Jaime A. CURY a Wander J. DA SILVA. Confocal analysis of the exopolysaccharide matrix of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* [online]. 2015, 6(3), 179-185. ISSN 20411618. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jicd.12093>

GRESHAM, David, Jungeui HONG. The functional basis of adaptive evolution in chemostats. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2014. ISSN 01686445. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/1574-6976.12082>

HALL-STOODLEY, Luanne a Paul STOODLEY. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. Trends in Microbiology [online]. 2005, 13(1), 7-10. ISSN 0966842X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X04002586>

HEERSINK D., GOERES D. Reactor design considerations M. Hamilton, J. Heersink, K. Buckingham-Meyer, D. Goeres (Eds.). The Biofilm Laboratory: Step-by-step Protocols for Experimental Design, Analysis, and Data Interpretation. Cytergy Publishing. 2003, 13-15. ISBN 0974180203.

HENRICI A.T. Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. Journal of Bacteriology. 1933, 25(3): 277-287.

HiMedia Laboratories. Soyabean Casein Digest Medium (Tryptone Soya Broth). 2015. Dostupné z: <http://himedialabs.com/TD/M011.pdf>

HUSSAIN, Muzaffar, M.H. WILCOX a P.J. WHITE. The slime of coagulase-negative staphylococci: Biochemistry and relation to adherence. FEMS Microbiology Letters [online]. 1993, 104(3-4), 191-208. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1993.tb05867.x>

CHANDRA, J., D. M. KUHN, P. K. MUKHERJEE, L. L. HOYER, T. MCCORMICK a M. A. GHANNOUM. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. Journal of Bacteriology [online]. 2001, 183(18), 5385-5394. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001>

CHRISTENSEN G.D., SIMPSON W.A., YOUNGER J.J., BADDOUR L.M., BARRETT F.F., MELTON D.M., BEACHEY E.H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J. Clin. Microbiol. 1985, 22, 996-1006.

INNOVOTECH INC. MBEC™ Assay, For High-Throughput Antimicrobial Susceptibility Testing of Biofilms. PROCEDURAL MANUAL. 2015. Dostupné z: <http://www.innovotech.ca/documents/MBEC-Procedural-Manual-v1.1.pdf>

KANIA, Romain E., Gerda E. M. LAMERS, Marcel J. VONK, Patrice Tran Ba HUY, Pieter S. HIEMSTRA, Guido V. BLOEMBERG a Jan J. GROTE. Demonstration of Bacterial Cells and Glycocalyx in Biofilms on Human Tonsils. Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery [online]. 2007, 133(2). ISSN 0886-4470. Dostupné z: <http://archotol.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archotol.133.2.115>

KOSTAKIOTI, M., M. HADJIFRANGISKOU a S. J. HULTGREN. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine [online]. 2013, 3(4). ISSN 2157-1422. Dostupné z: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a010306>

KROM, Bastiaan P., Kevin BUIJSSEN, Henk J. BUSSCHER a Henny C. VAN DER MEI. *Candida* Biofilm Analysis in the Artificial Throat Using FISH. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-58829-760-0. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-151-6_6

KUHN, D. M., T. GEORGE, J. CHANDRA, P. K. MUKHERJEE a M. A. GHANNOUM. Antifungal Susceptibility of Candida Biofilms: Unique Efficacy of Amphotericin B Lipid Formulations and Echinocandins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy [online]. 2002a, 46(6), 1773-1780. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.46.6.1773-1780.2002>

KUHN D.M., CHANDRA J, MUKHERIEE P.K, GHANNOUM M.A. Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. Infection and Immunity. 2002b, 70(2), 878-888.

KUHN, D. M., M. BALKIS, J. CHANDRA, P. K. MUKHERJEE a M. A. GHANNOUM. Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of Candida Growth and Metabolism. Journal of Clinical Microbiology [online]. 2003, 41(1), 506-508. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.41.1.506-508.2003>

LAWRENCE, J.R, T.R NEU a G.D.W SWERHONE. Application of multiple parameter imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial biofilms. Journal of Microbiological Methods [online]. 1998, 32(3), 253-261. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016770129800027X>

LEEWENHOECK, A. An Abstract of a Letter from Mr. Anthony Leewenhoeck at Delft, Dated Sep. 17. 1683. Containing Some Microscopical Observations, about Animals in the Scurf of the Teeth, the Substance Call'd Worms in the Nose, the Cuticula Consisting of Scales. Philosophical Transactions of the Royal Society of London [online]. 1684, 14(155-166), 568-574. ISSN 0261-0523. Dostupné z: <http://rstl.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstl.1684.0030>

LEMBRE, Pierre, Cecile LORENTZ a Patrick DI. Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World. KARUNARATNE, Desiree Nedra, ed. The Complex World of Polysaccharides [online]. InTech. 2012. ISBN 978-953-51-0819-1. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of-polysaccharides/exopolysaccharides-of-the-biofilm-matrix-a-complex-biophysical-world>

LI, X. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. Microbiology [online]. 2003, 149(2), 353-362. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.25932-0>

LYNCH, David J., Tracey L. FOUNTAIN, Joseph E. MAZURKIEWICZ a Jeffrey A. BANAS. Glucan-binding proteins are essential for shaping Streptococcus mutans biofilm architecture. FEMS Microbiology Letters [online]. 2007, 268(2), 158-165. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2006.00576.x>

MACIA, M.D., E. ROJO-MOLINERO a A. OLIVER. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. Clinical Microbiology and Infection [online]. 2014, 20(10), 981-990. ISSN 1198743X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14653647>

MAH, Thien-Fah C a George A. O'TOOLE. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology [online]. 2001, 9(1), 34-39. ISSN 0966842x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X00019132>

MARTIN, Ivan, David WENDT a Michael HEBERER. The role of bioreactors in tissue engineering. Trends in Biotechnology [online]. 2004, 22(2), 80-86. ISSN 01677799. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779903003184>

MATHUR, T, S SINGHAL, S KHAN, DJ UPADHYAY, T FATMA a A RATTAN. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An evaluation of three different screening methods. Indian Journal of Medical Microbiology [online]. 2006, 24(1), 25. ISSN 0255-0857. Dostupné z: <http://www.ijmm.org/text.asp?2006/24/1/25/19890>

MCBAIN Andrew J. Chapter 4 In Vitro Biofilm Models: An Overview. Advances in Applied Microbiology, Academic Press. 2009, 69, 99-132. ISSN 0065-2164. ISBN 9780123748249. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)69004-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)69004-3).

MCCLUSKEY, C., J.P. QUINN a J.W. MCGRATH. An Evaluation of Three New-Generation Tetrazolium Salts for the Measurement of Respiratory Activity in Activated Sludge Microorganisms. Microbial Ecology [online]. 2005, 49(3), 379-387. ISSN 0095-3628. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00248-004-0012-z>

MCCOY, W. F., J. D. BRYERS, J. ROBBINS a J. W. COSTERTON. Observations of fouling biofilm formation. Canadian Journal of Microbiology [online]. 1981, 27(9), 910-917. ISSN 0008-4166. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/m81-143>

MILLER, Melissa B. a Bonnie L. BASSLER. Quorum Sensing in Bacteria. Annual Review of Microbiology [online]. 2001, 55(1), 165-199. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.55.1.165>

MUSHIN Jamal, Ufaq Tasneem, Tahir Hussain a Saadia Andleeb. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology. 2015, 4(3). Dostupné z: <http://www.rroj.com/open-access/bacterial-biofilm-its-composition-formation-and-role-in-human-infections.pdf>

NETT, Jeniel, Leslie LINCOLN, Karen MARCHILLO a David ANDES. B-1,3 Glucan as a Test for Central Venous Catheter Biofilm Infection. The Journal of Infectious Diseases [online]. 2007, 195(11), 1705-1712. ISSN 0022-1899. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/517522>

NIU, C. a E. S. GILBERT. Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components That Affect Biofilm Formation and Structure. Applied and Environmental Microbiology [online]. 2004, 70(12), 6951-6956. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.70.12.6951-6956.2004>

PACE, Richard Thomas a Karen Jane Leadbetter BURG. Toxic effects of resazurin on cell cultures. Cytotechnology [online]. 2015, 67(1), 13-17. ISSN 0920-9069. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10616-013-9664-1>

PAI, A., Y. TANOUCHI a L. YOU. Optimality and robustness in quorum sensing (QS)-mediated regulation of a costly public good enzyme. Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 2012, 109(48), 19810-19815. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1211072109>

PALOMINO, J.-C., A. MARTIN, M. CAMACHO, H. GUERRA, J. SWINGS a F. PORTAELS. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy [online]. 2002, 46(8), 2720-2722. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002>

PARK, Se-Keun, Yeong-Kwan KIM, Young-Sook OH a Sung-Chan CHOI. Growth kinetics and chlorine resistance of heterotrophic bacteria isolated from young biofilms formed on a model drinking water distribution system. The Korean Journal of Microbiology [online]. 2015, 51(4), 355-363. ISSN 0440-2413. Dostupné z: <http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=MSMHQBQ&py=2015&vnc=v51n4&sp=355>

PARSEK, Matthew R. a Pradeep K. SINGH. Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. Annual Review of Microbiology [online]. 2003, 57(1), 677-701. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.57.030502.090720>

PEETERS, Elke, Hans J. NELIS a Tom COENYE. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. Journal of Microbiological Methods [online]. 2008, 72(2), 157-165. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701207003909>

PITTS, Betsey, Martin A. HAMILTON, Nicholas ZELVER a Philip S. STEWART. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. Journal of Microbiological Methods [online]. 2003, 54(2), 269-276. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701203000344>

POTERA C. ANTIBIOTIC RESISTANCE: Biofilm Dispersing Agent Rejuvenates Older Antibiotics. Environmental Health Perspectives. 2010, 118(7), 288. Převzato z Rasmussen a Givskov 2006.

RAGAZZI, Moira, Simonetta PIANA, Caterina LONGO, Fabio CASTAGNETTI, Monica FORONI, Guglielmo FERRARI, Giorgio GARDINI a Giovanni PELLACANI. Fluorescence confocal microscopy for pathologists. Modern Pathology [online]. 2014, 27(3), 460-471. ISSN 0893-3952. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/modpathol2013158>

RAMAGE G., Wickes B. L., López-Ribot J.L. A seed and feed model for the formation of *Candida albicans* biofilms under flow conditions using an improved modified Robbins device. Rev Iberoam Micol. 2008, 25(1), 37-40. PMID: 18338926.

RANJITH, Konduri, Sama KALYANA CHAKRAVARTHY, HariKrishna ADICHERLA, Savitri SHARMA a Sisinthy SHIVAJI. Temporal Expression of Genes in Biofilm-Forming Ocular *Candida albicans* Isolated From Patients With Keratitis and Orbital Cellulitis. Investigative Ophthalmology & Visual Science [online]. 2018, 59(1), 528. ISSN 1552-5783. Dostupné z: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.17-22933>

RASMUSSEN, Thomas B. a Michael GIVSKOV. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. International Journal of Medical Microbiology [online]. 2006, 296(2-3), 149-161. ISSN 14384221. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S143842210600078>

RITTMANN, Bruce E. a Perry L. MCCARTY. Model of steady-state-biofilm kinetics. Biotechnology and Bioengineering [online]. 1980, 22(11), 2343-2357. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260221110> Převzato z abstraktu databáze ResearchGate.

ŘIČICOVÁ, Markéta, Soňa KUCHARÍKOVÁ, Hélène TOURNU, Jelle HENDRIX, Helena BUJDÁKOVÁ, Johan VAN ELDERE, Katrien LAGROU a Patrick VAN DIJCK. *Candida albicans* biofilm formation in a new in vivo rat model. *Microbiology* [online]. 2010, 156(3), 909-919. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.033530-0>

SHARMA, Prashant, Rene T. ROZENBAUM, Willem WOUDESTRA, Ed D. DE JONG, Henny C. VAN DER MEI a Henk J. BUSSCHER. A constant depth film fermenter to grow microbial biofilms. *Protocol Exchange* [online]. 2017. ISSN 2043-0116. Dostupné z: <http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/5521>

SCHALLER, Martin, Katherina ZAKIKHANY, Julian R NAGLIK, Günther WEINDL a Bernhard HUBE. Models of oral and vaginal candidiasis based on in vitro reconstituted human epithelia. *Nature Protocols* [online]. 2006, 1(6), 2767-2773. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2006.474>

SCHILLING, K.M., R.G. CARSON, C.A. BOSKO, G.D. GOLIKERI, A. BRUINOOGHE, K. HOYBERG, A.M. WALLER a N.P. HUGHES. A microassay for bacterial adherence to hydroxyapatite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 1994, 3(1-2), 31-38. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/092777659301120G>

SIGMA. RPMI-1640 Media, Product Information. 2016. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Formulation/r8758for.pdf>

SINGLA, Saloni, Kusum HARJAI a Sanjay CHHIBBER. Artificial *Klebsiella pneumoniae* biofilm model mimicking in vivo system: altered morphological characteristics and antibiotic resistance. *The Journal of Antibiotics* [online]. 2014, 67(4), 305-309. ISSN 0021-8820. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ja2013139>

SOIFER, Ilya, Lydia ROBERT a Ariel AMIR. Single-Cell Analysis of Growth in Budding Yeast and Bacteria Reveals a Common Size Regulation Strategy. *Current Biology* [online]. 2016, 26(3), 356-361. ISSN 09609822. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982215015602>

STEPANOVIC S., VUKOVIC D., DAKIC I., SAVIC B., SVABIC-VLAHOVIC M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*. 2000, 40, 175-179. PMID: 10699673.

STOCKERT, Juan Carlos a Alfonso BLAZQUEZ-CASTRO. Chapter 3 Dyes and Fluorochromes Fluorescence Microscopy in Life Sciences [online]. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2017. ISBN 9781681085180.

STOCKS, S. M. Mechanism and use of the commercially available viability stain BaCLight. *Cytometry* [online]. 2004, 61A(2), 189-195. ISSN 0196-4763. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.20069>

SUDBERY, Peter, Neil GOW a Judith BERMAN. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* [online]. 2004, 12(7), 317-324. ISSN 0966842x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X04001180>

SUTHERLAND, Ian W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* [online]. 2001, 147(1), 3-9. ISSN 1350-0872.

Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-147-1-3>

TAMMER, I., J. REUNER, R. HARTIG a G. GEGINAT. Induction of *Candida albicans* biofilm formation on silver-coated vascular grafts. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2014, 69(5), 1282-1285.

ISSN 0305-7453. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkt521>

ULPHANI J.S, RUPP M.E. Model of *Staphylococcus aureus* central venous catheter-associated infection in rats. *Lab. Anim. Sci.* 1999, 49, 283-287.

UPPULURI, Priya, Ashok K. CHATURVEDI a Jose L. LOPEZ-RIBOT. Design of a Simple Model of *Candida albicans* Biofilms Formed under Conditions of Flow: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Mycopathologia* [online]. 2009, 168(3), 101-109. ISSN 0301-486x. Dostupné z:

<http://link.springer.com/10.1007/s11046-009-9205-9>

WALTON, F. J. Conserved Elements of the RAM Signaling Pathway Establish Cell Polarity in the Basidiomycete *Cryptococcus neoformans* in a Divergent Fashion from Other Fungi. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 2006, 17(9), 3768-3780. ISSN 1059-1524. Dostupné z:

<http://www.molbiolcell.org/content/17/9/3768.full>

WHITCHURCH, C. B. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science* [online]. 2002, 295(5559), 1487-1487. ISSN 00368075.

Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.295.5559.1487>

WHITTAKER, Catherine J., Christiane M. KLIER a Paul E. KOLENBRANDER. Mechanisms of Adhesion by Oral Bacteria. *Annual Review of Microbiology* [online]. 1996, 50(1), 513-552. ISSN 0066-4227. Dostupné z:

<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.50.1.513>

WINGENDER, J., JAEGER, K.-E. a FLEMMING, H.-C. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science & Technology*. 2001, 46(6), 1-8.

Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/11956936_Relevance_of_microbial_extracellular_polymeric_substances_EPSs_-_Part_I_Structural_and_ecological_aspects

WIRTHLIN, M. Robert, Pengjen Kevin CHEN a Charles I. HOOVER. A Laboratory Model Biofilm Fermenter: Design and Initial Trial on a Single Species Biofilm. *Journal of Periodontology* [online]. 2005, 76(9), 1443-1449. ISSN 0022-3492. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1902/jop.2005.76.9.1443>