

# **Antimikrobní vlastnosti biodegradabilních polymerů na biofilm pozitivní mikroorganismy**

Daniela Máčalová

---

Bakalářská práce  
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství polymerů  
akademický rok: 2018/2019

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Daniela Máčalová**  
Osobní číslo: **T16378**  
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Antimikrobní vlastnosti biodegradabilních polymerů na biofilm pozitivní mikroorganismy.**

Zásady pro vypracování:

### **Teoretická část**

**Charakteristika mikroorganismů vyskytujících se při tvorbě biofilmů.**

**Charakteristika a výskyt biofilmů**

**Možnosti detekce biofilmů**

### **II. Praktická část**

**Kultivační metody pro stanovení biofilm pozitivních bakterií**

**Vliv kultivačních podmínek na tvorbu biofilmů.**

**Vyhodnocení a zpracování výsledků**

**Diskuze a formulace závěrů**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

**HSIEH, Ke Ming, George A. MURGEL, Leonard W. LION a Michael L. SHULER. Interactions of microbial biofilms with toxic trace metals: 1. Observation and modeling of cell growth, attachment, and production of extracellular polymer. *Biotechnology and Bioengineering* . 1994, 44(2), 219–231 [cit. 2018-06-15]. DOI: 10.1002/bit.260440211. ISSN 0006-3592.**

**PANDIT, Santosh, Vaishnavi RAVIKUMAR, Alyaa M. ABDEL-HALEEM, et al. Low Concentrations of Vitamin C Reduce the Synthesis of Extracellular Polymers and Destabilize Bacterial Biofilms. *Frontiers in Microbiology* . 2017, 8, - [cit. 2018-06-15]. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02599. ISSN 1664-302X.**

Dle doporučení vedoucího.

Databáze Web of Science

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Pavel Pleva, PhD.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

**2. ledna 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**17. května 2019**

Ve Zlíně dne 25. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*

doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: MAČALOVÁ DANIELA

Obor: PMT

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 26.4.19

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Biofilmy dokáží růst na polymerních materiálech a svou přítomností je mohou poškozovat a tím ohrožovat zdraví člověka. Na druhou stranu lze využít jejich rychlou metabolickou aktivitu na likvidaci odpadů ze životního prostředí. Cílem bakalářské práce bylo zjistit schopnost a množství tvorby biofilmu 6 bakteriálních kmenů na 4 biodegradabilních polymerech (PLA, PBAT, PBS a PBSA) a skle. Byla provedena identifikace bakteriálních kmenů pomocí fenotypu a následně sekvenací 16S rDNA a MALDI-TOF. Bakterie byly vyhodnoceny jako *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Acinetobacter lwoffii* a dva odlišné kmeny *Stenotrophomonas maltophilia*. U všech těchto bakterií byla potvrzena produkce biofilmu. Nejsilněji produkovaly biofilm druhy *Stenotrophomonas maltophilia* a *Bacillus subtilis*, tyto bakterie dokonce dokázaly růst na všech testovaných materiálech alespoň při jedné z testovaných metod. Nejmenší produkce biofilmu byla shledána na PLA a skle, naopak k vysokému porůstání biofilmu docházelo u PBS a PBSA.

Klíčová slova: biofilm, biodegradabilní polymer, PLA, PBAT, PBS, PBSA

## ABSTRACT

Biofilms can grow on polymeric materials and by their presence they can damage polymers and endanger the health of individuals. On the other hand, we can use their rapid metabolic activity and biofilms dispose of waste from the environment. The aim of this thesis was to determine the ability and amount of biofilm formation of 6 bacterial strains on 4 biodegradable polymers (PLA, PBAT, PBS and PBSA) and glass. Bacterial strains were identified by sequencing 16S rDNA and MALDI-TOF. The bacteria were identified as *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Acinetobacter lwoffii* and two strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. Biofilm production was confirmed in all of these bacteria. *Stenotrophomonas maltophilia* and *Bacillus subtilis* have produced the strongest biofilm, and these bacteria have even proven to grow on all the tested materials in at least one of the methods tested. The smallest biofilm production was found on PLA and glass, while the high biofilm growth was on PBS and PBSA.

Keywords: biofilm, biodegradable polymer, PLA, PBAT, PBS, PBSA

## PODĚKOVÁNÍ

Mé srdečné poděkování patří především mému vedoucímu bakalářské práce Ing. Pavlu Plevovi, PhD. nejen za jeho cenné rady, ochotu a trpělivost, ale i za jeho přátelský přístup, podporu během studia a otevřenou mysl pro mé nápady. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Veronice Kučabové a Ing. Olze Vlčové za pomoc a rady během provádění praktické části. Poděkovat bych chtěla i Ing. Janě Šeré, PhD. za mé zaškolení s prací s fluorescenčním mikroskopem a dalším zaměstnancům Ústavu inženýrství životního prostředí. Také bych chtěla poděkovat všem, studentům i zaměstnancům, pracujícím v mikrobiologické laboratoři za vytvoření přátelského kolektivu.

Dále bych chtěla poděkovat prof. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D. a Jakubu Klabanovi za vylisování mých testovaných polymerních vzorků. Další díky patří Výzkumnému ústavu mlékárenskému za poskytnutí bakteriálních kmenů a prof. Ing. Miroslavě Kačániové, PhD. za provedení a zpracování výsledků z MALDI-TOF.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem, kteří mě podpořili během mých studií, především mým rodičům.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

ÚVOD.....	9
<b>I TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>10</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA A VÝSKYT BIOFILMŮ.....</b>	<b>11</b>
1.1 BIOFILMY .....	11
1.2 VZNIK A VÝVOJ BIOFILMŮ .....	11
1.3 VÝSKYT A VÝZNAM BIOFILMŮ.....	12
1.3.1 Biofilmy v medicíně.....	12
1.3.2 Enviromentální biofilmy .....	14
1.3.3 Biofilmy v potravinářském průmyslu .....	15
<b>2 CHARAKTERISTIKA MIKROORGANIZMŮ VYSKYTUJÍCÍ SE PŘI TVORBĚ BIOFILMŮ .....</b>	<b>16</b>
2.1 BAKTERIE.....	16
2.1.1 Biofilm pozitivní druhy.....	17
2.1.1.1 Bacillus tequilensis .....	17
2.1.1.2 Bacillus subtilis.....	17
2.1.1.3 Bacillus pumilus .....	17
2.1.1.4 Acinetobacter lwoffii .....	17
2.1.1.5 Stenotrophomonas maltophilia .....	18
2.1.2 Identifikace bakterií .....	18
2.1.2.1 Sledování fenotypových vlastností.....	18
2.1.2.2 Sekvence 16S rDNA .....	18
2.1.2.3 Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF) .....	20
2.1.3 Růst bakterií .....	21
<b>3 MOŽNOSTI DETEKCE BIOFILMŮ.....</b>	<b>22</b>
3.1 MIKROSKOPICKÉ METODY .....	22
3.2 DIAGNOSTICKÉ PŮDY .....	23
3.3 SPEKTROFOTOMETRICKÉ METODY.....	24
3.4 MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ METODY .....	25
<b>4 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY.....</b>	<b>26</b>
4.1 BIODEGRADABILNÍ DRUHY POLYMERŮ.....	27
4.1.1 Kyselina polymléčná (PLA).....	28
4.1.2 Poly(butylem adipát-co-tereftalát) (PBAT) .....	28
4.1.3 Polybutylen-sukcinát (PBS).....	29
4.1.4 Polybutylen-sukcinát adipát (PBSA) .....	29
4.2 RŮST BIOFILMU NA POLYMERNÍM MATERIÁLU .....	30
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>31</b>
<b>5 MATERIÁL .....</b>	<b>32</b>



5.1	TESTOVANÉ BIODEGRADABILNÍ POLYMERY .....	32
5.2	TESTOVANÉ BAKTERIÁLNÍ KULTURY .....	32
5.3	POUŽITÉ KULTIVAČNÍ MÉDIA .....	32
5.3.1	Mozko-srdcová infuze .....	32
5.3.2	Krevní agarová báze 2 .....	33
5.3.3	Agarová báze <i>Bacillus cereus</i> .....	33
<b>6</b>	<b>KULTIVAČNÍ METODY .....</b>	<b>34</b>
6.1	IDENTIFIKACE TESTOVANÝCH BAKTERIÍ .....	34
6.1.1	Fenotypové metody .....	34
6.1.2	Sekvenace 16S rDNA .....	34
6.1.3	MALDI-TOF .....	36
6.2	STANOVENÍ BIOFILM POZITIVITY BAKTERIÍ .....	36
6.2.1	Průkaz tvorby biofilmu na agaru s kongo červení .....	36
6.2.2	Optická mikroskopie .....	37
6.2.3	Fluorescenční mikroskopie .....	38
6.2.4	Průkaz tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce .....	38
6.2.5	MTT test .....	39
6.3	VLIV KULTIVAČNÍCH PODMÍNEK NA TVORBU BIOFILMU .....	39
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>41</b>
7.1	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ .....	41
7.1.1	Fenotypové metody .....	41
7.1.2	Sekvenace 16S rDNA .....	42
7.1.3	MALDI-TOF .....	43
7.1.4	Diskuze .....	43
7.2	STANOVENÍ BIOFILM POZITIVITY BAKTERIÍ .....	44
7.2.1	Průkaz tvorby biofilmu na agaru s kongo červení .....	44
7.2.2	Optická mikroskopie .....	48
7.2.3	Fluorescenční mikroskopie .....	50
7.2.4	Průkaz tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce .....	53
7.2.5	MTT test .....	55
7.2.6	Diskuze .....	58
7.3	STANOVENÍ VLIVU KULTIVAČNÍCH PODMÍNEK .....	59
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>67</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>81</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>83</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>85</b>

## ÚVOD

Existuje jen málo věcí, o kterých se říká, že jsou všude kolem nás. Jednou z nich jsou polymery, bez kterých bychom neexistovali, protože jsme z nich složeni (Thomas *et al.*, 2013). Jsme jimi obklopeni i ve formě různých výrobků a obalů, ze kterých se ovšem časem stává odpad a velký zdroj znečištění životního prostředí, proto dostávají stále větší uplatnění biodegradabilní polymery (Vroman a Tighzert, 2009). Dále jsou všude kolem nás bakterie, které mohou žít v tekutině jako vznášející se plankton či růst na různých površích v tzv. biofilmech (Schindler, 2001). Bakterie v biofilmech mají specifické vlastnosti např. jsou odolné vůči vnějším vlivům (Donlan a Costerton, 2002) a mají vyšší metabolickou aktivitu (Teixeira a Oliveira, 2002). Biofilmy mají významné uplatnění v průmyslu např. při čištění odpadních vod. Na druhou stranu jsou biofilmy kontaminanty, které mohou způsobovat řadu závažných nemocí a také mohou ničit materiál a vést až k jeho biodegradaci (Rulík *et al.*, 2011).

Studium interakce biofilmu na polymerních materiálech přináší jedinečné informace o vlastnostech sledovaných bakteriálních kmenů a o možnostech následného použití materiálu. Silný biofilmový růst na materiálech je vhodný pro použití materiálů jako nosiče biofilmu např. do biofilmových reaktorů, které se používají na čištění vody či do mulčovacích fólií nesoucí biofilm pozitivní bakterie podporující růst rostlin např. *Pseudomonas fluorescens* (Rulík *et al.*, 2011). Růst biofilmu na polymeru může vést k biodegradaci, což může být vhodné pro likvidaci polymerního znečištění z životního prostředí (Gu, 2003). Naopak materiály, na kterých se netvoří biofilm, jsou vhodné pro zdravotnické aplikace např. kanyly, nitě na sutury ran a další implantáty a materiály případně používané i v potravinářství (Rulík *et al.*, 2011).

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 CHARAKTERISTIKA A VÝSKYT BIOFILMŮ

O bakteriích se všeobecně ví, že rostou na živných půdách v malých kopečcích, kterým se říká kolonie. Dříve než Robert Koch přišel na způsob pěstování na pevných půdách, pěstovaly se bakterie pouze v tekutinách, což neumožňovalo získání čisté kultury. S pevnými půdami se začaly získávat čisté kultury a vedlo to k velkému rozvoji bakteriologie. V té době si všichni mysleli, že bakterie přirozeně žijí jako volně se vznášející plankton či jako kolonie na pevných půdách. Ve skutečnosti bakterie přirozeně žijí volně v tekutém prostředí tzv. planktonicky nebo ve společenství tzv. biofilmu (Schindler, 2001).

### 1.1 Biofilmy

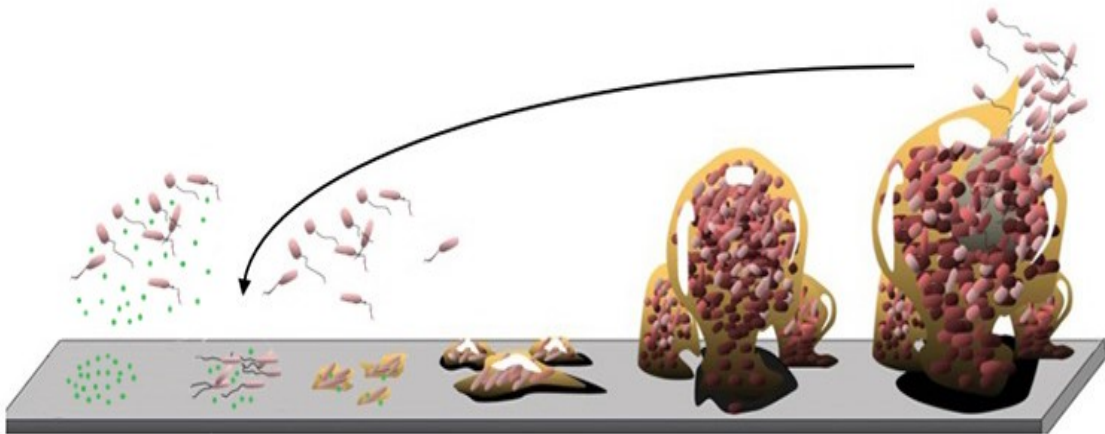
Biofilm je společenstvo mikroorganismů, které je přichyceno k povrchu a je obklopeno extracelulárním polymerním matrixem, který vzniká produkcí přítomných buněk (Donlan a Costerton, 2002). Jedna z prvních definic označuje biofilmy jako aktivní biologickou vrstvu z mikroorganismů a extracelulárních polymerů, přichycenou k podkladu (Marshall, 1984). Život v biofilmu je pro mikroorganismy výhodnější oproti planktonické formě, protože biofilm udržuje stálost vnitřního prostředí, izoluje je od okolí a chrání buňky, proto jsou odolnější proti různému poškození např. toxickým látkám, UV záření, bakteriofágům, antibiotikům, ale i působením imunitního systému hostitele (Donlan a Costerton, 2002). Mikroorganismy žijící v biofilmech dokáží mezi sebou komunikovat na základě koncentrace signálních molekul. Tato schopnost se nazývá quorum sensing (Li a Tian, 2012). Mikroorganismy v biofilmu mají vyšší metabolickou aktivitu, a proto našly řadu uplatnění v průmyslu (Teixeira a Oliveira, 2002).

### 1.2 Vznik a vývoj biofilmů

Uvažuje se o čtyřech důvodech vzniku biofilmů. Prvním je ochrana před vnějšími vlivy působící na bakterie. Druhým je usazování se do prostředí s velkým množstvím živin. Třetím důvodem je využívání výhod společenstva. Čtvrtým důvodem je přirozenost tvorby biofilmu se samé podstaty chování bakterií (Jefferson, 2004).

Vznik a následný vývoj biofilmů (Obr. 1) probíhá v několika fázích (Costerton *et al.*, 1987). V první fázi dochází k přesunu a následnému přichycení organických molekul k podkladu, následně se přesouvají mikroorganismy k povrchu a přichycují se. Po adhezi začnou buňky produkovat extracelulární polymerní matici a další látky, poté biofilm roste. Časem

dochází k odumírání některých buněk, odtrhávání částí biofilmu a jejich rozptýlení zpět do planktonické fáze (Rulík *et al.*, 2011). Adhezi buněk způsobují fyzikální síly (van der Waal-sovy síly, elektrostatické a hydrofobní interakce), nespecifické chemické vazby (kovalentní a vodíkové vazby) a specifické molekuly tzv. adheziny (Neu, 1996).



Obr. 1. Vznik a vývoj biofilmu (Davis, 2007; upraveno dle Rulík *et al.*, 2011).

### 1.3 Výskyt a význam biofilmů

Biofilmy jsou přítomné téměř všude, kde se vyskytují mikroorganismy (Lewandowski a Beyenal, 2007). Vyskytují se v přírodě i v humánním prostředí a mají nejen negativní, ale i pozitivní dopad. Takovým příkladem může být poškozování materiálů. Na druhou stranu však lze biofilmy využívat k degradaci plastů z životního prostředí. Biofilmy také tvoří nezbytnou součást čistíren odpadních vod. (Rulík *et al.*, 2011).

#### 1.3.1 Biofilmy v medicíně

Biofilmy vyskytující se v medicíně představují značný problém, protože způsobují řadu chronických a těžko léčitelných onemocnění (Costerton, Stewart a Greenberg, 1999) např. periodontitidu, osteomyelitidu, pseudomonádovou pneumonii při cystické fibróze (Costerton *et al.*, 1995). Patogenní biofilmy tvoří např. rody *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Streptococcus* a *Listeria* (Hall-Stoodley a Stoodley, 2002). Forma růstu buněk v biofilmu je odolnější vůči antibiotikům i imunitnímu systému, proto dokáže dlouhodobě přežít v hostiteli (Donlan a Costerton, 2002).

Biofilmy se vyskytují i přirozeně např. ve střevní sliznici, kde do určité míry chrání organismus před nežádoucími mikroorganismy (Schindler, 2001). Jedním z nejznámějších

biofilmů v lidském a zvířecím těle je zubní plak, který produkuje svým metabolismem kyselé produkty, které naleptávají zubní sklovinu a dochází tak k tvorbě zubního kazu. Plak je také příčinou vzniku zubních kamenů, který se tvoří jeho mineralizací. Zubní plak může vést k periodontitidě až k poruše dásní a závěsného aparátu zubů (Donlan a Costerton, 2002).

V posledních letech představují biofilmy problém v souvislosti s častějším zaváděním umělých implantátů. Riziko vzniku infekce ovlivňuje způsob zavedení implantátu; péče o něj; materiál, z něhož je vyroben a jeho povrchová úprava; čas, po který je implantát zaveden v těle; ale i reakce imunitního systému pacienta.

Závažná jsou především onemocnění z implantátů zavedených do krevního řečiště, jako jsou katétry, umělé srdeční chlopně, cévní protézy, kardiostimulátory (Rulík *et al.*, 2011). U katétrů může docházet k infikaci během manipulace či z kožní mikroflóry pacienta. V tomto případě je inkubační doba 7–10 dní (Raad, 1998). Infekce vzniklé kontaminovanými roztoky či částmi katétrů se projevují později (Rulík *et al.*, 2011). Z infikovaných katétrů můžou vznikat sepse, které můžou vést až k mortalitě. K úmrtí vzniklé sepsí z infikovaných katétru dochází u 5–25 % pacientů. Ale k největší mortalitě, kolem 25 %, dochází u infekcí z umělých chlopní (Darouiche, 2001), kdy riziko vzniku sepse se uvádí v rozmezí 0,5–4 % (Hill *et al.*, 2006).

Druhým nejčastěji zaváděným implantátem po katétrech jsou močové katétry, u kterých dochází k infekci u 10–50 % pacientů při krátkodobé katetrizaci, kratší než 7 dnů, ale u katetrizaci delší než 28 dnů dochází k infekci u téměř všech pacientů (Stickler *et al.*, 2002). Kolonizace močových katétrů a následně i močových cest může vést k ucpávání katétrů, tvorbě močových kamenů až k rakovině močového měchýře (Gorman a Tunney, 1997).

Do urogenitálního traktu se také zavádí nitroděložní tělíška a penilní protézy. Kolonizace nitroděložních tělíšek vede k zánětům dělohy a pánevního okolí až k následné neplodnosti (Stoddard *et al.*, 2015). U penilních protéz byla častější subklinická infekce, za kterou nejčastěji mohl *Staphylococcus epidermidis*, ale s novými metodami zavádění je častější klinická infekce způsobená virulentnějšími bakteriemi např. rodem *Pseudomonas* (Faller a Kohler, 2017).

Infekce vznikají též z biofilmů na ortopedických implantátech, jak na kloubních náhradách, tak i na pomůckách k léčení fraktur např. dlahách, šroubech, hřebecch. Při zavedení ortopedických implantátů dochází k traumatizaci oblasti mezi náhradou a kostí, což vytvoří

vhodné podmínky pro vznik infekce, protože adhezi podpoří vzniklý hematoma z traumatizované tkáně. Infekce mohou pokazit funkci implantátu, ale i mohou infikovat okolní tkáň (van de Belt *et al.*, 2001).

Biofilmy rostou i na kontaktních čočkách kde způsobují dráždění rohovky, případně vznik keratitidy (McLaughlin-Borlace *et al.*, 1998). Dalšími implantáty, u kterých může vznikat biofilm, jsou endotracheální kanyly, protézy hlasivek, drény, zubní protézy a mnoho dalších (Donlan a Costerton, 2002).

### 1.3.2 Enviromentální biofilmy

V přírodě se biofilmy nachází na neporaněném povrchu rostlin tzv. epifyty či uvnitř rostlin tzv. endofyty. Endofyt, oproti epifytu, parazituje na rostlinstvu (Rulík *et al.*, 2011). Počet epifytických bakterií na jednom gramu listu je okolo  $10^7$  buněk a na jednom gramu podzemních pletiv se nachází  $10^9$  buněk tzv. rhizobakterií (Lindow, Hecht-Poinar a Elliott, 2002).

Některé rhizobakterie, např. *Pseudomonas fluorescens*, podporují růst rostlin, proto se aplikují při výsadbě. Pozitivní účinek způsobuje produkce růstových regulátorů, antibiotik, podpora příjmu živin a vznik bakteriální rezistence. Existují i škodlivé rody rhizobakterií, např. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, které negativně působí na výnos z plodin, ale většina rhizobakterií nevyvolává změny na rostlinstvu.

Biofilmy na nadzemních částech rostlin jsou tvořeny tzv. fyloplanními bakteriemi, které mohou narušovat kutikulu rostlin. Mezi fyloplanní bakterie patří i kmeny, které působí jako aktivní ledová jádra způsobující rychlé zmrznutí vody. Tyto nukleárně aktivní bakterie, např. *Pseudomonas syringae*, poškozují rostliny těsně pod bodem mrazu, proto pěstitelé tyto bakterie likvidují postřiky, které dokáží ochránit rostlinu až do  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Na druhou stranu se nukleárně aktivní bakterie dají využít k dezinfekci škodlivého hmyzu při přezimování či při výrobě ledu, sněhu a zmrazování potravy.

Na rostlinách se občas i vyskytují patogeny člověka a zvířat způsobující alimentární infekce a respirační onemocnění (Rulík *et al.*, 2011). Nemoci dýchacích cest ohrožují především pracovníky, kteří pracují s rostlinným materiálem. Způsobují je rody bakterií produkující endotoxiny např. *Klebsiella*, *Enterobacter* a *Citrobacter* (Morris a Monier, 2003).

Biofilmy se přirozeně vyskytují v sladkovodních i mořských vodách, kde svým metabolismem pomáhají čistit vodu. Proto se využívají i ke čištění odpadních vod, kde jsou

součástí biofilmových reaktorů. Svým metabolismem nečistoty rozkládají na biomasu, která se následně v čistírnách odstraňuje usazováním (Rulík *et al.*, 2011). Poprvé byl použit biofilm k čištění odpadních vod ve Walesu ve Velké Británii již v osmdesátých letech 19. století (Bryers, c2000).

Ale mohou i svou přítomností v úpravnách vod a v rozvodných sítích pitné vody, kde pokrývají nádrže, filtry i potrubí, způsobovat zdravotní problémy především u konzumentů se sníženou imunitou, zhoršovat kvalitu vody a poškozovat potrubí korozí (Rulík *et al.*, 2011). Již v roce 1976 bylo popsáno první onemocnění způsobené vodárenským biofilmem legionely, která je dodnes zodpovědná za řadu úmrtí (Fields, Benson a Besser, 2002).

### 1.3.3 Biofilmy v potravinářském průmyslu

Vznik biofilmů v potravinářství způsobuje hygienické problémy a ekonomické ztráty. Biofilmy se mohou vyskytovat nejen na potravinách, ale i všech površích, s kterými se můžeme v potravinářském průmyslu setkat např. výrobní linky, obalové materiály a další nástroje. Svou přítomností ohrožují konzumenty vznikem nemocí, poškozují vybavení např. vznikem korozi a způsobují energetické ztráty (Galié *et al.*, 2018).

Biofilmy v potravinářství mají i prospěšnou funkci a využívají se jako výrobní prostředek. Již v roce 1823 byly využity k rychlé výrobě octa (Characklis a Marshall, 1990). Ve vinařství se využívá biofilm ušlechtilé plísně *Botrytis cinerea*, který narušuje povrch bobulí a způsobí rychlejší odpařování vody, což vede ke zvýšení koncentrace sacharidů v plodu a následné změně chuti vína (Fleet, c1993). Biofilmy jsou i součástí některých masných výrobků a sýrů, kde napomáhají konzervaci a vytváří originální chuť a aroma. Typickými produkty obsahující biofilm jsou fermentované masné výrobky např. uherský salám, plísňové sýry např. camembert a roquefort, a sýry zrající pod mazem bez přídavku syřidla např. romadúr a olomoucké tvarůžky (Rulík *et al.*, 2011).



## 2 CHARAKTERISTIKA MIKROORGANIZMŮ VYSKYTUJÍCÍ SE PŘI TVORBĚ BIOFILMŮ

Biofilm mohou tvořit bakterie, řasy, houby, prvoci a mnohobuněčné mikroorganismy (Nikolaev a Plakunov, 2007). V přírodě biofilm tvoří vícedruhové společenství, kde má každý člen svou funkci (Stoodley *et al.*, 2002). Tyto druhy musí mít řadu vlastností, aby byly schopné vytvářet biofilm (Rulík *et al.*, 2011).

Obsahují geny, které se podílejí na adhezi, a geny, které vytváří extracelulární polymerní matrix (Frebourg *et al.*, 2000). Dokáží po přichycení změnit svůj fenotyp a aktivovat geny produkující polymery extracelulárního matrixu (Stoodley *et al.*, 2002).

Dalšími důležitými vlastnostmi rozhodujícími o schopnosti adherovat jsou hydrofobnost a povrchový náboj mikroorganismu. Tyto vlastnosti se uplatňují na začátku tvorby biofilmu, kdy hrají důležitou roli fyzikální síly, tj. van der Waalovy síly a hydrofobní interakce (Krasowska a Sigler, 2014).

Hydrofobní mikroorganismy se silněji přichycují na hydrofobní povrchy a hydrofilní mikroorganismy k hydrofilním povrchům (Kochkodan *et al.*, 2008).

Povrchový náboj je způsoben nabitými skupinami makromolekul na povrchu buněk. Většinou převažují záporně nabitě fosfátové a karboxylové skupiny a v menší míře kladně nabitě aminoskupiny. Přítomnost těchto skupin dává buňkám amfoterní charakter, který můžeme charakterizovat izoelektrickým bodem (pI). Hodnota pI tedy popisuje povrchový náboj neboli zastoupení a uspořádání nabitých skupin (Rijnaarts *et al.*, 1995). Pomocí pI lze odlišit některé biofilm pozitivní kmeny od biofilm negativních např. *Staphylococcus epidermidis*, kde biofilm negativní kmen má hodnotu pI = 2,3 a biofilm pozitivní pI = 2,6. Rozdíl pI je způsoben tím, že biofilm pozitivní kmeny *S. epidermidis* jsou obklopeny extracelulární matrixem tvořeného z částečně deacetylovaného poly-N-acetylglukomaminu, což vede ke zvýšení kladných nábojů a tím pádem ke změně pI (Růžička *et al.*, 2007).

### 2.1 Bakterie

Jsou jednobuněčné prokaryotické organizmy, které jsou na Zemi nejdelší dobu. V průběhu této doby se dokázaly rozrůznit svým tvarem, velikostí i přizpůsobit se různým podmínkám. Jsou velké 0,2  $\mu\text{m}$  až 0,75 mm (Schindler, 2014). Svým tvarem se dají rozdělit na

kokovité bakterie (koky, diplokoky, tetrakoky, streptokoky, stafylokoky, sarciny, mikrokoky), tyčinkovité, zakřivené (rohlíčkové, spirily, spirochety) a vláknité (Zachovalová, 2011). Dělí se též na základě obsahu peptidoglykanu v buněčné stěně na grampozitivní, kde buněčná stěna obsahuje 90 % peptidoglykanu, a gramnegativní s obsahem 10 % peptidoglykanu (Acharya, 2015).

### 2.1.1 Biofilm pozitivní druhy

Většina bakterií je přirozeně ve formě biofilmu, který jim poskytuje řadu výhod (Jefferson, 2004). Zde jsou uvedeny charakteristiky testovaných biofilm pozitivních bakterií.

#### 2.1.1.1 *Bacillus tequilensis*

Je grampozitivní tyčinkovitá bakterie tvořící spory. Byla vyizolována z hrobky v místě nazývajícím se Huityilapa, který je v mexickém státě Jalisco. Jsou velké 0,9 x 4,0 μm a rostou při 25–50 °C, při pH 5,5–8 a v aerobních podmínkách (Gatson *et al.*, 2006).

#### 2.1.1.2 *Bacillus subtilis*

Je jednou z nejlépe poznaných grampozitivních bakterií (Aizawa, 2014). Má tvar tyčinky a dokáže obývat suché i vlhké stanoviště, proto je téměř všudypřítomný a je přizpůsobený různým prostředím. Nejčastěji však roste v půdě. Při nedostatku živin a v dalších stresujících podmínkách dokáže vytvářet vysoce rezistentní endospory, které mohou být snadno rozptýleny vzduchem (Earl, Losick a Kolter, 2008).

#### 2.1.1.3 *Bacillus pumilus*

Je všudypřítomná grampozitivní aerobní tyčinka, která dokáže vytvářet endospory. Obývá různé typy půd, rostlin a dalších přírodních povrchů, dokonce byla i nalezena uvnitř pouště Sonoran (Benardini *et al.*, 2003). Roste při teplotě 5–50 °C, při pH 5–11 a dokáže tolerovat až 10 % chloridu sodného ve svém prostředí (Parvathi *et al.*, 2009).

#### 2.1.1.4 *Acinetobacter lwoffii*

Je aerobní gramnegativní bacil, který obývá kožní mikroflóru u 25 % zdravých jedinců. Ovšem je i oportunistickým patogenem u pacientů se sníženou imunitou a může způsobovat nozokomiální infekce např. pneumonii, meningitidu a infekce močových cest a kůže

(Regalado, Martin a Antony, 2009). Byla nalezena i v mraženém jídle, slanině, pasterizovaném mléce a mase (Rathinavelu, Zavros a Merchant, 2003).

#### **2.1.1.5 *Stenotrophomonas maltophilia***

Je gramnegativní tyčinkovitá bakterie, která byla poprvé izolována v roce 1943. Byla nalezena např. v zemině, zvířatech, rostlinách, vodě, kanylách, a dokonce dokázala kontaminovat antiseptický roztok. *S. maltophilia* je rezistentní oportunní patogen způsobující nozokomiální infekce. Napadá především respirační ústrojí. Způsobuje pneumonii, infekce kostí, kloubů, močových cest, měkkých tkání, očí a další (Brooke, 2012).

### **2.1.2 Identifikace bakterií**

Identifikaci bakterií lze provést různými metodami např. sledováním fenotypových vlastností bakterie, sekvenací 16S rDNA genů nebo pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Uhlík *et al.*, 2013).

#### **2.1.2.1 Sledování fenotypových vlastností**

Bakterie lze identifikovat na základě jejich vlastností např. pomocí jejich tvaru, velikosti, schopnosti tvořit spory, vzhledu kolonií či obsahem peptidoglykanu v buněčné stěně pomocí barvení dle Grama. Dalšími metodami k identifikování je využití selektivně diagnostických půd, které dokáží potlačit růst některých bakterií a obsahují přidané látky, které s daným kmenem reagují a způsobují viditelné změny kolonií či jejich okolí (Zachovalová, 2011). Jednou ze selektivně diagnostických půd je např. Agarová báze *Bacillus cereus*, která slouží k identifikaci kmene *Bacillus cereus*. Tato půda obsahuje mannitol, který tento kmen nedokáže zkvašovat. Druhou obsaženou látkou v tomto agaru je bromthymolová modř sloužící jako pH indikátor. Při růstu jiných kmenů dochází ke zkvašování mannitolu, což vede k produkci kyselých produktů vedoucí ke zežloutnutí pH indikátoru, ale když na agaru roste kmen *Bacillus cereus* dojde k zmodráním kolonií (Harmon, Kautter a McClure, 1984).

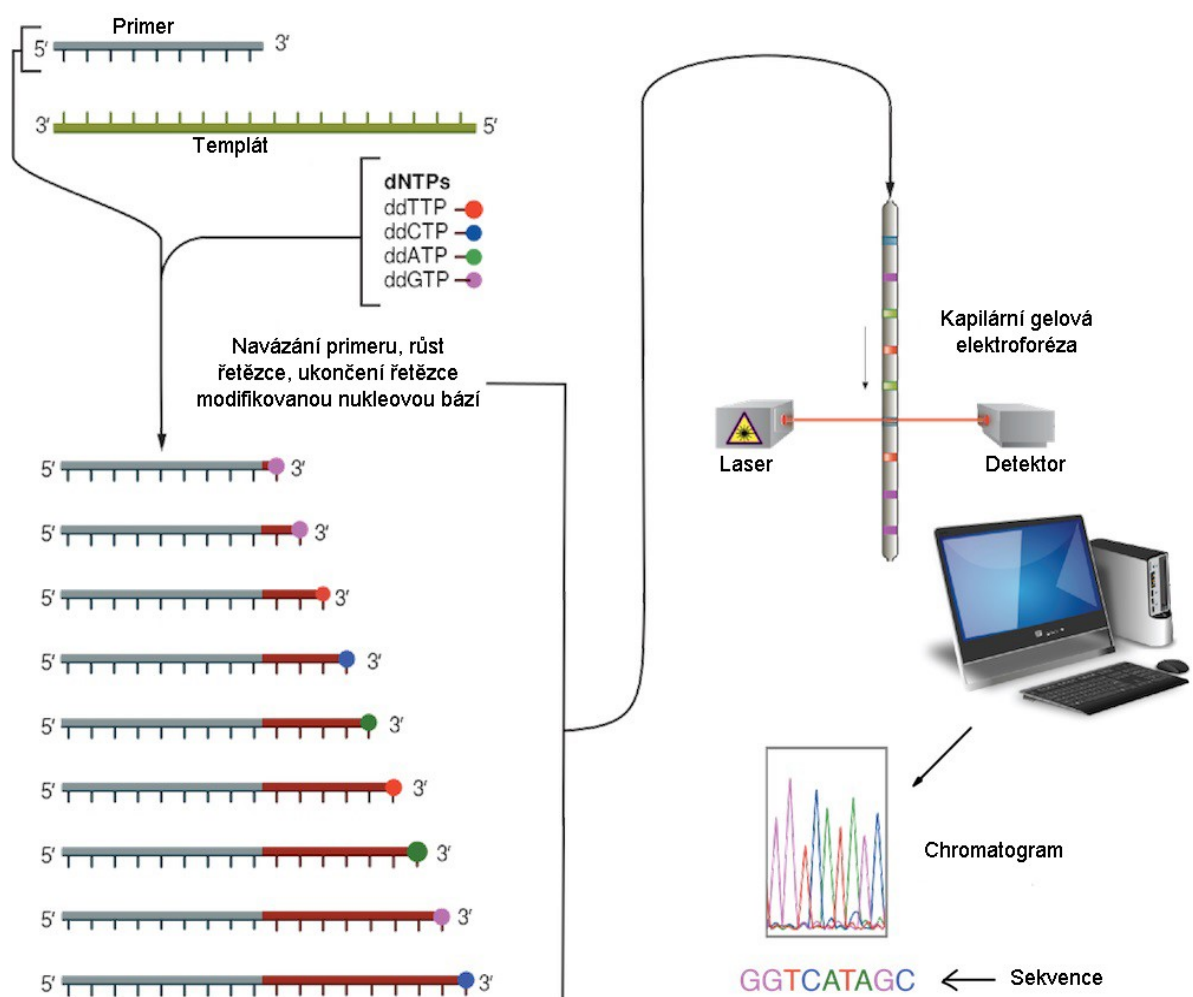
#### **2.1.2.2 Sekvence 16S rDNA**

Klasifikace bakterií podle genu 16S rDNA se provádí kvůli jeho přítomnosti ve všech prokaryotických buňkách a je specifický pro daný taxon (Rivas *et al.*, 2004).

Na začátku identifikace se provádí izolace nukleových kyselin (NK). K získání NK je nezbytná lýze buněk, nejčastěji pomocí lysozymu a detergentů. Po lýze se buněčný obsah uvolní do roztoku. Dalším krokem je vysrážení organických a anorganických sloučenin kromě deoxyribonukleové kyseliny (DNA) pomocí reagentu. Po odstranění vysrážených sloučenin se do roztoku s DNA přidá solný roztok, který zajistí připojení DNA na filtr v kolonce, do které se vloží. Následně se DNA na kolonce promývá roztokem etanolu, který odstraní solné zbytky a případné kontaminanty. Vyčištěná DNA na kolonce se poté uvolní elučním pufrem (Elisabeth Pharmacon, spol. s r.o.UltraClean™, 2007). Takto připravená DNA se pomnoží pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

Před zahájením samotné PCR se DNA smíchá s polymerázou, primery, reakčním pufrem a vodou. Používají se dva primery FD1 a RD1, z nichž jeden roste ve směru replikace (forward) a druhý roste naopak (reverse). PCR je zahájena rozpletením dvoušroubovice DNA pomocí denaturace způsobenou zvýšenou teplotou, následně se komplementárně naváží primery (annealing) a polymeráza začne produkovat dceřiný řetězec (elongace). Po vytvoření replik je dokončen první cyklus PCR. V dalších cyklech se rozplétá mateřská DNA i její repliky. Cílová sekvenace je ovšem poprvé vytvořena až v třetím cyklu PCR, protože v prvních dvou cyklech alespoň jeden řetězec končí na neurčitém úseku (McPherson a Møller, c2006).

Po namnožení DNA se určuje pořadí nukleotidů pomocí Sangerova sekvenování (Obr. 2). Tuto metodu objevil v roce 1977 Frederick Sanger, který za ni dostal svou druhou Nobelovu cenu. Při této metodě se opakovaně syntetizuje řetězec DNA podle templátu, který je opakovaně přerušován náhodným zařazením modifikované nukleové báze (dideoxynukleotidu). Dideoxynukleotid zabrání DNA polymeráze dále syntetizovat rostoucí vlákno a má na sobě navázanou specifickou fluorescenční barvu pro daný nukleotid. Opakovaným přerušováním syntézy DNA se získá směs různě dlouhých molekul, které svou velikostí odpovídají všem možným pozicím bázím. Seřazením těchto molekul dle velikosti a sledováním odlišného fluorescenčního označení nukleotidů lze přečíst pořadí bází (Kolísko, 2017).



Obr. 2. Schéma Sangerovy sekvenace (Estevezj, 2012; upraveno dle Kolisko, 2017).

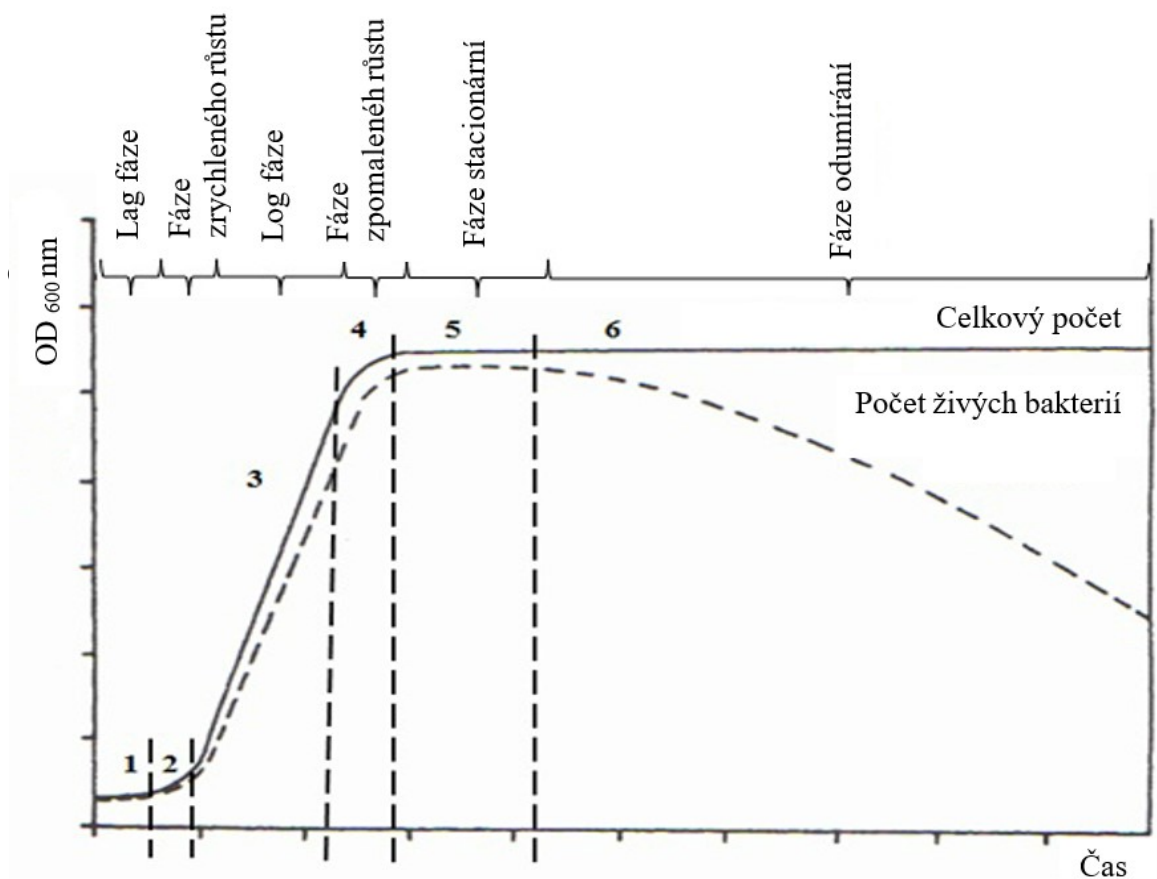
### 2.1.2.3 Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF)

Je rychlá metoda, jejíž proces je založen na analýze ribozomálních proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. Tyto proteiny jsou specifické pro jednotlivé druhy bakterií, a proto jsou vhodné pro identifikaci.

Pro identifikaci pomocí MALDI-TOF se nejprve vyextrahují proteiny z mikroorganismů, které jsou následně naneseny na ocelovou destičku, na které se vzorek nechá vysušit. Poté se destička vloží do hmotnostního spektrometru. Potom vzorek ozáří dusíkatý laser, který uvolní nabité proteiny ze vzorku. Tyto proteiny jsou urychlovány pomocí silného elektrického pole a letí k detektoru. Rychlost letu je úměrná jejich náboji a hmotnosti. Měří se čas jejich letu, tj. od zapůsobení laseru po dopad na detektor. Z tohoto měření se získá hmotnostní spektrum, které je specifické pro daný mikroorganismus a následně se srovná s profily mikroorganismů v databázi (Nyč a Bubeníček, 2015).

### 2.1.3 Růst bakterií

Růst bakterií lze popsat sledováním počtu buněk či spektrofotometrickým měřením optické denzity v čase pomocí růstové křivky (Obr. 3), kterou můžeme rozdělit na fáze množení. V první lag fázi se buňky po naočkování přizpůsobují novým podmínkám a přepíná se jejich metabolismus na aktivní. V této fázi se buňky nemnoží (Schindler, 2014). V druhé fázi zrychlení se začnou bakterie dělit a rychlost růstu roste (Ambrožová, 2004). Následuje exponenciální fáze, ve které je rychlost růstu konstantní a počet buněk roste exponenciálně. Někdy se této fázi říká logaritmická. Poté se rychlost množení zpomaluje až se populace dostane do stacionární fáze, kdy buněk nepřibývá ani neubývá. Nakonec nastává fáze odumírání (Schindler, 2014).



Obr. 3. Růstová křivka. Plná čára – celkový počet mikroorganismů (živých i mrtvých), přerušovaná – počet živých mikroorganismů (Kopecká a Rotková, c2017).

### 3 MOŽNOSTI DETEKCE BIOFILMŮ

Biofilm pozitivní mikroorganismy vytváří na sledovaných materiálech silně adheující vrstvu. Schopnost vytvářet biofilm a stanovovat jeho množství můžeme určit řadou metod. Ovšem některé jsou velmi náročné k provedení a potřebují speciální vybavení (Rulík *et al.*, 2011). Určení množství biofilmu může představovat problém i z důvodu udržení kultivačních podmínek, protože i nepatrná změna kultivačních podmínek ovlivňuje výsledky měření (Freeman, Falkiner a Keane, 1989).

Před hodnocením biofilmu je nutné se zbavit planktonické fáze promytím vzorku. Promývání je důležitým krokem, protože zabraňuje ovlivňování výsledků vlivem usazených planktonických buněk (Gomez-Suarez, Busscher a van der Mei, 2001). Avšak při prudším promývání může docházet k uvolňování biofilmu až k falešným negativním výsledkům (Busscher a van der Mei, 2006). Často se biofilm hodnotí po obarvení barvivem např. krystalovou violetí nebo safraninem (Ommen, Zobek a Meyer, 2017). Před obarvením je vhodné vzorek fixovat, aby nedocházelo k odlučování biofilmu během barvení. Fixuje se usušením či chemicky např. pomocí Bouinova roztoku, alkoholu či acetonu (Baldasseri *et al.*, 1993).

#### 3.1 Mikroskopické metody

Mikroskopické metody jsou vhodné především k studiu struktury, tvorby a fyziologie biofilmu. Světelná mikroskopie je nejstarší metoda sledování biofilmu, kterou používal již v 17. století Anthony van Leuwenhoek pro sledování zubního plaku (Costerton, Stewart a Greenberg, 1999). Pro lepší sledování se jednotlivé biofilmové struktury i druhy bakterií odlišují barvením, např. extracelulární matrix lze barvit alcianovou modří (Davies *et al.*, 1998). Tuto metodu nelze použít pro sledování širších biofilmů (nad 5–10  $\mu\text{m}$ ) a biofilmů na neprůhledných materiálech, avšak lze použít speciální mikroskopické metody. Biofilmy na neprůhledných materiálech můžeme pozorovat v odraženém světle fluorescenčního mikroskopu (epifluorescence) a široké biofilmy lze sledovat např. pomocí konfokální skenovací laserové mikroskopie (CSLM) (Rulík *et al.*, 2011).

Fluorescenční mikroskopie též umožňuje sledování biofilmu a jeho složek pomocí barvení fluorescenčními barvivy. Použitím barviv lze posoudit i metabolickou aktivitu a životaschopnost např. rozdílnou fluorescencí akridinové oranže navázané na DNA. Dalším způsobem odlišení živých buněk od mrtvých je pomocí např. propidia jodidu, který nedokáže projít neporušenou cytoplazmatickou membránou, proto proniká jen do mrtvých buněk, kde

se váže na DNA (Williams *et al.*, 1998). Propidium jodid je červeně fluoreskující nukleová kyselina, která excituje při vlnové délce 490 nm a jeho emise je 635 nm. Pro obarvení všech buněk lze použít zeleně fluoreskující nukleovou kyselinu SYTO® 9, která excituje při vlnové délce 480 nm a její emise je 500 nm. Použitím propidia jodidu spolu s SYTO® 9 snižuje fluorescenci barviva SYTO® 9, čímž lze odlišit červeně fluoreskující mrtvé buňky od zelených živých buněk (Molecular Probes, Inc. LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits, c2004).

### 3.2 Diagnostické půdy

Průkaz biofilmu lze provést na agaru s kongo červení (CRA). Tato metoda sleduje tvorbu extracelulárního polymerního matrixu. Silná produkce se projeví růstem suché, černé kolonie; slabí producenti rostou v lesklých, pigmentovaných koloniích a biofilm negativní mikroorganizmy v lesklých červených koloniích (Freeman, Falkiner a Keane, 1989). Jedná se o orientační metodu, která je zatížena subjektivní chybou při posuzování vzhledu kolonie a výsledek ovlivňuje i koncentrace jednotlivých složek agarů a šarže kongo červení (Růžička *et al.*, 2004). Kvůli tomu bylo vyvinuto několik modifikací CRA. Pro lepší tvorbu extracelulárního polymerního matrixu se CRA obohacuje o sacharózu (Ferreira *et al.*, 2014). Také existuje modifikovaný CRA (mCRA), který oproti CRA obsahuje jinou koncentraci kongo červeně, sacharózu nahrazuje glukóza a mozko-srdcový agar (BHIA) je nahrazen krevním agarovou bází 2 (BAB-2) (Mariana *et al.*, 2009). Byl vymyšlen i vankomycinový CRA (CRAvc), jedná se o CRA obohacený o sacharózu, glukózu, chlorid sodný (NaCl) a vankomycin (Kaiser *et al.*, 2013). Nízká koncentrace vankomycinu působí jako stresový faktor (Nunes *et al.*, 2006), což vede k větší produkci biofilmu (Cargill a Upton, 2009). Složení jednotlivých CRA jsou uvedena v (Tab. 1).

Tab. 1. Složení diagnostického agarů s kongo červení.

Chemikálie	CRA	mCRA	CRAvc
Kongo červeně	0,8 g	0,4 g	0,8 g
Sacharóza	36 g	-	50 g
Glukóza	-	10 g	20 g
BHIA	52 g	-	52 g
BAB-2	-	40 g	-
Destilovaná voda	1000 ml	1000 ml	1000 ml
NaCl	-	-	15 g
Vankomycin	-	-	0,5 g

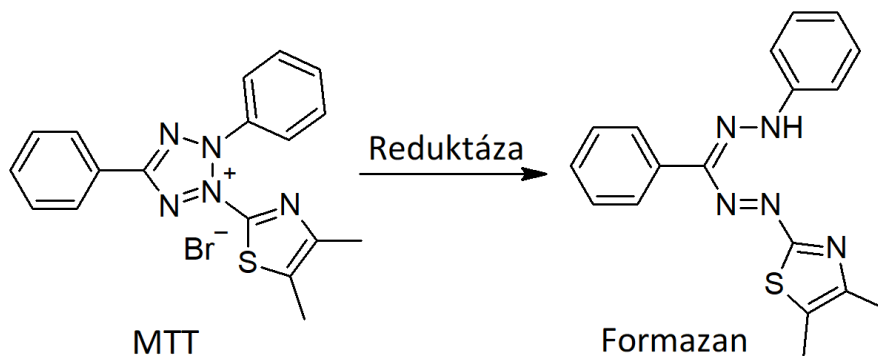


### 3.3 Spektrofotometrické metody

Hodnocení obarveného či neobarveného biofilmu pouhým okem je velice subjektivní, proto se množství biofilmu hodnotí spektrofotometricky. Neobarvené preparáty lze hodnotit měřením transmitance, která je způsobena přítomností biofilmu a srovnat ji s kontrolním vzorkem bez biofilmu (Tumbarello *et al.*, 2007).

Častěji se hodnotí obarvený preparát, kdy se před měřením barvivo z biofilmu vyluhuje etanolem či kyselinou octovou a poté se měří intenzita zbarvení výluhu (Stepanović *et al.*, 2007). Hojně používanou metodou založenou na tomto principu je Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách. Tato metoda je modifikací Christensenovy zkumavkové metody (CTT). Obě Christensenovy metody využívají k obarvení biofilmu krystalovou violet, avšak CTT slouží pouze prokázání biofilm pozitivita, kde se pozitivní výsledek projeví fialovým obarvením stěn, které se sleduje pouhým okem. U Christensenovy metody v mikrotitrační destičce se obarvený povrch jamek vyluhuje etanolem a zbarvení, které odpovídá velikosti biofilmu a obarveného povrchu destičky, se hodnotí spektrofotometricky. Výsledná velikost biofilmu se získá odečtením absorbance referenční jamky (bez mikroorganismu) od absorbance testované jamky (Christensen *et al.*, 1985).

Spektrofotometricky lze sledovat množství živých buněk v biofilmu na základě jejich metabolické aktivity. Často se využívá schopnosti mikroorganismů redukovat vhodný substrát (Chandra *et al.*, 2001). Na této schopnosti je založen MTT test, kde živé buňky redukují žlutý 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) na fialový formazan (Obr. 4), který je ve vodě nerozpustný a zůstává uvnitř buněk ve formě granulí. Formazan se následně rozpouští pomocí dimethylsulfoxidu (DMSO). Barva výluhu je přímo úměrná množství živých buněk a stanovuje se spektrofotometricky. Na redukci rozdílných tetrazoliových solí např. 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-karboxanilid (XTT), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium (MTS) a 2-(4-jodfenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium (WST-1) jsou založeny i další metody jako je XTT, MTS a WST-1 (Riss, 2018).



Obr. 4. Mechanismus MTT metody.

### 3.4 Molekulárně genetické metody

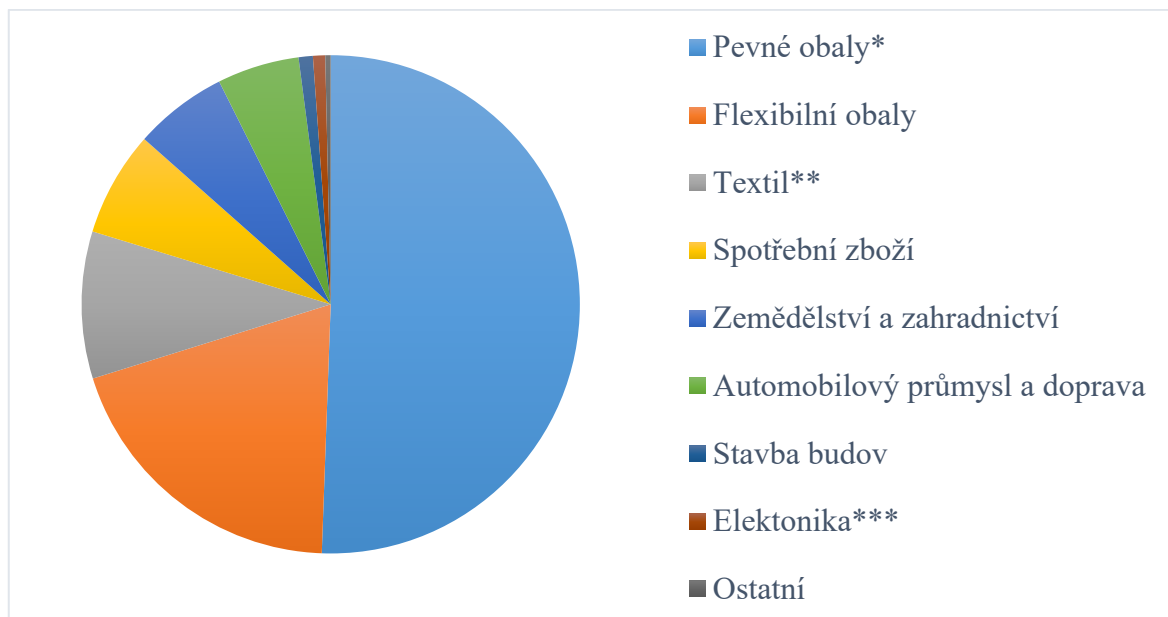
Pro vznik biofilmu hrají důležitou roli geny, které jsou potřebné pro adhezi či se podílejí na tvorbě extracelulárního matrixu. Schopnost vytvářet biofilm můžeme prokázat na základě přítomnosti těchto genů pomocí PCR. Příkladem těchto genů jsou geny *ica* operonu u stafylokoků, které jsou zodpovědné za tvorbu extracelulárního polymerního matrixu (Frebourg *et al.*, 2000). Ovšem některé kmeny stafylokoků tvoří biofilm, přestože jim geny *ica* operonu chybí (O'Gara, 2007). Lepší metodou k prokázání schopnosti biofilmu je reverzně-transkripční PCR s gelovou detekcí či real time PCR, kde velikost exprese daného genu je přímo úměrná množství vzniklého produktu (Handke *et al.*, 2004).

U mnoha mikroorganismů jsou molekulárně genetické metody komplikovány velkým množstvím genů, které se podílejí na tvorbě biofilmu a určit které geny z nich jsou klíčové je obtížné (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004).

## 4 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY

Pod označením biodegradabilní polymery byly poprvé přivedeny na trh v 80. letech 20. století běžně prodávané polyolefiny smíchané se škrobem či jinými organickými aditivy. Tyto aditiva dokáží mikroorganismy metabolizovat a tím rozložit polymer na malé fragmenty polyolefinů, avšak ho nedokáží zcela rozložit. Na tuto skutečnost upozornil v roce 1994 Narayan *et al.*, což vedlo k různým definicím biodegradabilních polymerů a biodegradace (Rudnik, c2008). Podle Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) je biodegradace degradace způsobená biologickou aktivitou, především enzymy, vedoucí ke změně chemické struktury materiálu (ISO 472:2013, 2013). Avšak mnoho definic se shoduje s Japonskou bioplastickou asociací (JBPA) a říká, že biodegradabilní polymer je rozložitelný pomocí mikroorganismů na oxid uhličitý či metan a vodu (Rudnik, c2008). Ovšem ISO se s těmito definicemi shoduje v pojmu biologické recyklace, což definuje jako aerobní (kompostování) či anaerobní (trávení) zpracování biodegradabilních polymerních odpadů za řízených podmínek a použití mikroorganismů za vzniku stabilizovaných organických zbytků, oxidu uhličitého a vody za přítomnosti kyslíku nebo za vzniku stabilizovaných organických zbytků, oxidu uhličitého, metanu a vody v anaerobních podmínkách (ISO 472:2013, 2013). Biodegradabilní polymery bývají zařazováni do biopolymerů spolu s nebiodegradabilními polymery syntetizovanými z přírodních zdrojů (Biopolymers facts statistics 2018, 2018).

Dnes, s rostoucím negativním pohledem na znečištění životního prostředí polymery, nachází biodegradabilní polymery stále větší uplatnění především v oblasti obalových materiálů, zemědělství a lékařství (Vroman a Tighzert, 2009). V roce 2017 představovala největší produkci biopolymerů výroba pevných obalů (51 %) a flexibilních obalů (20 %), viz (Obr. 5). Největším producentem je Asie, která v roce 2017 vyrobila 66,8 % z celkové produkce biopolymerů, druhá byla Severní Amerika (12,3 %) a třetí Evropa (11,6 %) (Biopolymers facts statistics 2018, 2018).



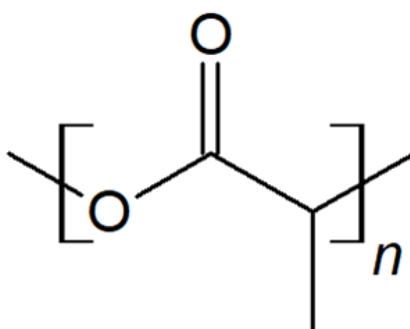
Obr. 5. Celosvětová produkce biopolymerů pro jednotlivé aplikace v roce 2017 (\* včetně jídelního servisu, \*\* včetně netkaných textiliích a vláken, \*\*\* včetně pouzdra) (Biopolymers facts statistics 2018, 2018; upraveno).

#### 4.1 Biodegradabilní druhy polymerů

Existuje mnoho druhů biodegradabilních polymerů, které jdou rozdělit podle zdroje na přírodní a syntetické. Do přírodních se řadí polymery živočišného původu např. kolagen, chitin; bakteriálního např. polyhydroxyalkanoát, polyhydroxybutyrát a rostlinného např. celulóza, škrob a lepek. Do synteticky vyráběných biodegradabilních polymerů patří konvenční polymery obohacené o aditiva způsobující degradaci, kde jsou často používanými přísady prooxidační přísady způsobující oxodegradaci (Vroman a Tighzert, 2009). Mezi syntetické polymery patří polymery s hlavními řetězci podléhající hydrolyze např. některé polyestery (polyglykolid, polylaktid, polybutylensukcinát), polyamidy, polyuretany a polyanhydridy. Dále se do syntetických biodegradabilních polymerů zařazují polymery s karbonovými hlavními řetězci, které nemohou podléhat hydrolyze, ale vyžadují oxidační proces pro biodegradaci např. vinylové polymery. Biodegradabilní vinylové polymery většinou obsahují oxidovatelnou funkční skupinu a přidává se k nim katalyzátor podporující jejich oxidaci (Chandra a Rustgi, 1998). Biodegradabilní vinylový polymer je polyvinylalkohol, který je rozpustný ve vodě, a proto může být snadno rozkládán mikroorganismy (Watanabe *et al.*, 1976).

#### 4.1.1 Kyselina polymléčná (PLA)

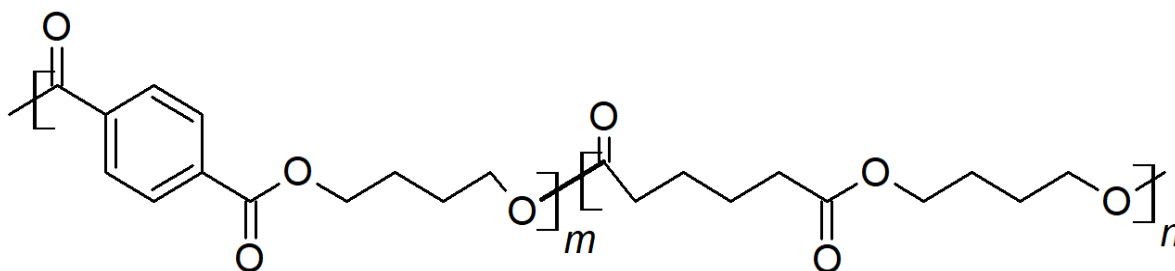
Neboli polylaktid (Obr. 6) je hydrofobní polymer, protože obsahuje metylové postranní skupiny. Má teplotu skelného přechodu 63,8 °C, prodloužení při přetržení je 30,7 % a pevnost v tahu je 32,22 MPa (Briassoulis, 2004). Vzniká polykondenzací kyseliny mléčné nebo polymerizací cyklického dimeru kyseliny mléčné, nazývaným laktid (Lopes, Jardini a Filho, 2014). Má široké využití v potravinářství např. výroba obalových materiálů, jednorázového nádobí, nosič léčiv ve farmaceutickém průmyslu, šicí materiál k suturám ran, výroba scaffoldů v tkáňovém inženýrství (Sin, Rahmat a Rahman, 2013).



Obr. 6. PLA.

#### 4.1.2 Poly(butylen adipát-co-tereftalát) (PBAT)

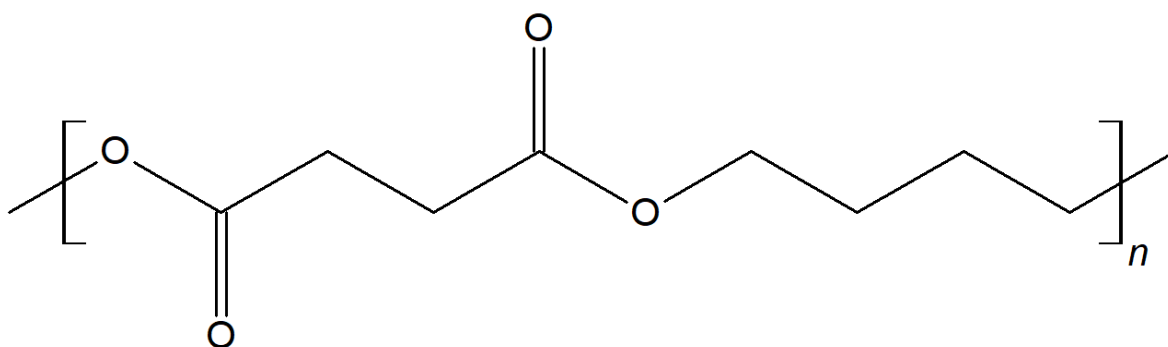
Byl vyvinut v roce 1998 společností BASF z Německa pod obchodním názvem Ecoflex®. PBAT (Obr. 7) je termoplastický kopolymer založený na fosilních produktech. Je vyroben z 1,4-butandiolu, kyseliny adipové a kyseliny tereftalové. Používá se v potravinářském průmyslu, protože je zdravotně nezávadný. Má výborné mechanické vlastnosti podobné polyetylenu, je odolný proti roztržení, vlhkosti a je flexibilní (Rieger a Amann, c2012). Jeho teplota tání je 117 °C, teplota krystalizace 81 °C a teplota skelného přechodu - 20 °C (Muthuraj, Misra a Mohanty, 2015).



Obr. 7. PBAT.

### 4.1.3 Polybutylen-sukcinát (PBS)

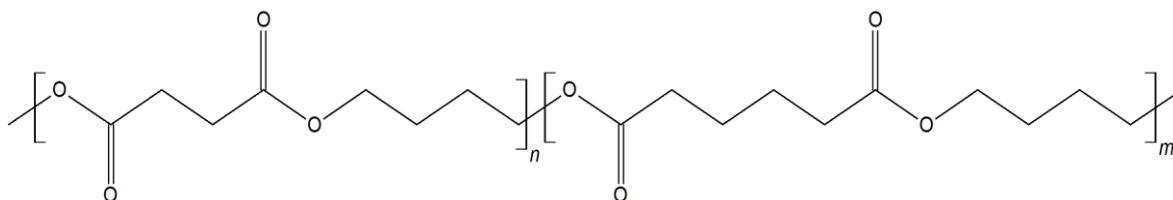
Jedná se o termoplastický polyester, který vzniká polykondenzací kyseliny jantarové a 1,4-butandiolu (Puchalski., 2018). PBS (Obr. 8) byl poprvé syntetizován v roce 1990 pod obchodním názvem Bionolle® společností Showa High Polymer z Japonska. Jeho teplota tání je od 90 °C do 120 °C, teplota skelného přechodu od -45 °C do -10 °C. Prodloužení při přetržení je 330 % a pevnost v tahu je 32,36 MPa (Vroman a Tighzert, 2009). Lze jej využít jako obalový materiál potravin, v zemědělství na mulčovací folie, květináče a další (Habib Ullah, Mahadi a Latef, 2015).



Obr. 8. PBS.

### 4.1.4 Polybutylen-sukcinát adipát (PBSA)

Jde o kopolyester, který vzniká z kyseliny jantarové, kyseliny adipové a 1,4-butandiolu (Ahn *et al.*, 2001). Získává se kopolymerací PBS s kyselinou adipovou (Vroman a Tighzert, 2009). Zavedením adipátu do řetězce PBS se sníží pevnost v tahu a zvýší se prodloužení (Tserki *et al.*, 2006). Jeho teplota tání je 96 °C a teplota skelného přechodu je -45 °C (Xu a Guo, 2010). PBSA (Obr. 9) je lépe biologicky rozložitelný než ostatní materiály kvůli nižší krystalinitě. Používá se na výrobu folií použitelných v zemědělství, nákupních tašek a obalových materiálů (Puchalski *et al.*, 2018).

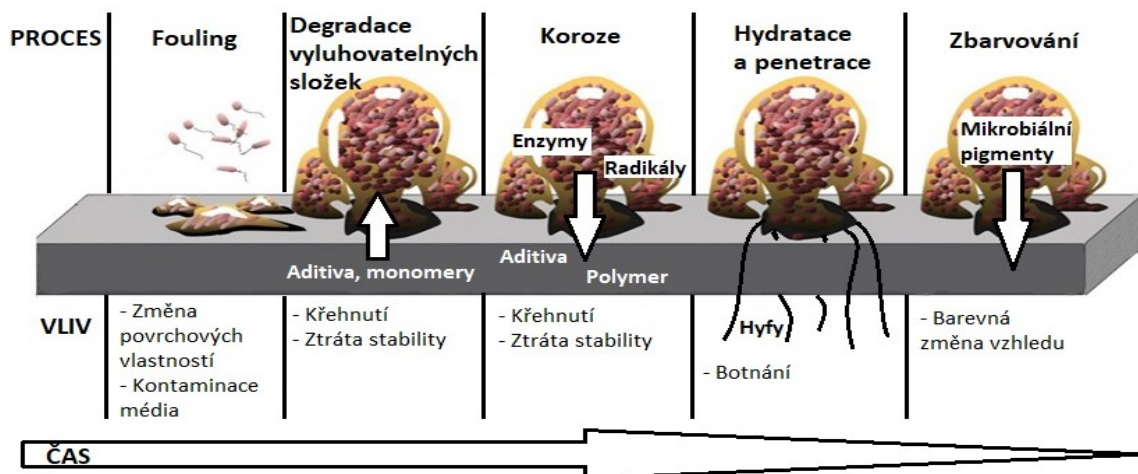


Obr. 9. PBSA.

## 4.2 Růst biofilmu na polymerním materiálu

Schopnost růstu biofilmu na materiálech se nazývá fouling a ovlivňuje jej řada materiálových vlastností (Dürr a Thomasson, 2010). Počátek tvorby biofilmu ovlivňuje hydrofobnost materiálu, která podporuje adhezi hydrofobních buněk (Cerca *et al.*, 2005). Důležitým faktorem je i povrch materiálu. Drsné a pórovité materiály pozitivně působí na růst biofilmu, protože poskytují buňkám ochranu při adhezi a růstu před proudící okolní kapalinou. (Rulík *et al.*, 2011). Do polymerních materiálů se často přidávají chemické příměsi např. antioxidanty, maziva, stabilizátory, pigmenty, které zlepšují vlastnosti materiálu (Brocca, Arvin a Mosbæk, 2002). Tyto příměsi ovšem mohou pronikat do okolního prostředí a poskytovat živiny pro mikroorganismy a tím i zvyšovat tvorbu biofilmu na polymerech. Bylo například prokázáno, že příměsi fosforu zvyšují tvorbu biofilmu na polyvinylchloridu ve vodách s nízkým obsahem fosforu (Lehtola, Miettinen a Martikainen, 2002).

Přítomnost biofilmu může poškozovat polymer a může vést k jeho biodegradaci (Obr. 10). Polymery s vysokou molární hmotností jsou obtížněji biodegradabilní, protože jsou špatně rozpustné a nedokáží projít přes buněčnou stěnu membránu, kde by byly enzymaticky degradovány. Na degradaci se podílí i extracelulární enzymy, ovšem v menší míře. Lépe podléhají biodegradaci v přírodě biologicky syntetizované polymery než syntetické (Gu, 2003). Působení biofilmu především na biodegradabilních polymerů vede ke změně mechanických vlastností např. pevnosti v tahu. U nebiodegradabilních polymerů téměř nedochází ke změně mechanických vlastností, ale porůstání jejich povrchu vede ke zvětšení jejich hmotnosti, což u polyolefinů, které díky své nízké hustotě normálně plavou na vodě, vede k potápění materiálu ke dnu ve vodě. Proto je víc znečištěno dno oceánů než hladina, přestože většina odpadů v oceánech tvoří polyolefiny (Pauli *et al.*, 2017).



Obr. 10. Mechanismus biodegradace polymerů (Davis, 2007; upraveno dle Flemming, 1998).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 5 MATERIÁL

### 5.1 Testované biodegradabilní polymery

Testovaným materiálem byly zvoleny biodegradabilní polymery poskytnuté prof. Mgr. Markem Koutným, Ph.D., které byly ve formě folií vzniklých lisováním. Byla zvolena velikost rámečků 125 x 125 mm. Lisování probíhalo po dobu 10 minut v ručním lisu a následné chlazení v lisu s vodním okruhem po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Použité materiály a teploty lisování jsou uvedeny v (Tab. 2). Polymery byly testovány spolu se sklem o původní velikosti 24 x 32 x 0,15 mm (Hirschmann® Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Německo). Poté byly z fólií a skla vyříznuty čtvercové vzorky o ploše 25 mm<sup>2</sup>. Před testováním byly vzorky zbaveny případné nežádoucí kontaminace pomocí namočení do 96% etanolu (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) po dobu 20 minut.

Tab. 2. Teploty lisování pro použitý materiál.

Materiál	Teplota lisování (°C)
PLA (NatureWorks, Minnetonka, USA)	185
PBAT Ecoflex® (BASF, Ludwigshafen, Německo)	180
PBS G4560 (IRe Chemical Ltd., Seoul, Jižní Korea)	170
PBSA (IRe Chemical Ltd., Seoul, Jižní Korea)	170

### 5.2 Testované bakteriální kultury

Byly použity bakteriální kmeny získané izolací z mléčných výrobků poskytnuté Výzkumným ústavem mlékárenským z Prahy. Jelikož se jednalo o neznámé bakteriální kmeny, byla provedena identifikace pomocí sekvenace 16S rDNA a MALDI-TOF. U CRA metody byl pro srovnání použit biofilm pozitivní kmen *Escherichia coli* CCM 3954 (EC) z České sbírky mikroorganismů (CCM).

### 5.3 Použité kultivační média

#### 5.3.1 Mozko-srdcová infuze

BHI (Himedia, Bombaj, Indie) byl použit u všech metod testování kromě mCRA a byl též použit na kultivaci testovaných kmenů bakterií. Finální pH BHI při 25 °C činí  $7,4 \pm 0,2$ . Složení tohoto bujónu je:

Látka	Množství (g/l)
Telecí mozek, infuzní forma	200,00
Hovězí srdce, infuzní forma	250,00
Proteosový peptid	10,00
Dextróza	2,00
Chlorid sodný	5,00
Fosforečnan sodný	2,50

### 5.3.2 Krevní agarová báze 2

BAB-2 (Himedia, Bombaj, Indie) bylo použito pouze na mCRA. Finální pH BAB-2 při 25 °C je  $7,4 \pm 0,2$ . Složení tohoto agaru je:

Látka	Množství (g/l)
Proteosový peptid	15,00
Extrakt z jater	2,50
Výtažek z kvasnic	5,00
Chlorid sodný	5,00
Agar	15,00

### 5.3.3 Agarová báze *Bacillus cereus*

K identifikaci kmenů *Bacillus cereus* byl použit selektivně diagnostická půda Agarová báze *Bacillus cereus* (Himedia, Bombaj, Indie). Finální pH tohoto agaru při 25 °C je  $7,2 \pm 0,2$ . Složení tohoto agaru je:

Látka	Množství (g/l)
Pepton	1,00
Mannitol	10,00
Chlorid sodný	2,00
Síran hořečnatý	0,10
Fosforečnan sodný	2,50
Fosforečnan draselný	0,25
Pyruvát sodný	10,00
Bromthymolová modř	0,12
Agar	15,00

## 6 KULTIVAČNÍ METODY

### 6.1 Identifikace testovaných bakterií

#### 6.1.1 Fenotypové metody

Před každým testováním bylo provedeno pro zkontrolování čistoty bakteriální kultury barvení dle Grama podle Grover-Lakomia a Fong, (c1999) a byl sledován tvar a případná přítomnost spor bakterií pomocí optického mikroskopu.

Také byla stanovena růstová křivka, a tudíž posuzován růst bakterií pomocí měření optické denzity po 30 minutách přístrojem Tecan Infinite® 200 PRO (Tecan, Männedorf, Švýcarsko). Kultivace probíhala 24 hodin při vlnové délce 600 nm a teplotě 30 °C. Pro otestování a identifikaci grampozitivní tyčinky R25 byla použita selektivně diagnostická půda (Agarová báze *Bacillus cereus*). Po 24 hodinách kultivace při 30 °C byla posouzena barva kolonií.

#### 6.1.2 Sekvence 16S rDNA

Byla provedena izolace DNA pomocí UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kitu (Elisabeth pharmacon, Brno, Česká republika). Na začátku izolace bylo 1,8 ml bakteriální kultury v 2ml mikrozkušavce centrifugováno při 10 000 ot/min 30 sekund, následně byl odstraněn supernatant a kultura byla znovu centrifugována. Poté byl vzorek rozsuspendován ve 300 µl rozbíjecího pufru (MicroBead Solution) a jemně zvortexován a přenesen do rozbíjecí mikrozkušavky (MicroBead tube), kde k němu bylo přidáno 50 µl roztoku MD1. Vzorek byl zahřát na teplotu 65 °C po dobu 10 minut a následně vortexován v horizontální poloze při maximálních otáčkách po dobu 10 minut. Potom byl zcentrifugován 30 sekund při 10 000 ot/min. Supernatant byl následně přenesen do čisté 2ml mikrozkušavky, kde k němu bylo přidáno 100 µl roztoku MD2 a zvortexován 5 sekund. Dále byl vzorek inkubován 5 minut při teplotě 4 °C. Poté byl centrifugován 1 minutu při 10 000 ot/min. Veškerý supernatant byl přenesen do čisté 2ml mikrozkušavky a bylo k němu přidáno 900 µl roztoku MD3 a zvortexován 5 sekund. Potom byl postupně přefiltrován přes kolonku přenášením po 700 µl získaného roztoku do kolonky a centrifugací při 10 000 ot/min 30 sekund a odstraněním přefiltrovaného roztoku. Následně bylo do kolonky přidáno 300 µl roztoku MD4 a centrifugován 30 sekund při 10 000 ot/min, poté odstraněn přefiltrovaný roztok a znovu centri-

fugován 1 minutu při 10 000 ot/min. Potom byla přenesena kolonka do nové 2ml mikrozku-mavky, bylo přidáno 50  $\mu$ l roztoku MD5 do středu bílé membrány uvnitř kolonky a centri-fugován 30 sekund při 10 000 ot/min. Po centrifugaci byla odstraněna kolonka z mikrozku-mavky. Takto vyizolovaná DNA byla připravena pro pomnožení genu 16S rDNA pomocí PCR.

Pro PCR byla připravena PCR směs obsahující 7 ml PCR vody, 10 ml Master mixu (GoTaq® Hot Start Green MasterMix), 1ml primeru FD1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 1 ml primeru RD1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a 1 ml vyizolované DNA. Následně probíhala tzv. touchdown PCR podle programu v (Tab. 3) pomocí přístroje Aeris™ Aeris Thermal Cycler (ESCO, Singapur, Singapur). Při touchdown PCR probíhá annealing v prv-ních cyklech při vyšší teplotě, než je ideální pro annealing daného primeru, což vede sice k malému výtěžku produktu, ale za to jsou tyto produkty specifické. Poté se annealing po-stupně snižuje o 0,5 °C při každém cyklu až na optimální teplotu, při které mohou vznikat i nespecifické produkty, protože specifické produkty jsou již ve vzorku v nadbytku. Následně byl PCR produkt purifikován komerčním kitem a byl dvakrát připraven vzorek pro sekve-nační reakci vždy s jedním primerem (RD1 nebo FD1) a zaslán do společnosti SEQme s.r.o., kde proběhlo Sangerovo sekvenování. Případné chyby sekvence v histogramu byly oprave-ny v programu DNA Baser Assembler (Heracle BioSofl S.R.L., Mioveni, Rumunsko). Výsledná sekvence byla přikládána k sekvencím uloženým v mezinárodní databázi U.S. Na-tional Library of Medicine pomocí algoritmu BLAST® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tab. 3. Program PCR reakce.

Děj	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	2	1
Denaturace	94	0,5	10
Annealing	57 (-0,5 °C/cyklus)	0,5	
Elongace	72	1,5	
Denaturace	94	0,5	25
Annealing	52	0,5	
Elongace	72	1,5	
Závěrečná extenze	72	10	1
Konec reakce	4	do vytažení	

### 6.1.3 MALDI-TOF

Z 24hodinové kultury na BHI agaru (Himedia, Bombaj, Indie) byly sterilní kličkou odebrány kolonie, následně přeneseny do sterilní ependorfky a rosuspendovány ve 150  $\mu$ l sterilní destilované vody a 450  $\mu$ l 96% etanolu (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika). Takto připravený vzorek byl zaslán do Slovenské poľnohospodárskej univerzity v Nitře, kde byla provedena hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, kterou laskavě provedla a následně z ní zpracovala data prof. Ing. Miroslava Kačániová, PhD.

## 6.2 Stanovení biofilm positivity bakterií

Všechny kvantitativní testy (průkaz biofilmu v mikrotitrační destičce a MTT test) byly provedeny ve třech opakováních pro daný kmen (i referenci) na daném materiálu.

### 6.2.1 Průkaz tvorby biofilmu na agaru s kongo červení

Byly připraveny různé typy CRA dle (Tab. 4) a následně na ně byly rozočkovány testované kmene bakterií. A potom byly kultivovány ve 30 °C a byla sledována barva kolonií v průběhu 7 dnů.

Tab. 4. Složení připravených agarů s kongo červení (S – sacharóza).

Chemikálie	CRA	CRA 3,6 % S	CRA 5 % S	mCRA	CRAvc	CRAbvc	CRAbvc 2 % NaCl
Kongo červen (Lachema, Brno, Československo)	0,06 g	-	-	-	-	-	-
Kongo červen (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	-	0,04 g	0,04 g	0,02 g	0,04 g	0,04 g	0,04 g
Sacharóza (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)	-	1,8 g	2,5 g	-	2,5 g	2,5 g	2,5 g
D-glukóza (Penta, Praha, Česká republika)	-	-	-	0,5 g	1 g	1 g	1 g
BHI (Himedia, Bombaj, Indie)	1,85 g	1,85 g	1,85 g	-	1,85 g	1,85 g	1,85 g
BAB-2 (Himedia, Bombaj, Indie)	-	-	-	2 g	-	-	-
Agar, Typ I (Himedia, Bombaj, Indie)	0,75 g	0,75 g	0,75 g	-	0,75 g	0,75 g	0,75 g
Destilovaná voda	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
NaCl (Lachema, Neratovice, Česká republika)	-	-	-	-	0,75 g	0,75 g	1 g
Edicin® 0,5 g – Vankomycin (Sandoz, Praha Česká republika)	-	-	-	-	0,025 g	-	-

### 6.2.2 Optická mikroskopie

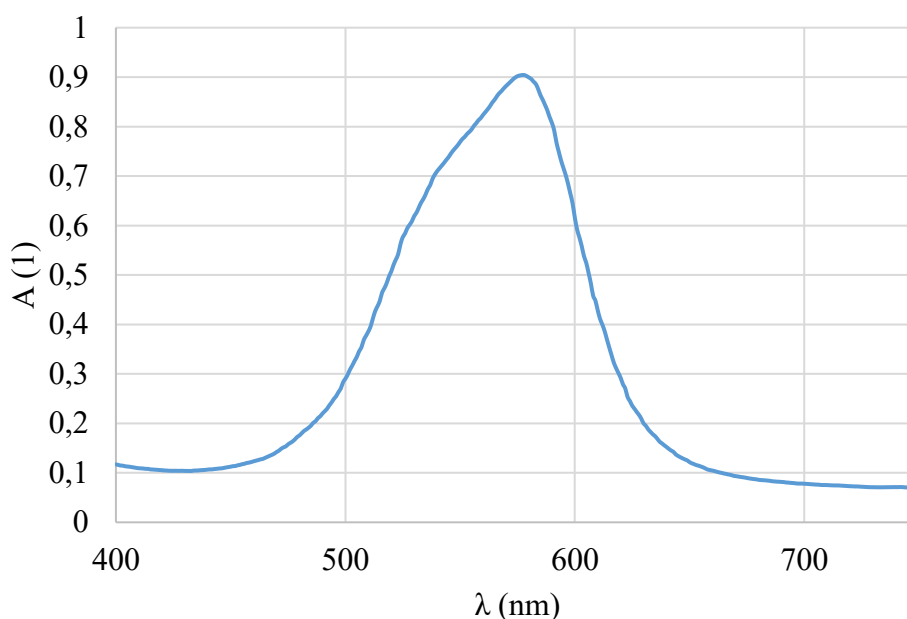
Testovaný materiál byl vložen do sterilní zkumavky s 4 500  $\mu$ l BHI bujónu (Himedia, Bombaj, Indie) a zaočkován 50  $\mu$ l suspenze 24hodinové bakteriální kultury a sterilního fyziologického roztoku o koncentraci 1 stupně McFarland. Po 24 hodinách kultivace při 30 °C a promíchávání na třepačce byl materiál důsledně opláchnut vodou, aby se odstranila přichycená planktonická forma růstu. Následně byl zafixován 200  $\mu$ l 96% etanolu (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) po dobu 20 minut. Potom byl etanol nahrazen 200  $\mu$ l krystalové violeti (Penta, Praha, Česká republika), který se nechal působit 20 minut. Následně byl materiál opláchnut vodou a mikroskopován pod imerzí.

### 6.2.3 Fluorescenční mikroskopie

Začátek průběhu fluorescenční mikroskopie byl jako u optické metody (viz kapitola 6.2.2). Po 24 a 120 hodinách kultivace při 30 °C a promíchávání na třepačce byly roztoky odsáty ze zkumavek a materiál byl důsledně opláchnut vodou, aby se odstranila planktonická forma růstu. Vzorky poté byly nasazeny do roztoku obsahujícího 1 ml destilované vody, 1,5 µl komponentu A obsahujícího 1,67 mM SYTO® 9 a 1,67 mM propidium jodidu v DMSO rozpouštědle (Invitrogen™, Carlsbad, Kalifornie) a 1,5 µl komponentu B obsahujícího 1,67 mM SYTO® 9 a 18,3 mM propidium jodidu v DMSO rozpouštědle (Invitrogen™, Carlsbad, Kalifornie) na několik sekund. Krátká doba barvení byla zvolena z důvodu velké barvitelnosti samotných polymerů. Následně byly vzorky pozorovány fluorescenčním mikroskopem.

### 6.2.4 Průkaz tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce

Průběh průkazu tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce probíhal stejně jako u mikroskopické metody (viz kapitola 6.2.2). Obarvený vzorek byl vložen do zkumavky s 200 µl 96% etanolu (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika), který rozpustil navázané barvivo. Dále bylo přeneseno po 100 µl výluhu do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky a následně byla změřena absorbance při vlnové délce 577 nm s použitím přístroje Tecan Infinite® 200 PRO (Tecan, Männedorf, Švýcarsko). Tato vlnová délka byla zvolena z maxima křivky závislosti absorbance na vlnové délce (Obr. 11). Výsledná tvorba biofilmu byla vyhodnocena do 3 kategorií (netvořící biofilm, se slabou tvorbou biofilmu a se silnou tvorbou biofilmu). Netvořící biofilm měly průměrnou hodnotu absorbance menší než hraniční hodnota, což byla průměrná hodnota referenční hodnoty, tj. bez zaočkování mikroorganizmem spolu se třemi směrodatnými odchylkami. Hraniční hodnota byla zvolena na základě normálního (Gaussova) rozdělení, tj. průměr spolu se 3 směrodatnými odchylkami pokryjí téměř všechny pravděpodobně možné hodnoty (99,7 %) (Meloun a Militký, 2012). Slabá tvorba biofilmu byla do dvojnásobku hraniční hodnoty a nad touto hodnotou byly kmeny posouzeny jako tvořící silný biofilm.



Obr. 11. Závislost absorpance na vlnové délce pro krystalovou violet.

### 6.2.5 MTT test

Příprava vzorku probíhala stejně jako u optické metody (viz kapitola 6.2.2.). MTT prášek (Serva, Heidelberg, Německo) byl rozpuštěn v ultra čisté vodě na koncentraci 5 mg/ml. Opláchnutý materiál byl vložen do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky spolu se 180  $\mu$ l BHI bujónu (Himedia, Bombaj, Indie) a byl přidán MTT roztok. Výsledná koncentrace MTT byla 0,5 mg/ml. Po 4 hodinách působení MTT při 30 °C a promíchávání na třepače byl roztok odsát a nahrazen 200  $\mu$ l DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), který rozpustil vzniklý formazan. Následně bylo odebráno 100  $\mu$ l roztoku formazanu do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky a byla změřena absorpance při vlnové délce 690 nm a odečteno pozadí při 570 nm s použitím přístroje Tecan Infinite® 200 PRO (Tecan, Männedorf, Švýcarsko). Hodnocení probíhalo u této metody stejně jako u průkazu tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce (viz kapitola 6.2.4.).

## 6.3 Vliv kultivačních podmínek na tvorbu biofilmu

V tomto experimentu byl sledován vliv sacharidů na růst testovaných bakteriálních kmenů a jejich produkci biofilmu. Tento parametr byl zvolen na základě modifikací CRA.



Byly připraveny tři druhy BHI bujónů (Himedia, Bombaj, Indie) obohacených o sacharidy. První obsahoval 3,6 % sacharózy (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika), druhý 5 % sacharózy (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) a třetí 5 % sacharózy (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) a 1 % glukózy (Penta, Praha, Česká republika). Z 24hodinové agarové bakteriální kultury byly připraveny roztoky o koncentraci 1 stupně McFarland ve sterilním fyziologickém roztoku. Následně bylo v mikrotitrační destičce smícháno 200  $\mu$ l sterilních obohacených BHI bujónů o sacharidy a 5  $\mu$ l bakteriálních suspenzí. Růst bakterií byl sledován a srovnáván s růstem bakterií v neobohaceném BHI bujónu (Himedia, Bombaj, Indie) pomocí přístroje Tecan Infinite® 200 PRO (Tecan, Männedorf, Švýcarsko). Biofilm byl měřen v intervalech 30 minut, 24 hodin při 600 nm a 30 °C. Poté byla odstraněna planktonická forma růstu důsledným proplachem jamek vodou a byl proveden průkaz tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce krystalovou violetí (Penta, Praha, Česká republika) (viz kapitola 5.2.4).

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

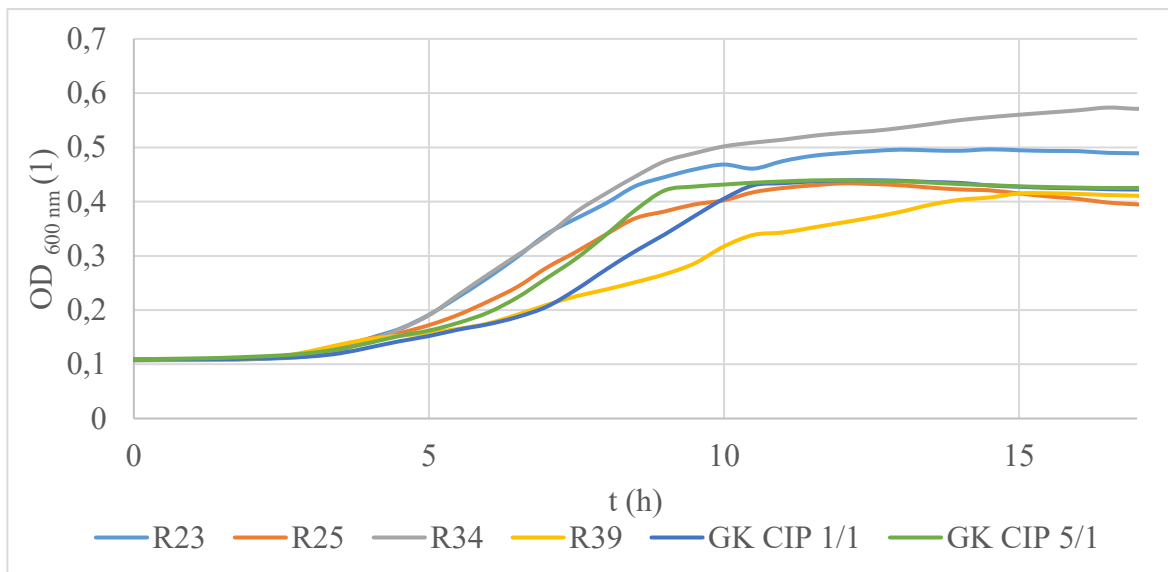
### 7.1 Identifikace bakterií

Identifikace je proces dokazování, že nový izolát patří k jednomu již ustanovenému a pojmenovanému taxonu. Základní podmínkou identifikace je práce s čistou kulturou. Bakteriální identifikace je dnes založen na polyfázové taxonomii, což znamená kombinaci výsledků fenotypových a genotypových metod. Metody studující fenotyp zahrnují např. Gramovo barvení a selektivně diagnostické půdy, kdežto metody studující genotyp zahrnují zejména analýzu DNA např. sekvenace 16S rDNA, PCR, ribotypizace (Sedláček, 2007).

#### 7.1.1 Fenotypové metody

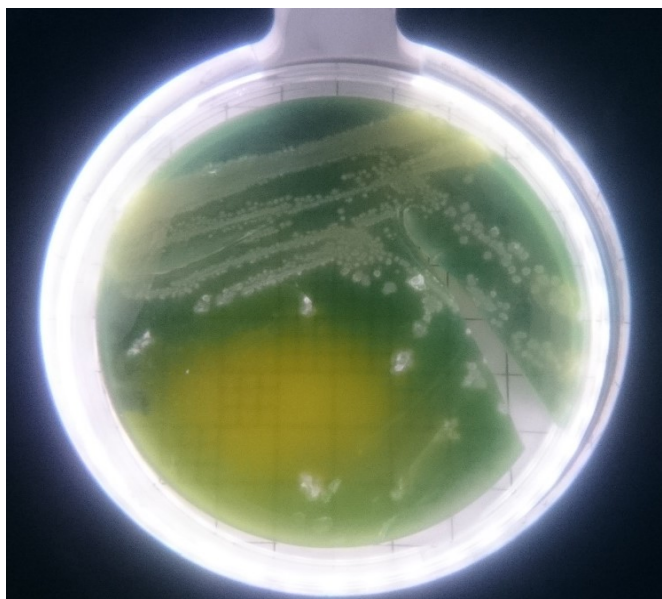
Bylo provedeno barvení dle Grama a bylo zjištěno, že kmeny R23, R25 a R34 jsou grampozitivní tyčinky tvoří spory a R39, GK CIP 1/1 a GK CIP 5/1 jsou gramnegativní tyčinky.

Byl sledován růst jednotlivých bakteriálních kmenů pomocí měření optické denzity (Obr. 12). Sledováním růstu můžeme posuzovat vitalitu a jedinečné růstové chování bakteriálních kmenů. Lag fáze u všech kmenů trvala do 3 hodin od začátku kultivace. Následná fáze zrychleného růstu u kmene R23, R24 a R34 trvala do 4 hodin, u kmene R39 do 3,5 hodiny, u kmene GK CIP 1/1 do 6,5 hodiny a GK CIP 5/1 do 5 hodin. Poté probíhala log fáze, která u R23, R34 a GK CIP 5/1 probíhala do 9 hodin, u R25 do 8 hodin, u GK CIP 1/1 do 10 hodin a u R39 do 14 hodin. Dále nastala fáze zpomaleného růstu, která byla u R23 a R34 do 10 hodin kultivace, u R25 do 11 hodin kultivace, u R39 do 15 hodin kultivace a u kmenů GK CIP 1/1 a GK CIP 5/1 vůbec nenastala. Nakonec nastala fáze stacionární a odumírání.



Obr. 12. Růstová křivka testovaných bakteriálních kmenů.

Kmen R25 byl zočkován na selektivně diagnostickou půdu Agarová báze *Bacillus cereus* a po 24 hodinách kultivace při 30 °C došlo k zezelenání pouze okolí kolonií (Obr. 13). Tato barevná změna potvrdila, že kmen R25 není bakterie *Bacillus cereus*.



Obr. 13. Růst R25 na Agarové bázi *Bacillus cereus*.

### 7.1.2 Sekvence 16S rDNA

Byla provedena sekvenace genu 16S rDNA u všech šesti studovaných izolátů. Výsledky byly porovnány s databází National Library of Medicine pomocí algoritmu BLAST®. Nejvyšší dosažené shody jsou uvedeny v tabulce (Tab. 5). U izolátu R39 je shoda pouze 95

%, což může naznačit, že testovaná sekvence nebyla dostatečně kvalitní či se jedná o atypický kmen.

Tab. 5. Identifikace pomocí 16S rDNA - nejvyšší dosažené shody částečných sekvencí studovaných kmenů s databází.

Kmen	Identifikovaný kmen	Shoda (%)
R23	<i>Bacillus tequilensis</i> APBSMLB99	100
R25	<i>Bacillus subtilis</i> LR2FG15	100
R34	<i>Bacillus pumilus</i> SJSIS9, VITAPRRKSMG-	99
R39	<i>Acinetobacter lwoffii</i> S001	95
GK CIP 1/1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R2-114	99
GK CIP 5/1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> MSL 3045	100

### 7.1.3 MALDI-TOF

Testované bakterie byly identifikovány pomocí MALDI-TOF. Jejich největší dosažené skóre je uvedeno v (Tab. 6). Kmeny R23, R25, R34 a R39 dosáhly skóre menší než 1,699, což značí nespolehlivou identifikaci. Kmen GK CIP 1/1 dosáhl vysokého skóre, proto je vysoce pravděpodobné, že byl správně identifikován druh. Kmen GK CIP 5/1 měl o trochu menší skóre, proto došlo k identifikaci rodu a možná i druhu.

Tab. 6. Nejvyšší dosažená skóre u identifikace pomocí MALDI-TOF.

Kmen	Identifikovaný kmen	Skóre
R23	<i>Bacillus mojavenensis</i> DSM 9205T DSM	1,432
R25	<i>Bacillus subtilis</i> ssp <i>subtilis</i> DSM 10T DSM	1,531
R34	<i>Bacillus pumilus</i> IAM 12050 PAH	1,490
R39	<i>Acinetobacter lwoffii</i> V506 MCRF	1,460
GK CIP 1/1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DSM 50170T BRB	2,437
GK CIP 5/1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (PX) 23086229 MLD	2,280

### 7.1.4 Diskuze

Byla provedena identifikace pomocí fetotypu, genotypu 16S rDNA a MALDI-TOF. Přestože nebylo dosaženo vysokých skór u MALDI-TOF lze srovnáním výsledků ze všech metod identifikace určit bakteriální druh, ale nelze určit bakteriální kmen. U většiny kmenů, kromě R23, došlo ke shodě druhu mezi sekvencí 16S rDNA a MALDI-TOF. Tyto výsledky

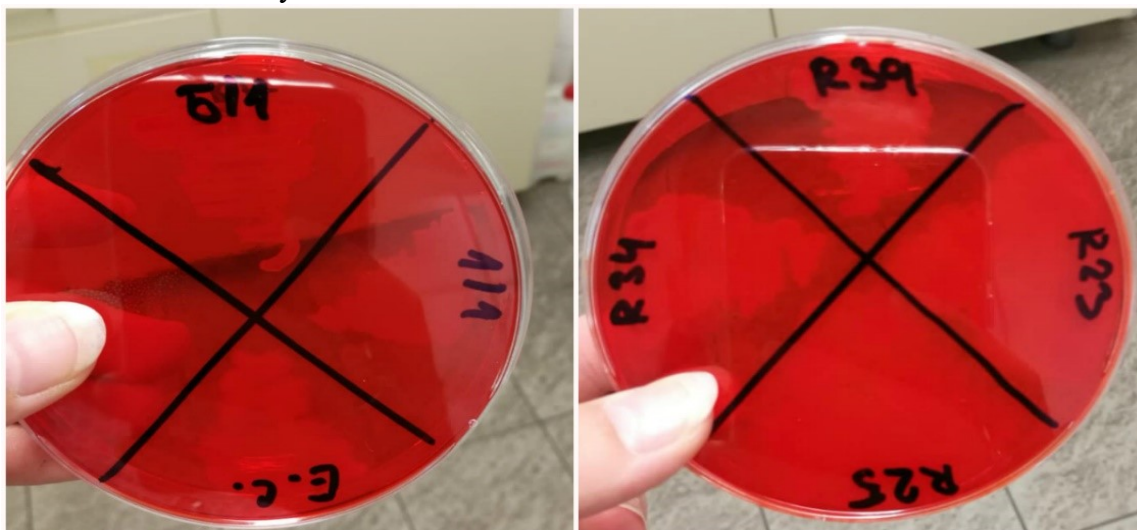
potvrdilo i Gramovo barvení a tvar bakteriálních buněk. Na základě těchto výsledků byl identifikován na úrovni druhu R25 jako *Bacillus subtilis*, R34 jako *Bacillus pumilus*, R39 jako *Acinetobacter lwoffii*, GK CIP 1/1 jako *Stenotrophomonas maltophilia* a GK CIP 5/1 jako *Stenotrophomonas maltophilia*. U R23 nedošlo ke shodě mezi sekvenací a MALDI-TOF, proto lze určit pouze rod. R23 je tedy *Bacillus* spp. GK CIP 1/1 a GK CIP 5/1 byly identifikovány jako stejný druh, ale vzhledem k rozdílným identifikovaným kmenům v MALDI-TOF, kde dosáhly vysokého skóre, a následně i rozdílných výsledků ve tvorbě biofilmu, je pravděpodobné, že jsou to rozdílné bakteriální kmeny.

## 7.2 Stanovení biofilm pozitivivity bakterií

K stanovení biofilm pozitivivity bakterií byly zvoleny kvalitativní metody (CRA, optická mikroskopie a fluorescenční mikroskopie) i kvantitativní metody (průkaz biofilmu v mikrotitrační destičce a MTT test).

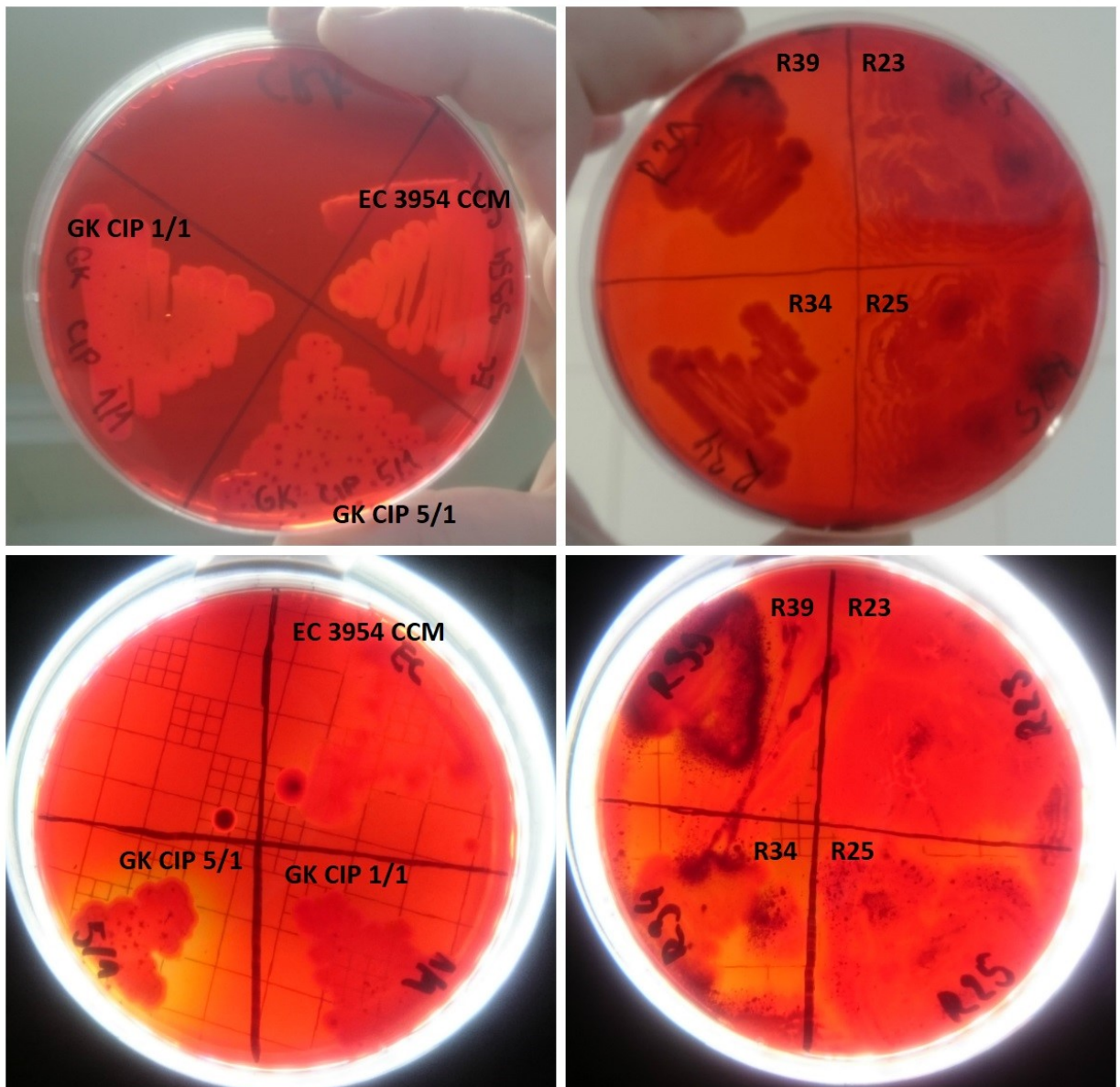
### 7.2.1 Průkaz tvorby biofilmu na agaru s kongo červení

Byl proveden průkaz tvorby biofilmu na agaru s kongo červení sledováním barvy kolonií v průběhu sedmi dnů. Prvním použitým typem agaru byl CRA, u kterého byla použita kongo červeně po expiraci (Lachema, Brno, Československo). U tohoto typu nedošlo ke ztmavnutí žádné bakteriální kolonie (Obr. 14), což bylo nejspíš způsobeno stářím kongo červeně. Výsledek bývá totiž často ovlivněn i šarží kongo červeně (Růžička *et al.*, 2004). Proto byla pořízena nová kongo červeně (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a byly vyhledány modifikace této metody



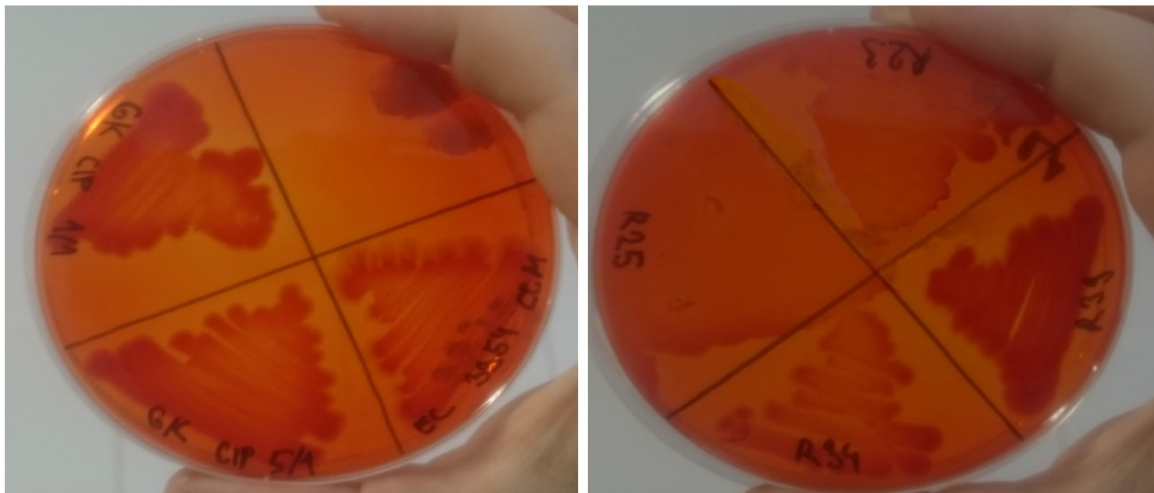
Obr. 14. Růst kolonií na CRA po 72 hodinách kultivace při 30 °C (1/1 – GK CIP 1/1, 5/1 – GK CIP 5/1 a E.C – *Escherichia coli* CCM 3954).

Prvními modifikacemi byly agary obohacené o 3,6 % a 5 % sacharózy (Obr. 15). K barevné změně došlo u všech testovaných kmenů kromě *Escherichie coli* CCM 3954. Zbarvené kolonie neměly konstantní tmavé zbarvení, ale měly černě zbarvené granule uvnitř kolonií. Ovšem u těchto agarů docházelo časem k vzniku černých granul i na sterilních půdách. Je proto zajímavé, že na zaočkovaných kulturách vznikaly granule pouze uvnitř kolonií. Důvodem tohoto jevu může být metabolická aktivita bakterií. Tato aktivita způsobuje odebrání sacharidů z půdy a tím pádem černání jen uvnitř kolonií. Rozdíl mezi CRA obohacným 3,6 % sacharózy a 5 % nebyl nikterak patrný.



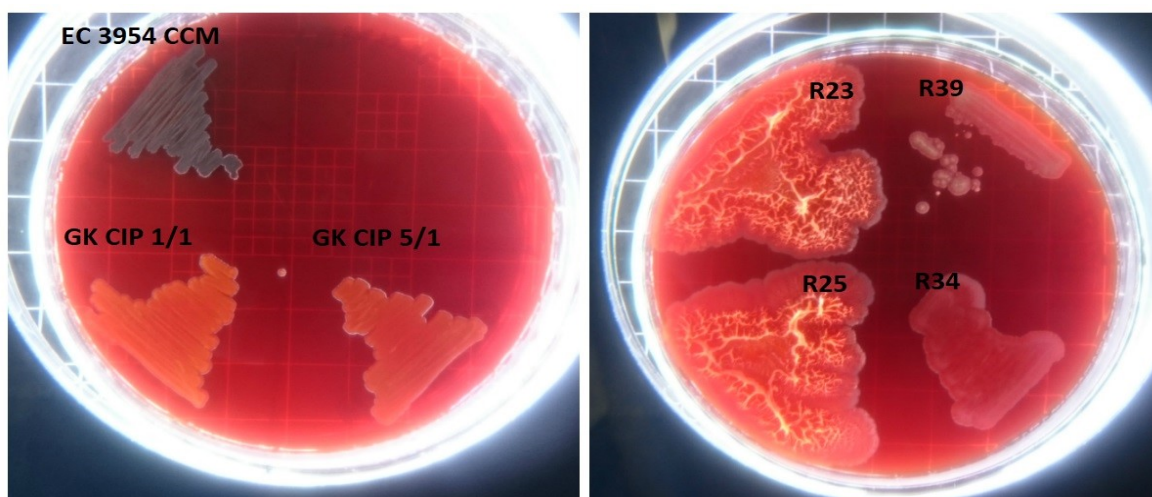
Obr. 15. Růst bakterií na CRA s 3,6 % sacharózy (vrchní) a 5 % sacharózy (spodní) po 72 hodinách kultivace ve 30 °C.

Další modifikací byla mCRA (Obr. 16). Tento agar obsahuje menší množství kongo červeně a jiný základ (BAB-2). U tohoto typu agaru nedošlo k ztmavnutí kolonie u žádného pozorovaného bakteriálního kmene.



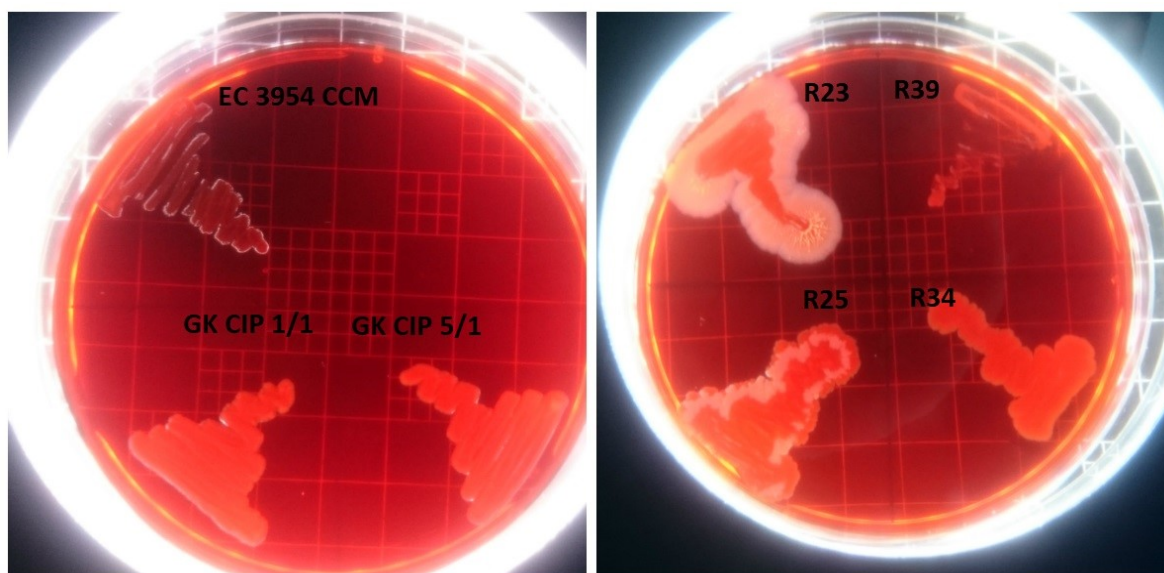
Obr. 16. Růst bakterií na mCRA po 72 hodinách kultivace při 30 °C.

Následnou modifikací byl CRAvc. Jelikož tento agar obsahuje vankomycin, což je antibiotikum působící na grampozitivní bakterie (Geraci, 1977), nedošlo k růstu kolonií grampozitivních kmenů bakterií (*Bacillus* spp. (R23), *Bacillus subtilis* (R25), *Bacillus pumilus* (R34)). Gramnegativní bakterie na tomto agaru rostly a ke ztmavnutí kolonie došlo jen u *Escherichie coli* CCM 3954. Protože nedocházelo k růstu grampozitivních bakterií, byl tento agar vyhotoven bez vankomycinu (CRAbvc). U CRAbvc (Obr. 17) došlo k výraznému zčernání kolonie *Escherichie coli* CCM 3954. U bakterií *Bacillus* spp. (R23), *Bacillus subtilis* (R25), *Bacillus pumilus* (R34) a *Acinetobacter lwoffii* (R39) došlo k jemnému ztmavnutí a u *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) a *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) nedošlo ke ztmavnutí.



Obr. 17. Růst bakterií na CRAbvc po 96 hodinách kultivace při 30 °C.

Protože u CRAvc a CRAbvc docházelo ke ztmavnutí celých kolonií oproti CRA obohacených o sacharózu a nedocházelo k zčernávání sterilních půd, lze tuto změnu přisuzovat obsahu NaCl v CRAvc a CRAbvc. NaCl může působit jako konzervant, který zabraňuje černání sterilních půd. Proto byla snaha zjistit vliv NaCl na růst bakterií na agarech z kongo červení. Byla připravena půda (CRAbvc 2 % NaCl) obsahující větší množství NaCl, tj. 2 % NaCl oproti CRAbvc obsahujícího 1,5 % NaCl, a byl zde dále sledován růst bakterií. U CRAbvc 2 % NaCl (Obr. 18) došlo k méně intenzivnímu zčernání *Escherichie coli* CCM 3954 oproti u CRAbvc. U CRAbvc 2 % NaCl bylo ještě pozorováno jemné ztmavnutí jen u kolonií *Bacillus* spp. (R23) a *Bacillus subtilis* (R25). Tyto výsledky ukazují, že vyšší přídavek NaCl, oproti doporučení Kaiser *et al.* (2013) má negativní vliv na ztmavnutí kolonií, tj. na průkaz jejich biofilm positivity.



Obr. 18. Růst bakterií na CRAbvc 2 % NaCl po 72 hodinách kultivace při 30 °C.

Při srovnání všech testovaných půd je patrné, že nejlepší výsledky byly u CRAbvc, kde byla barevná změna u pěti ze sedmi testovaných kmenů. Touto metodou se povedlo dokázat biofilm pozitivitu u všech zkoumaných kmenů bakterií alespoň na jednom typu agaru. Ovšem biofilm pozitivita u kmenů *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) a *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) je touto metodou diskutabilní, vzhledem k pouhé tvorbě černých granulí uvnitř kolonií. U většiny typů půd docházelo k barevným změnám až po 72 hodinách kultivace při 30 °C a v průběhu delší kultivace se zbarvení téměř neměnilo.

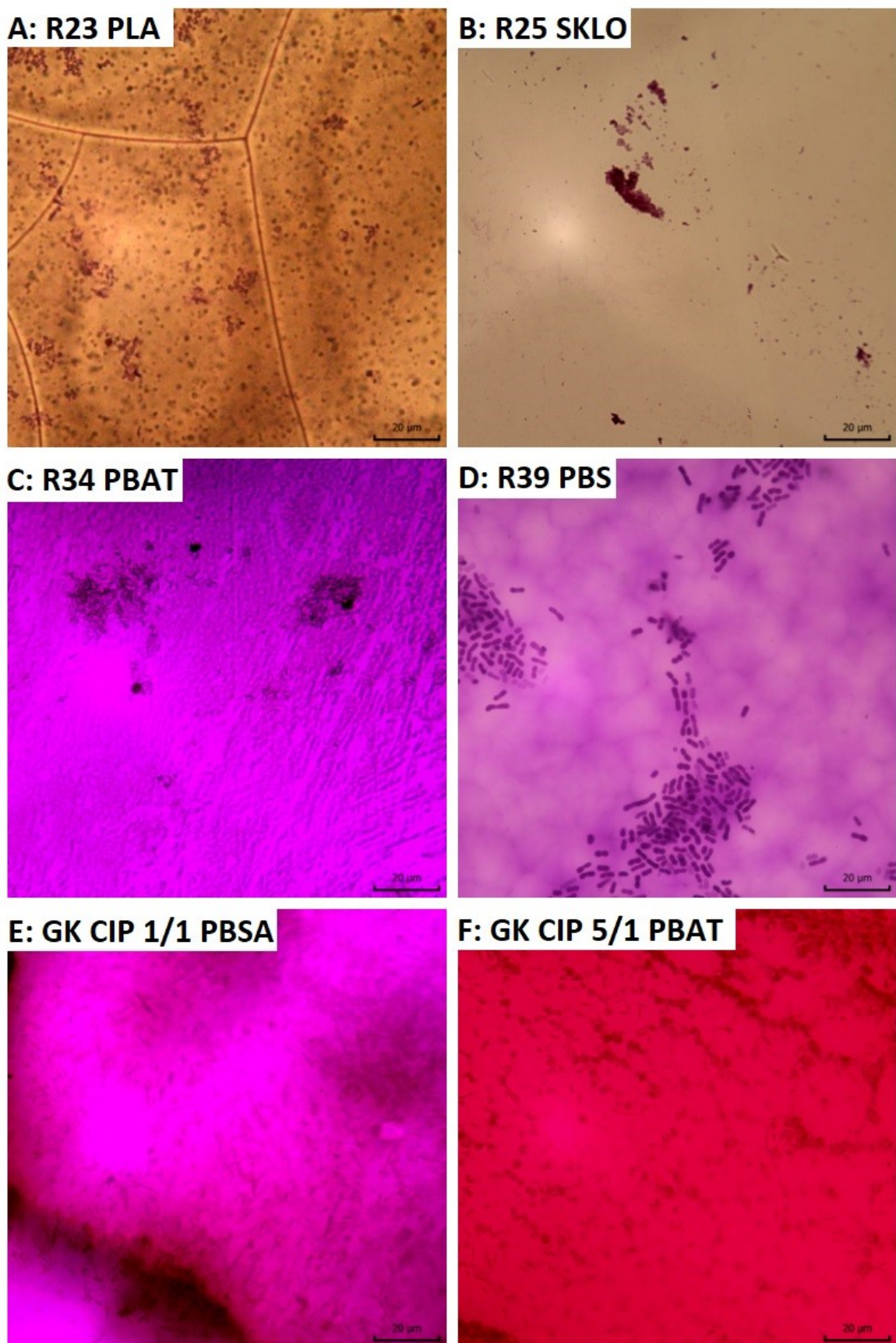


### 7.2.2 Optická mikroskopie

Bylo provedeno sledování obarvených vzorků krystalovou violetí pomocí optického mikroskopu při 1 000x zvětšení pod imerzním olejem. Pro většinu testovaných vzorků (PBAT, PBS a PBSA) tato metoda nebyla moc vhodná, protože docházelo k obarvování celého povrchu polymeru, a proto byly případné bakterie adherované na povrchu špatně pozorovatelné. Dalším nedostatkem této metody bylo, že namočení vzorků před kultivací do 96% etanolu pouze usmrtilo případnou bakteriální kontaminaci, ale neodstranilo odumřelé bakteriální buňky, což vedlo k nemožnosti odlišit adherované buňky z kultivace od kontaminovaných při pozorování vzorků.

U kmenů *Bacillus* spp. (R23), *Bacillus subtilis* (R25), *Bacillus pumilus* (R34) a *Acinetobacter lwoffii* (R39) (Obr. 19 A, B, C, D) byly výskyt adherovaných buněk sporadický. Největší výskyt adherovaných buněk měl kmen *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) (Obr. 19 E) a o něco menší výskyt měl kmen *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) (Obr. 19 F). Při porovnání množství adherovaných bakteriálních buněk na jednotlivých materiálech docházelo k největšímu ulpívání buněk na PBS a PBAT. U PBSA nebylo možné (kromě *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1), *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) a *Acinetobacter lwoffii* (R39)) nalézt adherované buňky kvůli silné intenzitě obarvení povrchu vzorku. Přichycené buňky byly nejlépe pozorovány na PLA a sklu (Obr. 19 A, B), protože tyto vzorky neměly tak velkou tendenci se obarvovat. Ovšem výskyt buněk u PLA byl nižší a u skla byl nejnižší v porovnání s ostatními vzorky.

Pomocí barvení krystalovou violetí a optické mikroskopie bylo možné pozorovat i originální povrch jednotlivých polymerů. Povrch PLA (Obr. 19 A) má na sobě dlouhé, úzké pukliny, PBAT (Obr. 19 C, F) má nepravidelně jemně zdrsňelý povrch. U PBS (Obr. 19 D) se zdá, že má téměř hladký povrch, ovšem u PBS docházelo k obarvování úzké husté sítě, což může naznačovat, že je povrch jemně hrbolatý. U PBSA (Obr. 19 E) bylo možné sledovat, že na jeho povrchu jsou odloučené šupinky. Toto odlučování bylo i pozorovatelné při namáčení PBSA do 96% etanolu (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika).

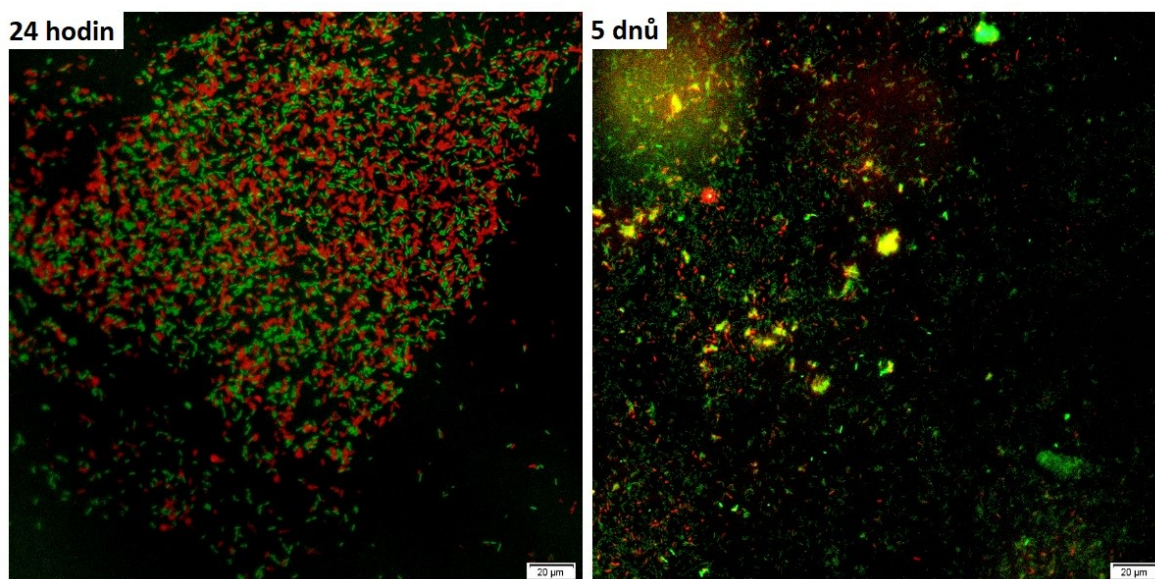


Obr. 19. Obarvené testované kmény bakterií krystalovou violetí na sledovaných materiálech (A – kmen R23 na PLA, B – kmen R25 na skle, C – kmen R34 na PBAT, D – kmen R39 na PBS, E – kmen GK CIP 1/1 na PBSA, F – kmen GK CIP 5/1 na PBAT).

### 7.2.3 Fluorescenční mikroskopie

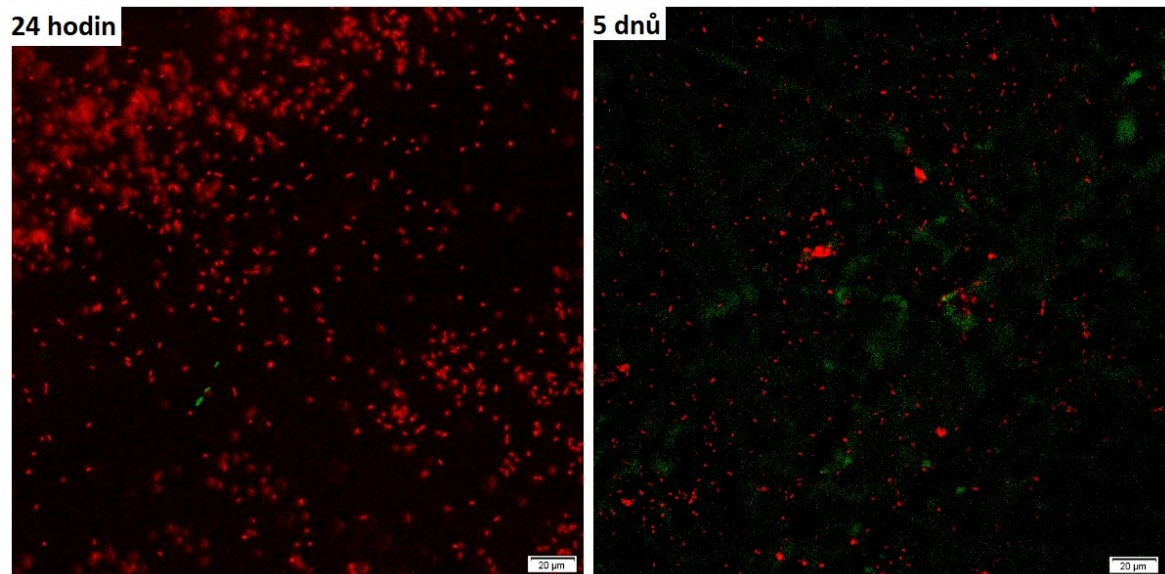
Pomocí fluorescenční mikroskopie byly pozorovány pouze kmeny *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1). Tyto kmeny byly zvoleny kvůli největší tvorbě biofilmu na površích vzorku při optické mikroskopii. Díky této metodě byla sledována životaschopnost bakteriálních biofilmů po 24 hodinách kultivace při 30 °C a také pětidenní kultivaci při 30 °C. Bylo zjištěno že je tato metoda velice citlivá k obarvení povrchů testovaných polymerů, především PBAT, PBS a PBSA. Proto byla zvolena kratší doba barvení, než uvádí výrobce. Tento problém byl značný především u barvení živých bakterií pomocí barviva SYTO® 9 po 5 dnech kultivace, což u některých vzorů až znemožňovalo určit, zda je v biofilu tak velký počet živých buněk, či je to jen obarvený polymer.

Na PLA (Obr. 20) bakterie dobře adherovaly. Po 24 hodinách kultivace byl počet živých a mrtvých bakterií srovnatelný, ale po 5 dnech kultivace převažovaly živé bakterie a bylo možné pozorovat menší biofilmové shluky.



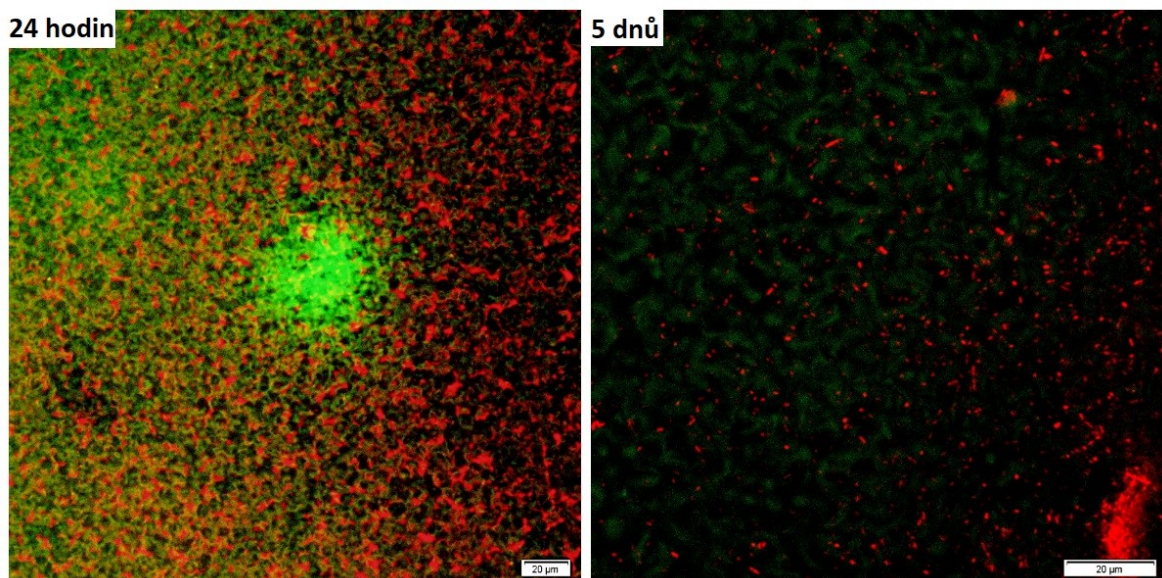
Obr. 20. Obarvené bakteriální buňky GK CIP 1/1 fluorescenčním barvivem (zelené – živé, červené – mrtvé) na PLA po 24 hodinách a 5 dnech kultivace.

Na PBAT (Obr. 21) po 24 hodinách kultivace se na povrchu vyskytovaly převážně mrtvé buňky a výskyt živých buněk byl velmi malý. Po 5 dnech kultivace docházelo k silnému obarvení povrchu barvivem SYTO® 9, což mohlo být způsobeno velkým počtem živých buněk či silným obarvením polymeru.



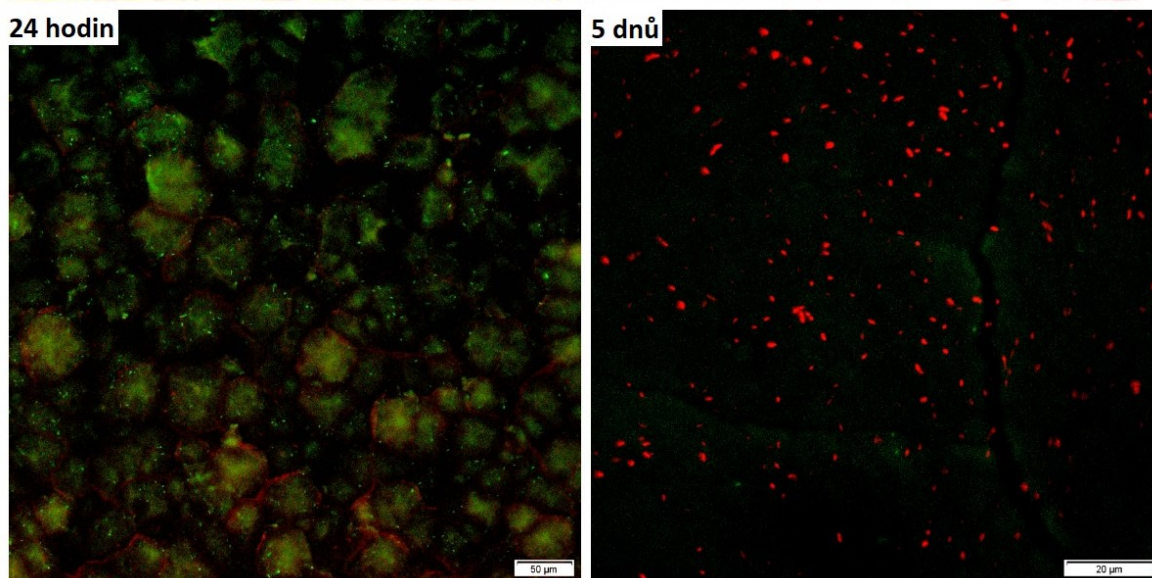
Obr. 21. Obarvené bakteriální buňky GK CIP 1/1 fluorescenčním barvivem (zelené – živé, červené – mrtvé) na PBAT po 24 hodinách a 5 dnech kultivace.

U PBS (Obr. 22) byl silný výskyt živých i mrtvých bakterií po 24 hodinách kultivace a po 5 dnech kultivace opět docházelo k silnému obarvování barvivem SYTO® 9.



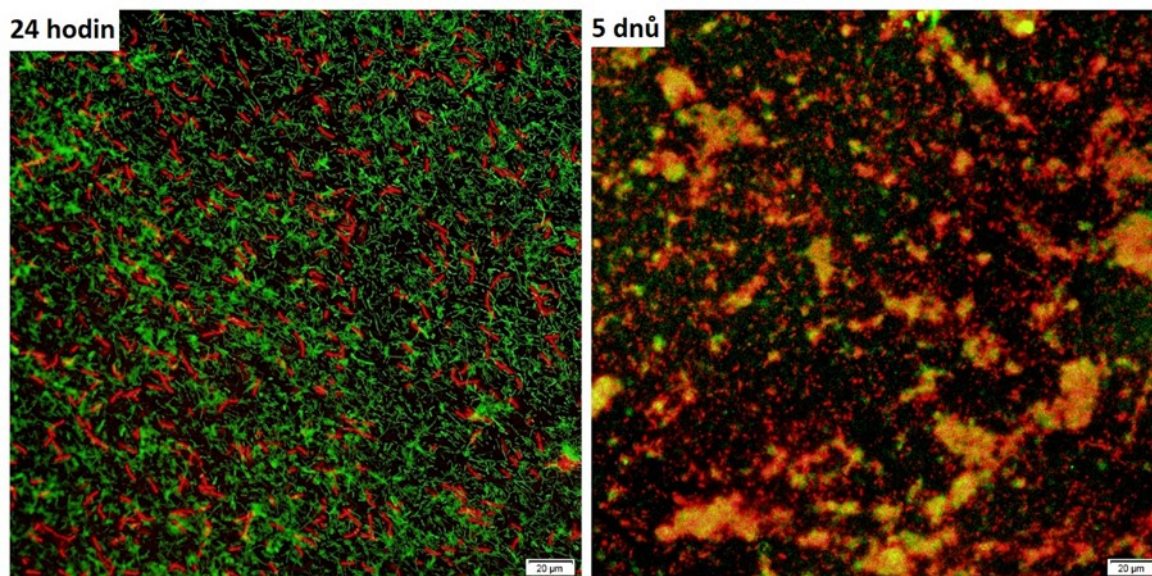
Obr. 22. Obarvené bakteriální buňky GK CIP 1/1 fluorescenčním barvivem (zelené – živé, červené – mrtvé) na PBS po 24 hodinách a 5 dnech kultivace.

Na PBSA (Obr. 23) po 24hodinové kultivaci bylo možné sledovat větší adherování buněk na místa odloupených šupinek povrchu, což potvrdilo teorii, že biofilm se lépe tvoří na místech s drsným povrchem (Rulík *et al.*, 2011). Biofilm po 24 hodinách kultiva tvoří z cca 90 % živé bakterie. Po 5 dnech kultivace nastal stejný problém jako u PBS a PBAT.



Obr. 23. Obarvené bakteriální buňky GK CIP 1/1 fluorescenčním barvivem (zelené – živé, červené – mrtvé) na PBSA po 24 hodinách a 5 dnech kultivace.

Adherování bakterií na sklu (Obr. 24) po 24 hodinách kultivace bylo vysoké. Výskyt živých buněk byl o 50 % vyšší než mrtvých a po 5 dnech kultivace bylo možné sledovat větší biofilmové shluky zaplňující 30 % plochy, ale vzrostl 1000x výskyt mrtvých buněk.



Obr. 24. Obarvené bakteriální buňky GK CIP 1/1 fluorescenčním barvivem (zelené – živé, červené – mrtvé) na sklu po 24 hodinách a 5 dnech kultivace.

#### 7.2.4 Průkaz tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce

Bylo sledováno množství biofilmu na materiálu pomocí barvení krystalovou violetí a následným měření absorbance výluhu krystalové violetí v 96% etanolu. Zde nastával stejný záležitost jako u optické metody a to, že se povrch polymerního materiálu PBSA silně obarvoval krystalovou violetí a nabylo možné rozlišit sledování biofilmu testovaných kmenů od případných mrtvých buněk kontaminantů.

Tab. 7. Hraniční hodnoty pro průkaz tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce.

Materiál	Biofilm negativní	Slabý biofilm	Silný biofilm
PLA	<0,0670	0,0670–0,1341	>0,1341
PBAT	<0,86	0,86–1,72	>1,72
PBS	<0,1035	0,1035–0,2070	>0,2070
PBSA	<3,3	3,3–6,5	>6,5
sklo	<0,0670	0,0670–0,1332	>0,1332

Výluh z případného biofilmu na PLA bez zaočkování některého kmene (referenční) měl absorbanci  $(0,0607 \pm 0,0016)$ . U zaočkových PLA kmenem *Bacillus* spp. (R23) absorbance činila  $(0,066 \pm 0,012)$ , u *Bacillus subtilis* (R25)  $(0,108 \pm 0,012)$ , u *Bacillus pumilus* (R34)  $(0,061 \pm 0,005)$ , u *Acinetobacter lwoffii* (R39)  $(0,12 \pm 0,02)$ , u *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1)  $(0,08 \pm 0,01)$  a u *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1)  $(0,0821 \pm 0,0002)$ . Podle směrodatné odchylky u referenčního vzorku a následnému výpočtu hraničních hodnot (Tab. 7) byly stanoveny kmeny *Bacillus* spp. (R23), *Bacillus pumilus* (R34) na PLA jako netvořící biofilm a zbytek testovaných kmenů na PLA jako slabě tvořící biofilm.

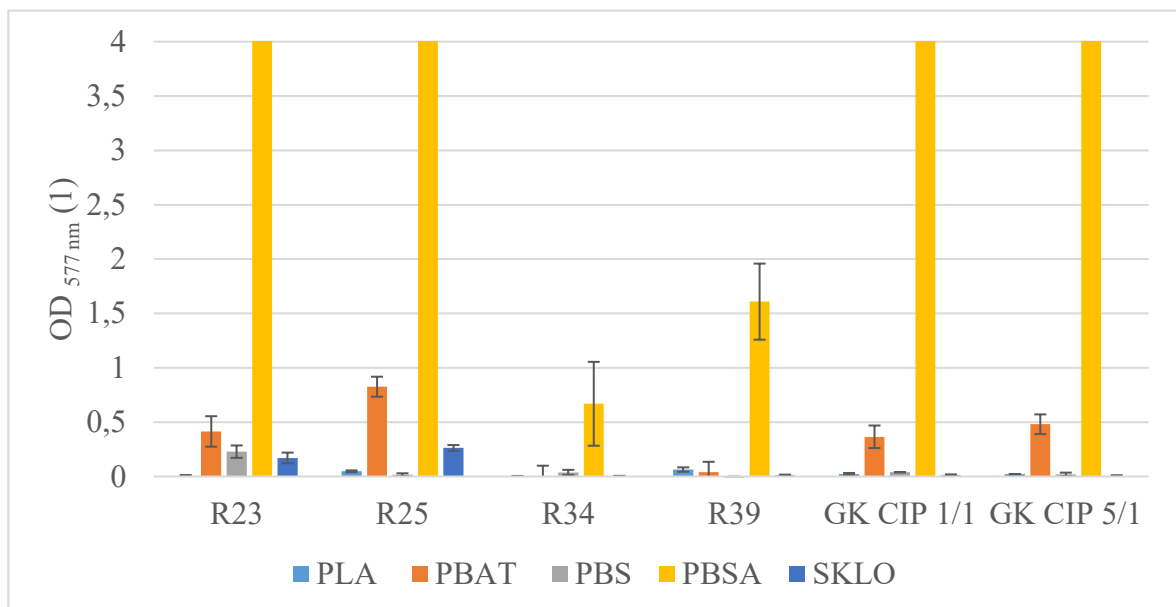
Referenční výluh z PBAT měl absorbanci  $(0,47 \pm 0,09)$ . U zaočkových PBAT kmenem *Bacillus* spp. (R23) absorbance byla  $(0,89 \pm 0,11)$ , u *Bacillus subtilis* (R25)  $(1,30 \pm 0,02)$ , u *Bacillus pumilus* (R34)  $(0,47 \pm 0,04)$ , u *Acinetobacter lwoffii* (R39)  $(0,51 \pm 0,03)$ , u *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1)  $(0,84 \pm 0,05)$  a u *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1)  $(0,955 \pm 0,004)$ . Opět při porovnání s hraniční hodnotou (Tab. 7) byly kmeny *Bacillus pumilus* (R34), *Acinetobacter lwoffii* (R39) a *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) posouzeny na PBAT jako biofilm netvořící, *Bacillus* spp. (R23), *Bacillus subtilis* (R25) a GL CIP 5/1 na PBAT tvořící slabý biofilm.

U materiálu PBS měl referenční výluh absorbančí (0,101 2 ± 0,000 6). Výluh se zaočkovaným kmenem *Bacillus* spp. (R23) na PBS měl absorbančí (0,33 ± 0,06), *Bacillus subtilis* (R25) (0,117 ± 0,014), *Bacillus pumilus* (R34) (0,14 ± 0,03), *Acinetobacter lwoffii* (R39) (0,090 ± 0,009), *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) (0,140 ± 0,002) a *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) (0,121 ± 0,017). Při porovnání s hraniční hodnotou (Tab. 7) tvoří všechny testované kmeny kromě *Bacillus* spp. (R23) a *Acinetobacter lwoffii* (R39) na PBS slabý biofilm. *Bacillus* spp. (R23) tvoří silný biofilm a *Acinetobacter lwoffii* (R39) na PBS netvoří biofilm.

Referenční absorbanče výluhu u PBSA činila (2,0 ± 0,3). U výluhů se vzorků zaočkovanými kmeny *Bacillus* spp. (R23), *Bacillus subtilis* (R25), *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) a *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) byla absorbanče větší než možno přístrojem měřitelná, tj. větší než 4, protože hranice pro slabý biofilm byla též nad tuto hodnotou nelze kmeny posoudit. U výluhu kmene *Bacillus pumilus* (R34) byla absorbanče (2,7 ± 0,3) a u *Acinetobacter lwoffii* (R39) (3,6 ± 0,2). Podle porovnání s hraničními hodnotami (Tab. 7), *Bacillus pumilus* (R34) netvořila na PBSA biofilm a *Acinetobacter lwoffii* (R39) tvořila slabý biofilm.

Referenční hodnota absorbanče výluhu u skla byla (0,054 ± 0,003). U výluhu ze zaočkovaného vzorku skla kmenem *Bacillus* spp. (R23) byla absorbanče (0,23 ± 0,05), u *Bacillus subtilis* (R25) (0,32 ± 0,03), u *Bacillus pumilus* (R34) (0,057 4 ± 0,000 2) u *Acinetobacter lwoffii* (R39) (0,066 ± 0,005), u *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) (0,065 ± 0,009) a u *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) (0,057 ± 0,008). Při srovnání s hraničními hodnotami (Tab. 7) tvoří silný biofilm na skle kmeny *Bacillus* spp. (R23) a *Bacillus subtilis* (R25) a ostatní kmeny biofilm na skle netvoří.

Při porovnání růstu biofilmu na jednotlivých materiálech docházelo k největšímu růstu na PBS a PBSA. Nejvíce tvořil biofilm kmen *Bacillus* spp. (R23) a *Bacillus subtilis* (R25), o něco méně kmeny CK CIP 5/1 a *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) a nejméně kmeny *Bacillus pumilus* (R34) a *Acinetobacter lwoffii* (R39). Pro porovnání velikosti biofilmu bylo od absorbance zaočkovaného materiálu odečtena referenční hodnota absorbance materiálu, aby došlo k odstranění vlivu samotného obarvování materiálu (Obr. 25). Jelikož u PBSA s kmeny *Bacillus* spp. (R23), *Bacillus subtilis* (R25), *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) a *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) byly optické denzity větší než umožňuje rozsah přístroje, tj. nad 4, tak byly tyto hodnoty v (Obr. 25) nasimulovány.



Obr. 25. Velikost biofilmu stanovená pomocí průkazu biofilmu na mikrotitrační destičce.

### 7.2.5 MTT test

Dalším testem pro stanovení množství biofilmu na materiálech po 24hodinové kultivaci byl MTT test. Tento test sleduje pouze množství živých bakterií, protože je založen na jejich metabolické aktivitě. Z toho důvodu přinesl řadu výhod oproti průkazu tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce. Nedocházelo při něm k obarvování samotného materiálu a velikost biofilmu neovlivňovaly případné mrtvé buňky přichycené na materiálu před kultivací.



Tab. 8. Hraniční hodnoty pro MTT test.

Materiál	Biofilm negativní	Slabý biofilm	Silný biofilm
PLA	<0,111	0,111–0,222	>0,222
PBAT	<0,1056	0,1056–0,2112	>0,2112
PBS	<0,0338	0,0338–0,0676	>0,0676
PBSA	<0,0537	0,0537–0,1074	>0,1074
sklo	<0,090	0,090–0,180	>0,180

Referenční absorbance pro PLA byla  $(0,049 \pm 0,015)$ . U zaočkovaných vzorků bakteriální kulturou na PLA činila absorbance u *Bacillus* spp. (R23)  $(0,0592 \pm 0,0001)$ , u *Bacillus subtilis* (R25)  $(0,053 \pm 0,007)$ , u *Bacillus pumilus* (R34)  $(0,067 \pm 0,009)$ , u *Acinetobacter lwoffii* (R39)  $(0,063 \pm 0,003)$ , u *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1)  $(0,425 \pm 0,011)$  a u *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1)  $(0,1250 \pm 0,0015)$ . Stejně jako u předchozí metody byly stanoveny hraniční hodnoty (Tab. 8) a následně z nich rozděleny výsledky do kategorií: netvořící biofilm, slabě tvořící biofilm a silně tvořící biofilm. U PLA tvořil silný biofilm kmen *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) a slabý biofilm *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1). Ostatní kmeny biofilm na PLA netvořily.

U PBAT byla referenční hodnota absorbance  $(0,0997 \pm 0,0014)$ . U zaočkovaných činila absorbance u *Bacillus* spp. (R23)  $(0,086 \pm 0,007)$ , u *Bacillus subtilis* (R25)  $(0,118 \pm 0,017)$ , u *Bacillus pumilus* (R34)  $(0,25 \pm 0,04)$ , u *Acinetobacter lwoffii* (R39)  $(0,30 \pm 0,03)$ , u *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1)  $(1,22 \pm 0,08)$  a u *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1)  $(0,288 \pm 0,006)$ . Při porovnání s hraničními hodnotami (Tab. 8) tvoří téměř všechny kmeny kromě *Bacillus* spp. (R23) a *Bacillus subtilis* (R25) silný biofilm. Kmen *Bacillus* spp. (R23) na PBAT lze označit jako biofilm negativní, případně jako kmen, který má velmi nízkou nebo malou adhezi na povrch PBAT. Kmen *Bacillus subtilis* (R25) tvoří slabý biofilm.

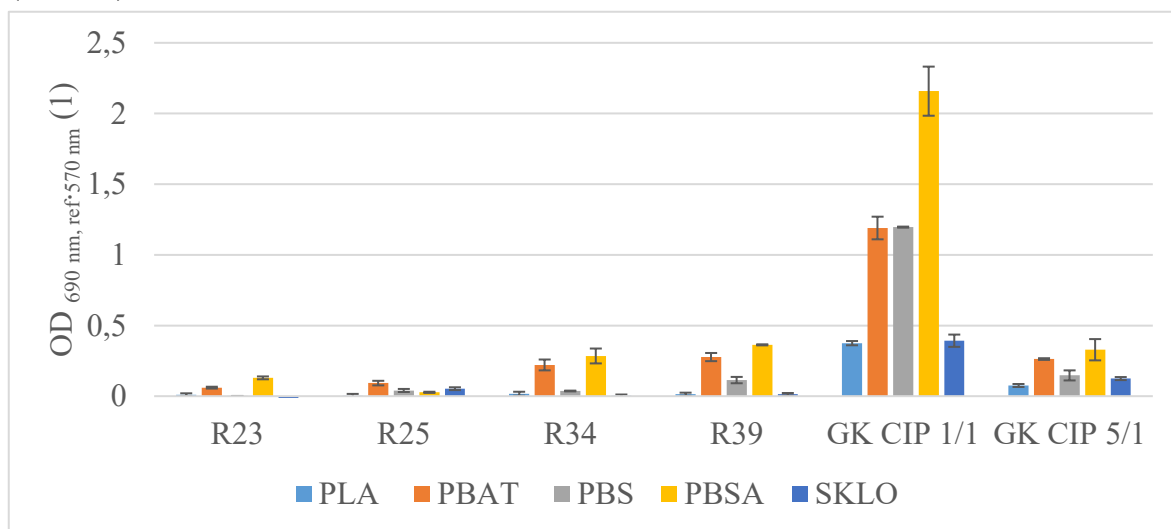
Materiál PBS měl referenční hodnotu absorbance  $(0,0334 \pm 0,0001)$ . U zaočkovaných kmenem *Bacillus* spp. (R23) byla absorbance  $(0,0339 \pm 0,0012)$ , *Bacillus subtilis* (R25)  $(0,074 \pm 0,012)$ , *Bacillus pumilus* (R34)  $(0,070 \pm 0,003)$ , *Acinetobacter lwoffii* (R39)  $(0,15 \pm 0,03)$ , *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1)  $(1,229 \pm 0,004)$  a u *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1)  $(0,18 \pm 0,04)$ . Při porovnání s hraničními hodnotami (Tab. 8)

všechny kmeny kromě *Bacillus* spp. (R23) tvoří na PBS silný biofilm. *Bacillus* spp. (R23) na PBS vytváří slabý biofilm.

Referenční hodnota absorpance činila PBSA ( $0,0478 \pm 0,0014$ ). U zaočkovaných vzorků PBSA kmenem *Bacillus* spp. (R23) byla absorpance ( $0,16 \pm 0,01$ ), *Bacillus subtilis* (R25) ( $0,056 \pm 0,004$ ), *Bacillus pumilus* (R34) ( $0,31 \pm 0,05$ ), *Acinetobacter lwoffii* (R39) ( $0,392 \pm 0,003$ ), *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) ( $2,19 \pm 0,18$ ) a *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) ( $0,36 \pm 0,08$ ). Všechny testované kmeny kromě *Bacillus subtilis* (R25) vytváří na PBSA silný biofilm. *Bacillus subtilis* (R25) na PBSA vytváří slabý biofilm.

U skla byla referenční hodnota absorpance ( $0,055 \pm 0,008$ ). U zaočkovaných vzorků skla kmenem *Bacillus* spp. (R23) byla absorpance ( $0,0344 \pm 0,0008$ ), *Bacillus subtilis* (R25) ( $0,108 \pm 0,006$ ), *Bacillus pumilus* (R34) ( $0,058 \pm 0,005$ ), *Acinetobacter lwoffii* (R39) ( $0,069 \pm 0,003$ ), CK CIP 1/1 ( $0,45 \pm 0,05$ ) a *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) ( $0,180 \pm 0,007$ ). Při srovnání s hraničními hodnotami (Tab. 8) tvoří *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) na skle silný biofilm, *Bacillus subtilis* (R25) a *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) slabý biofilm a zbytek testovaných kmenů netvoří biofilm.

Při porovnání všech výsledků MTT testu biofilm dobře rostl na PBS, PBSA PBAT. Na skle a PLA rostl málo. Nejlépe tvořily biofilm kmeny *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) a *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) a nejhůře kmen *Bacillus* spp. (R23). Stejně jako u průkazu tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce pro názorné porovnání výsledků byla odečtena referenční hodnota od hodnot absorpance zaočkovaných vzorků (Obr. 26).



Obr. 26. Velikost biofilmu stanovená pomocí MTT testu.

### 7.2.6 Diskuze

Pomocí kvalitativních metod (CRA a mikroskopie) byly testované kmeny určeny jako biofilm pozitivní. U CRA provedeny modifikace a byly shledány nejlepší výsledky na CRA<sub>bc</sub>. První modifikací bylo provedeno podle Ferreira *et al.* (2014), který zkoumal vliv sacharidů v CRA na růst rod *Staphylococcus*. Zjistil, že při koncentraci menší než 6,25 g/l netvoří na CRA černé kolonie po 24 hodinách kultivace při 37 °C a zvyšování koncentrace má pozitivní vliv na tvorbu černých kolonií. Další modifikací byla mCRA podle Mariana *et al.* (2009) ovšem u této metody se nám nepodařilo prokázat biofilm pozitivitu u žádného z testovaných kmenů. Poslední modifikací byl CRA<sub>vc</sub> podle Kaiser *et al.* (2013). Tato metoda vykazovala pozitivní výsledky po odstranění vankomycinu, který zabraňoval růstu gram pozitivních bakterií. Tvorbu biofilmu u daných druhů potvrdili řada autorů např. Hsueh *et al.* (2006), Morikawa (2006), Gaddy a Actis (2009) a Di Bonaventura *et al.* (2004).

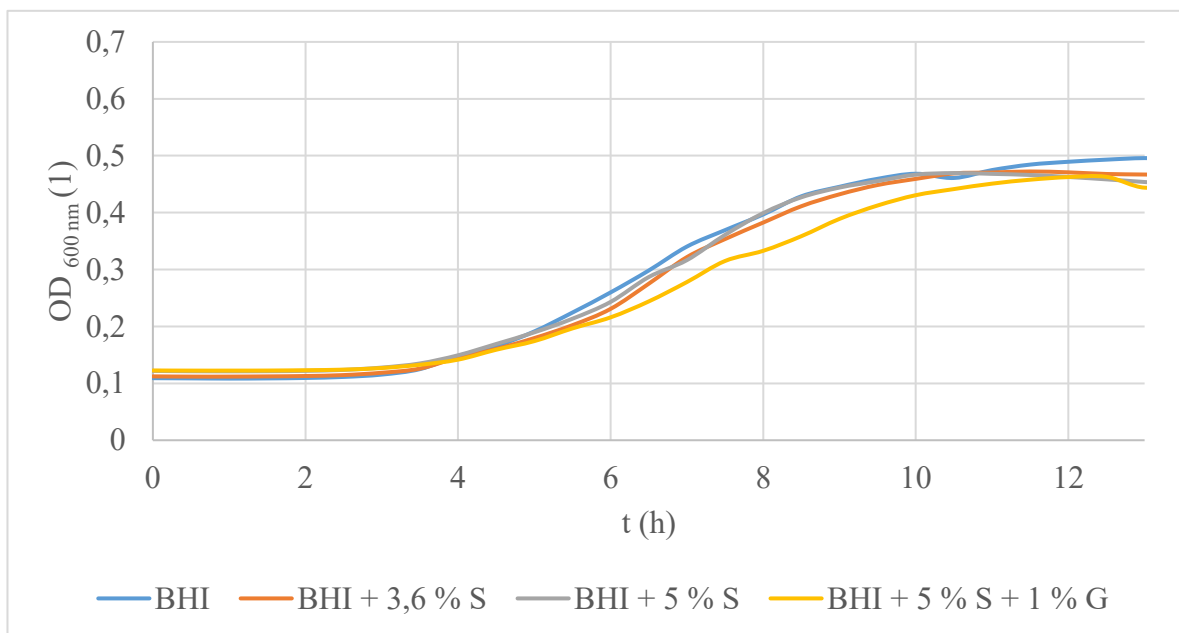
Na PLA se biofilmy téměř netvořily. Silný biofilm na PLA byl prokázán MTT testem jen u kmene *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1), ale pomocí průkazu v mikrotitrační destičce tvořil jen slabý. Na PBAT byla dokázána pomocí MTT silná tvorba biofilmu u všech kmenů, kromě *Bacillus* spp. (R23) a *Bacillus subtilis* (R25). *Bacillus* spp. (R23) byl při této metodě biofilm negativní, ale u průkazu v mikrotitrační destičce tvořil slabý biofilm. *Bacillus subtilis* (R25) tvořil slabý biofilm. Ovšem na PBAT podle průkazu v mikrotitrační destičce docházelo převážně k nevytváření se biofilmu, což bylo pravděpodobně způsobeno zkreslováním výsledků silným obarvováním povrchu polymeru. Na PBS tvořili téměř všechny silný biofilm v MTT testu a v průkazu v mikrotitrační destičce většina slabý biofilm. Na PBSA tvořily kmeny většinou silný biofilm či alespoň slabý. Tvorba biofilmu na skle je sporná, protože pomocí MTT testu byla prokázána silná tvorba biofilmu u *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) a slabá u *Bacillus subtilis* (R25) a *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1), kdežto u průkazu v mikrotitrační destičce byla silná tvorba biofilmu u *Bacillus* spp. (R23) a *Bacillus subtilis* (R25). U *Bacillus subtilis* (R25) dochází na skle k tvorbě biofilmu, u *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) a *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) jsou pravděpodobně správné výsledky z MTT testu, a tedy dochází k silnému růstu biofilmu, protože tyto kmeny vykazovaly silný růst na všech materiálech. Netvoření biofilmu u *Bacillus* spp. (R23) na skle při MTT metodě mohlo být způsobeno strhnutím biofilmu při oplachu anebo naopak silná tvorba biofilmu u tohoto kmenu při průkazu mohla být způsobena nedostatečným oplachem a falešně pozitivní výsledek mohl být způsoben přichycenými planktonickými bakteriálními buňkami.

Podle Morohoshi *et al.* (2018), kteří pozorovali tvorbu biofilmu na biodegradabilních polymerních vzorcích ve vzorcích sladkovodních vod odebraných z různých lokalit Japonska po 14denní kultivaci ve 30 °C, docházelo k netvoření se biofilmu na PLA, slabé produkci biofilmu na PBAT a u PBS a PBSA docházelo k slabé až silné tvorbě biofilmu, což přibližně odpovídá naměřeným výsledkům.

### 7.3 Stanovení vlivu kultivačních podmínek

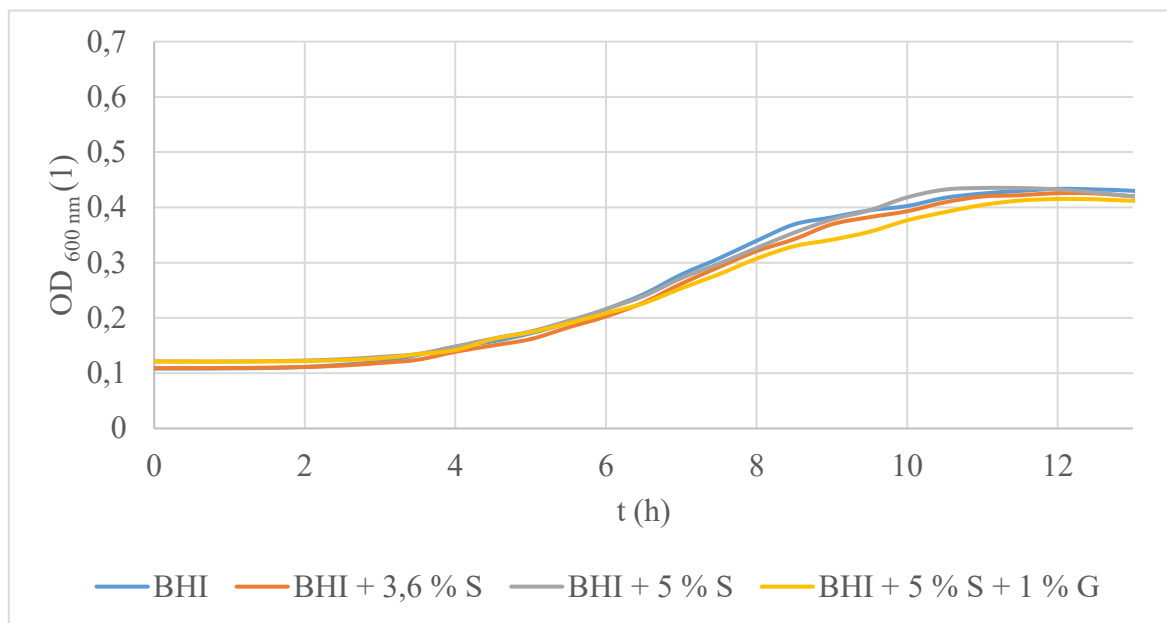
Byl sledován vliv sacharidů na růst bakterií a tvorbu biofilmu. Sledovanými parametry byly zvoleny obohacení BHI bujónu o 3 % sacharózy, 5 % sacharózy a kombinací obohacení 5 % sacharózy spolu s 1 % glukózy. První částí tohoto experimentu bylo sledování vlivu na růst pomocí měření optické denzity.

U kmene *Bacillus* spp. (R23) nedocházelo k výrazné změně růstu (Obr. 27). Lag fáze trvala do 3 hodin od začátku kultivace u všech bujónů. Následovala fáze zrychleného růstu trvající od 3 hodin do 4 hodin kultivace. Log fáze byla do 9 hodin kultivace u všech bujónů kromě BHI obohaceného 5 % sacharózy a 1 % glukózy, kde byla do 10 hodin kultivace. Přes tuto malou odchylku od ostatních bujónů byla výsledná optická denzita stejná.



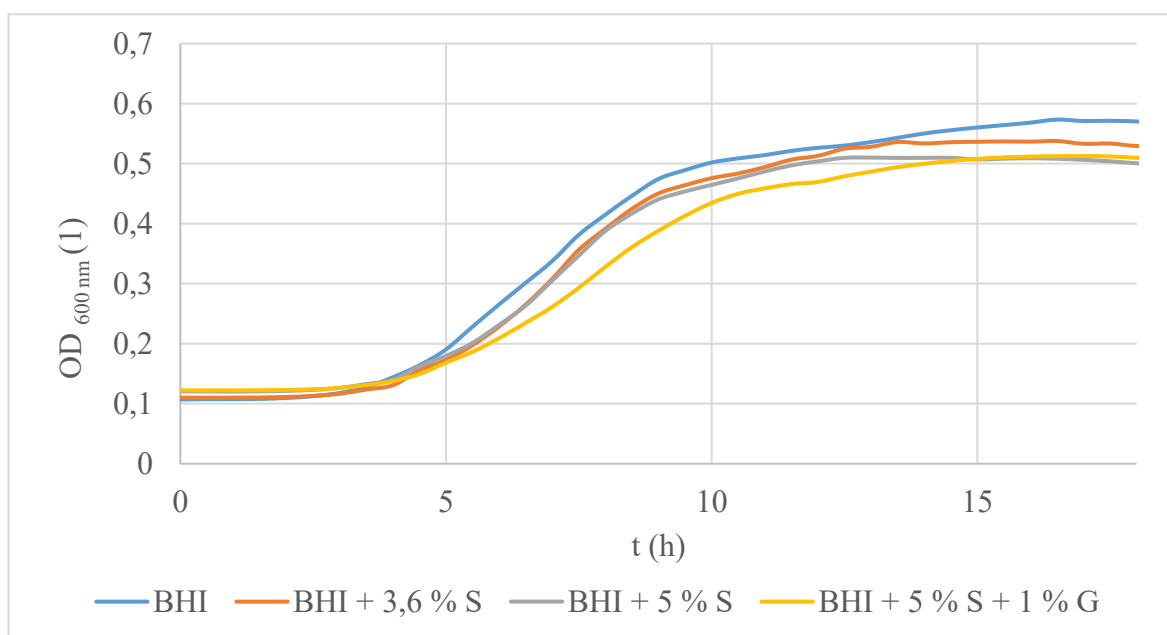
Obr. 27. Růstová křivka kmene R23 v různých bujónech (S – sacharóza, G – glukóza).

Na kmen *Bacillus subtilis* (R25) neměly přídavky sacharidů téměř žádný vliv (Obr. 28). Lag fáze trvala do 3 hodin kultivace a fáze zrychleného růstu byla od 3 hodin do 5 hodin kultivace. Další byly log fáze, která byla do 9 hodin kultivace, a fáze zrychleného růstu trávající 9–11 hodin kultivace.



Obr. 28. Růstová křivka R25 v různých bujonech (S – sacharóza, G – glukóza).

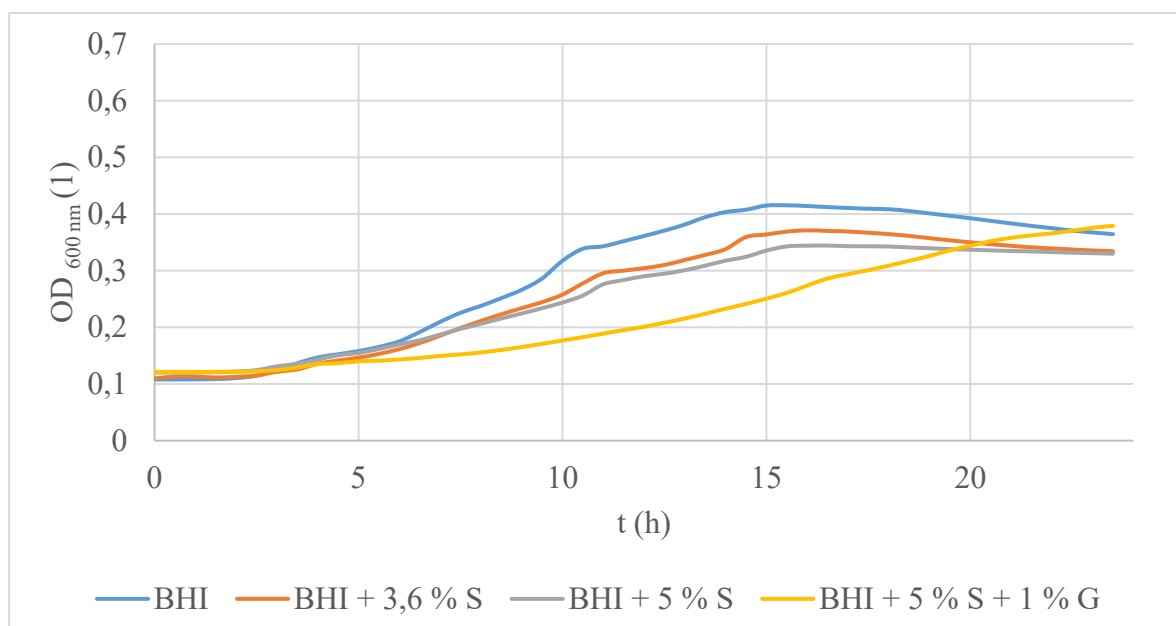
Na kmen *Bacillus pumilus* (R34) měly přídavky sacharidů malý vliv (Obr. 29). Lag fáze byla u všech bujónů stejná a byla do 3 hodin kultivace. Fáze zrychleného růstu trvala do 5 hodin kultivace u BHI bujónu, do 6 hodin u ostatních bujónů. Log fáze byla do 9 hodin kultivace u BHI a BHI obohacených o sacharózu. U BHI obohacený o 5 % sacharózy a 1 %



Obr. 29. Růstová křivka kmene R34 v různých bujonech (S – sacharóza, G – glukóza).

glukózy log fáze trvala do 10 hodin kultivace. Fáze zpomaleného růstu u BHI a BHI obohacených o sacharózu do 10 hodin a u BHI se sacharózou a glukózou do 13 hodin kultivace. Konečné optické denzity se mírně lišily a to tak, že s rostoucím obsahem sacharidů optická denzita klesala.

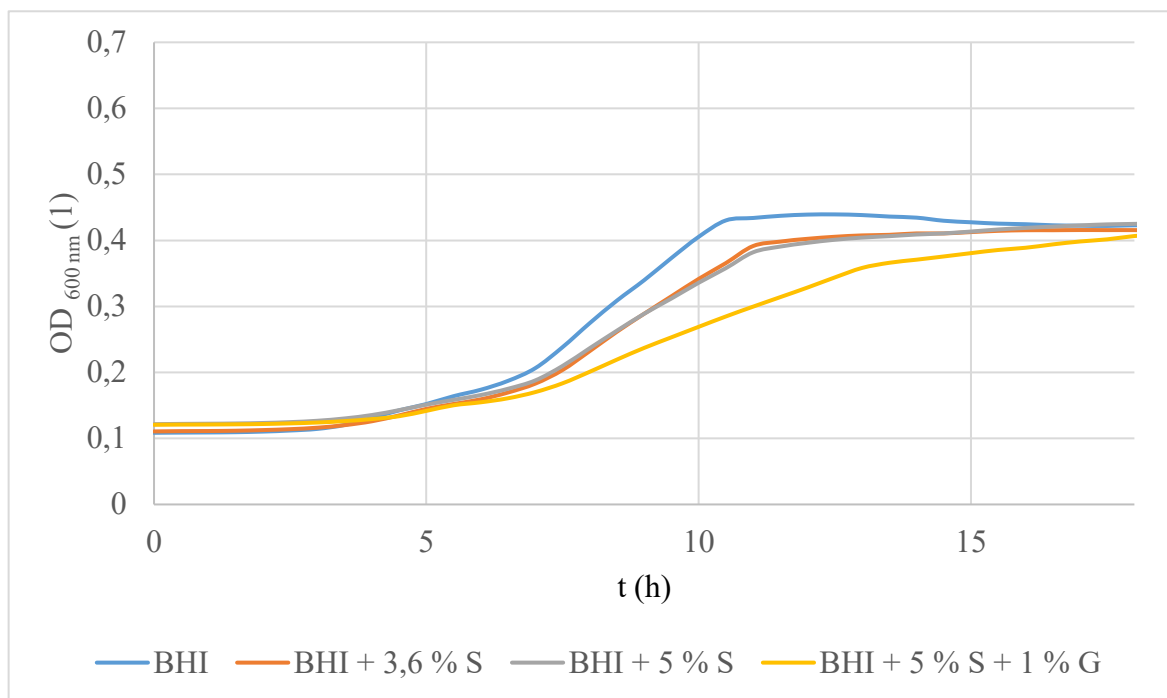
Přidávky sacharidů ovlivňovaly kmen *Acinetobacter lwoffii* (R39) (Obr. 30) výrazněji než u předchozích kmenů. Lag fáze trvala do 3 hodin kultivace u všech typů bujónu. Následující fáze zrychleného růstu byla do 4 hodin kultivace pro BHI a BHI obohacené o sacharózu. U BHI obohacenou o sacharózu a glukózu fáze zrychleného růstu trvala do 5 hodin kultivace. Log fáze byla u BHI do 14 hodin kultivace, u BHI obohacených o sacharózu do 15 hodin a u BHI obohacenou o sacharózu a glukózu do 24 hodin kultivace. Fáze zpomaleného růstu u BHI byla 15 hodin, u BHI obohacených o sacharózu do 16 hodin a u BHI obohacenou o sacharózu a glukózu již nebyla sledována, protože měření probíhalo po dobu 24 hodin kultivace. Největší konečnou optickou denzitu měl kmen *Acinetobacter lwoffii* (R39) v BHI obohacenou o sacharózu a glukózu, ovšem s pomalejším průběhem nárůstu. U ostatních bujónů docházelo k snižování optické denzity s přidávkou sacharózy.



Obr. 30. Růstová křivka kmene R39 v různých bujónech (S – sacharóza, G – glukóza).

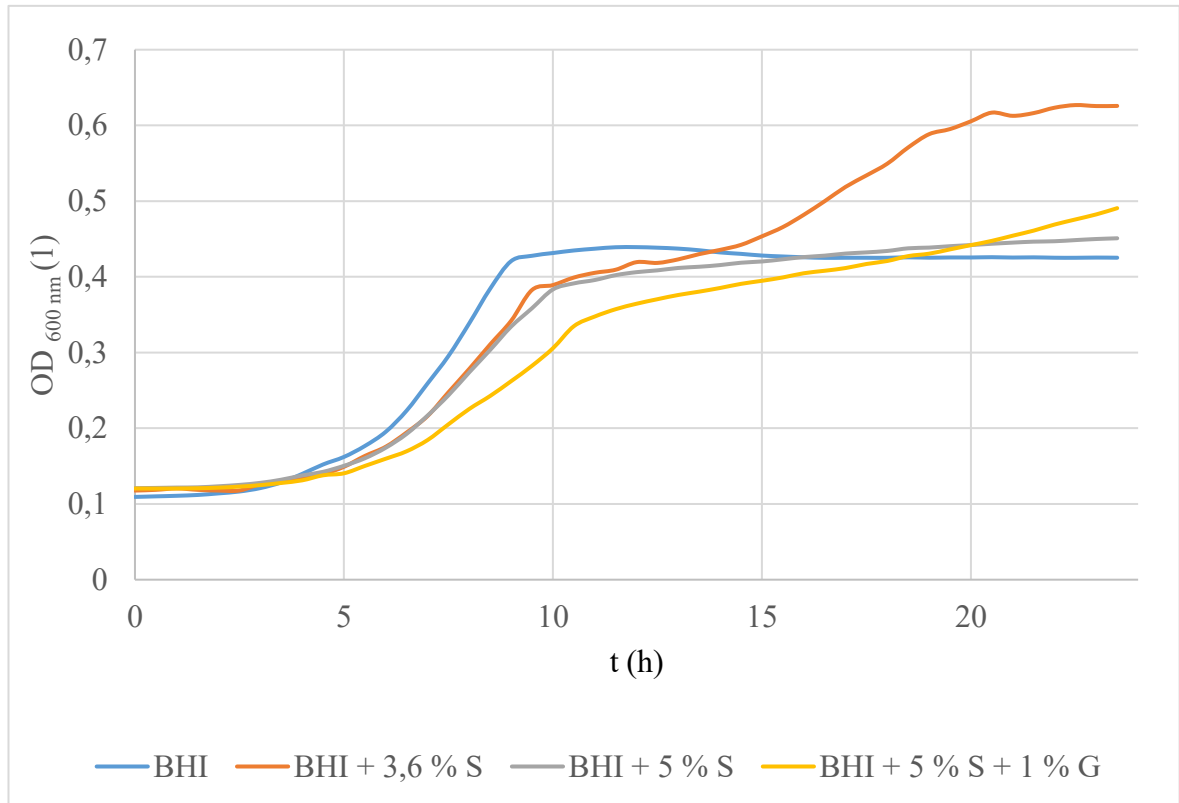
U kmene *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) (Obr. 31) se růst lišil mezi BHI, BHI se sacharózou a BHI se sacharózou a glukózou, ale nelišil se u BHI obohacenou 3 % sacharózy od BHI s 5 % sacharózy. Lag fáze trvala do 5 hodin kultivace a fáze zrychleného růstu do 7 hodin kultivace u všech typů bujónů. Log fáze do 10,5 hodin u BHI, do 11 hodin u obou BHI se sacharózou a do 13 hodin u BHI se sacharózou a glukózou. Fáze zpomaleného

růstu nenastala u žádného typu bujónu, protože docházelo k okamžitému zlomu do stacionární fáze. Výsledné optické density se nelišily.



Obr. 31. Růstová křivka kmene GK CIP 1/1 v různých bujónech (S – sacharóza, G – glukóza).

Posledním sledovaným kmenem byl *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) (Obr. 32). Lag fáze trvala do 4 hodin a fáze zrychleného růstu 6 hodin u všech bujónů. Log fáze byla do 9 hodin u BHI bujónu, do 10 hodin u BHI obohacených o sacharózu a do 11 hodin u BHI obohacených o sacharózu a glukózu. Po log fázi hned následovala stacionární fáze u všech bujónů kromě BHI obohaceného o sacharózu a glukózu, kde nastala fáze zpomaleného růstu trvající až do konce měření. U BHI obohaceného o 3,6 % sacharózy docházelo k opětovnému růstu a to tak, že 2. fáze zrychleného růstu trvala 14–15 hodin kultivace, 2. log fáze do 19 hodin kultivace, následovala fáze zpomaleného růstu trvající do 21 hodin, a nakonec nastala stacionární fáze.



Obr. 32. Růstová křivka kmene GK CIP 5/1 v různých bujónech (S – sacharóza, G – glukóza).

Při srovnání všech kmenů neměly přídavky sacharidů většinou zásadní vliv na růst. Obohacování bujónu o sacharidy způsobovalo většinou mírné zpomalování růstu. Nejvýraznější zpomalování růstu způsoboval BHI bujón obohacený o sacharózu a glukózu. Rozdíl mezi přídavkem 3 % sacharózy a 5 % sacharózy nebyl výrazný u žádného kmene kromě *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1), u kterého docházelo k sekundárnímu růstu. Sledováním vlivu různých druhů sacharydů se zabývali Kneifel, Rajal a Kulbe (2009), kteří zjistili, že bakterie rostou rychleji v glukóze než inulinu. Z toho lze vyvodit že sacharidy ovlivňují růst mikroorganismů i tvorbu biofilmu.

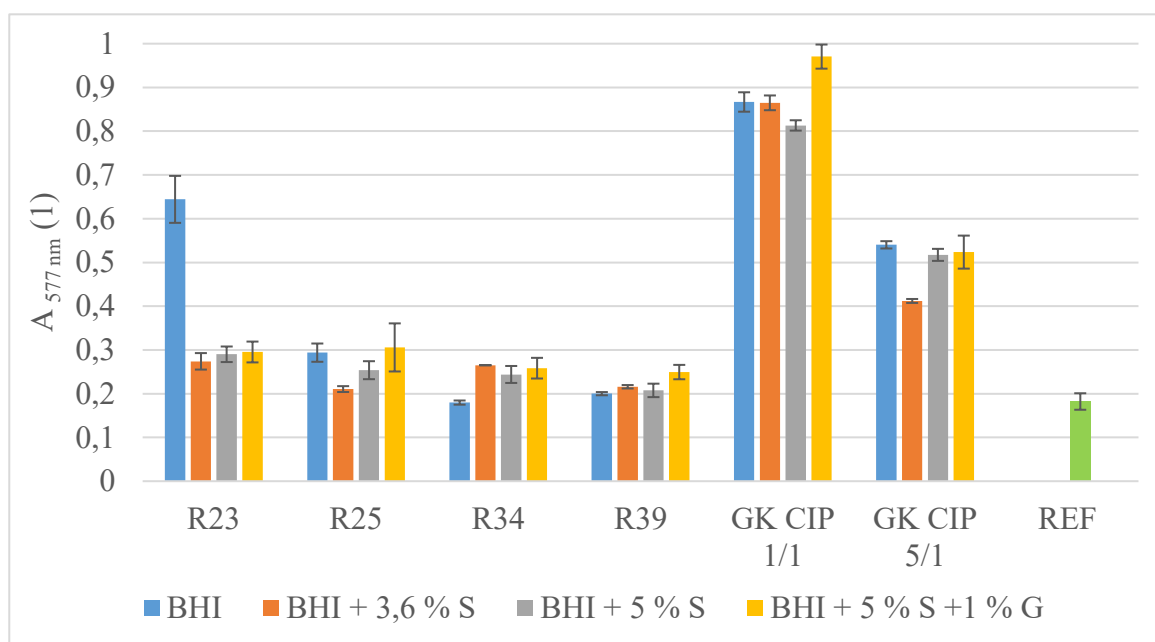


Tab. 9. Výsledky absorbance při průkazu biofilmu ovlivněné různými bujóny (S – sacharóza, G – glukóza, REF – reference).

Kmen	BHI	BHI + 3,6 % S	BHI + 5 % S	BHI + 5 % S +1 % G
<i>Bacillus</i> spp. (R23)	0,64 ± 0,06	0,274 ± 0,019	0,290 ± 0,018	0,30 ± 0,03
<i>Bacillus subtilis</i> (R25)	0,29 ± 0,02	0,211 ± 0,007	0,25 ± 0,02	0,31 ± 0,06
<i>Bacillus pumilus</i> (R34)	0,180 ± 0,005	0,2651 ± 0,0004	0,24 ± 0,02	0,26 ± 0,03
<i>Acinetobacter lwoffii</i> (R39)	0,200 ± 0,004	0,216 ± 0,004	0,208 ± 0,016	0,249 ± 0,017
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (GK CIP 1/1)	0,87 ± 0,03	0,865 ± 0,017	0,813 ± 0,012	0,97 ± 0,04
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (GK CIP 5/1)	0,540 ± 0,004	0,412 ± 0,005	0,517 ± 0,014	0,52 ± 0,03
REF	0,18 ± 0,03			

Druhou částí bylo sledování vlivu sacharidů na tvorbu biofilmu. Tvorba biofilmu byla sledována na mikrotitrační destičce pomocí barvení krystalovou violetí. Výsledky jsou uvedené v (Tab. 9) a následně byly s hraničními hodnotami, které byly stanoveny stejně jako u průkazu biofilmu v mikrotitrační destičce a MTT testu (viz kapitola 6.2.4). Netvořící biofilm měly absorbanci do 0,26, s produkcí slabého biofilmu od 0,26 do 0,53 a tvořící silný biofilm nad 0,53. Biofilm negativní byly kmeny *Bacillus subtilis* (R25) v BHI obohacených o sacharózu, *Bacillus pumilus* (R34) (kromě v BHI obohacených o 3,6 % sacharózy) a *Acinetobacter lwoffii* (R39) ve všech typech bujónů. Se slabou tvorbou biofilmu byly kmeny *Bacillus* spp. (R23) v bujónech obohacených o sacharidy, *Bacillus subtilis* (R25) v BHI a v BHI obohacenou o sacharózu a glukózu, *Bacillus pumilus* (R34) v BHI obohacenou o 3,6 % sacharózy a *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) v BHI obohacených o sacharidy. Se silnou produkcí biofilmu byly kmeny *Bacillus* spp. (R23) v BHI, *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) ve všech bujónech a *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) v BHI. Vliv sacharidů na tvorbu biofilmu byl různý. U *Bacillus* spp. (R23) sacharidy výrazně snižovaly tvorbu biofilmu. U *Bacillus subtilis* (R25) sacharóza mírně snižovala tvorbu, ale

u kombinace sacharózy s glukózou neměla vliv na tvorbu biofilmu. Na tvorbu biofilmu u *Bacillus pumilus* (R34) měl přídavek sacharidu pozitivní vliv. U *Acinetobacter lwoffii* (R39) mírně zvyšoval tvorbu biofilmu bujón s glukózou a sacharózou. U *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 1/1) přídavek 5 % sacharózy snižoval tvorbu biofilmu, ale kombinace sacharózy a glukózy zvyšoval tvorbu. U kmene *Stenotrophomonas maltophilia* (GK CIP 5/1) docházelo ke snižování tvorby biofilmy vlivem obohacení 3 % sacharózy. Z výsledků je patrné, že každý kmen je jedinečný a prospívají mu rozdílné podmínky. Všechny výsledky jsou graficky znázorněny v (Obr. 33).



Obr. 33. Velikost absorbance při průkazu biofilmu ovlivněnými různými bujóny (*S* – sacharóza, *G* – glukóza, *REF* – reference).

Existuje mnoho vlivů, které mohou ovlivnit růst jednotlivých bakterií, schopnost tvořit biofilm či tvořit extracelulární polymerní matrix. Jedna z látek, která snižuje velikost extracelulárního matrixu a tím pádem i snižuje i obranyschopnost bakterií je nízká koncentrace vitamínů C (Pandit *et al.*, 2017). Ovlivnit růst a tvorbu biofilmu by měli přídavky sacharidů, protože podle Ferreira *et al.* (2014), Mariena *et al.* (2009) a Kaiser *et al.* (2013) by měly zlepšovat výsledky CRA. Ovšem při našem sledování růstu bakterií a tvorbě biofilmu moc nezlepšovali růst, a naopak jej spíše zpomalovali. Při sledování tvorby biofilmu byl vliv sacharidů různý, což ukázalo jedinečné chování a potřeby jednotlivých bakteriálních kmenů.

## ZÁVĚR

Biofilmy mohou svou přítomností na polymerních površích ohrožovat zdraví jedinců, poškozovat materiál, ale na druhou stranu způsobují biodegradaci a lze využít jejich rychlou metabolickou aktivitu. V této práci byl posouzen růst biofilmu 6 bakteriálních kmenů na 4 biodegradabilních polymerech (PLA, PBAT, PBS a PBSA) a skle.

Jelikož byly testovány neznámé bakteriální kmeny, byly identifikovány nejprve fenotypově a dále pomocí sekvenace 16S rDNA a MALDI-TOF. Výslednými mikroorganismy byly *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Acinetobacter lwoffii* a dva odlišné kmeny *Stenotrophomonas maltophilia*. U všech těchto kmenů byla potvrzena produkce biofilmu. Nejsilněji produkovaly biofilm kmeny *Stenotrophomonas maltophilia* a *Bacillus subtilis*, tyto bakterie dokonce dokázaly růst na všech testovaných materiálech alespoň při jedné z testovaných metod. Nejmenší produkce biofilmu byla shledána na PLA a skle, které bylo použito především z důvodu srovnání tvorby biofilmu. Naopak k vysokému porůstání biofilmu docházelo u PBS a PBSA. U těchto dvou materiálů docházelo k růstu biofilmu všech testovaných kmenů, alespoň u jedné metody testování. Na PBAT byla prokázána dobrá produkce biofilmu pomocí MTT testu, ale u více kmenů nebyla prokázána produkce biofilmu metodou průkazu biofilmu v mikrotitrační destičce. Dá se tedy s určitostí říci, že se na PBAT pravděpodobně tvoří biofilm, protože výsledky z průkazu biofilmu v mikrotitrační destičce byly nejspíš zkresleny silným obarvováním samotného polymeru krystalovou violetí. Dále byl sledován vliv přísad sacharidů na růst a produkci biofilmu. Sacharidy neovlivňovaly nebo dokonce mírně zpomalovaly růst bakterií a na tvorbu biofilmu měly různý vliv, což dokázalo jedinečné potřeby jednotlivých testovaných kmenů.

Tato práce přináší jedinečné informace o biodegradabilních polymerech, které je následně předurčují k dalšímu použití buď jako nosiče biofilmu nebo naopak ty, na kterých se biofilm netvoří, pro použití do zdravotnictví (implantáty), či do potravinářského průmyslu (obaly). Dále při této práci byly posouzeny jednotlivé modifikace metody CRA a byla prokázána nejlepší spolehlivost výsledků u metody CRA<sub>bvc</sub>. Také v této práci byly provedeny modifikace průkazu biofilmu v mikrotitrační destičce a MTT testu, které jsou běžné pro testování kapalin, na testování pevných látek. Další studium by se mohlo zaměřit na vliv biofilmu na rychlost biodegradace. Použité a modifikované metody lze dále aplikovat na další polymerní materiály, kdeby takto mohl být posouzen vliv povrchových vlastností (drsnot, pórovitost, povrchové napětí) na tvorbu biofilmu.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

AHN, B. D. et al., 2001. Synthesis and characterization of the biodegradable copolymers from succinic acid and adipic acid with 1,4-butanediol. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. **82**(11), 2808–2826 [cit. 2018-09-15]. DOI: 10.1002/app.2135. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.2135>

ACHARYA, T., 2015. Gram Staining: Principle, Procedure and Results. *Microbe online* [online]. [cit. 2019-02-02]. Dostupné z: <https://microbeonline.com/gram-staining-principle-procedure-results/>

AIZAWA, S.-I., 2014. Bacillus subtilis — The Representative of Gram-Positive Bacteria. *The Flagellar World* [online]. Elsevier, s. 22–23 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1016/B978-0-12-417234-0.00004-9. ISBN 9780124172340. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124172340000049>

AMBROŽOVÁ, J., 2004. *Mikrobiologie v technologii vod*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-7080-534-x.

BALDASSARRI, L. et al., 1993. Variable fixation of staphylococcal slime by different histochemical fixatives. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **12**(11), 866–868.

BELT, H. van de et al., 2001. Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements: A review. *Acta Orthopaedica Scandinavica* [online]. **72**(6), 557–571 [cit. 2018-09-12]. DOI: 10.1080/000164701317268978. ISSN 0001-6470. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/000164701317268978>

BENARDINI, J. N. et al., 2003. Spore UV and Acceleration Resistance of Endolithic Bacillus pumilus and Bacillus subtilis Isolates Obtained from Sonoran Desert Basalt: Implications for Lithopanspermia. *Astrobiology* [online]. **3**(4), 709–717 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1089/153110703322736033. ISSN 1531-1074. Dostupné z: <http://www.liebert-pub.com/doi/10.1089/153110703322736033>

*Biopolymers facts statistics 2018* [online], 2018. 5. Hannover: IfBB – Institute for Bioplastics and Biocomposites [cit. 2019-02-28]. ISBN 2510-3431. Dostupné z: [https://www.ifbb-hannover.de/files/IfBB/downloads/faltblaetter\\_broschueren/Biopolymers-Facts-Statistics-2018.pdf](https://www.ifbb-hannover.de/files/IfBB/downloads/faltblaetter_broschueren/Biopolymers-Facts-Statistics-2018.pdf)

BRIASSOULIS, D., 2004. An Overview on the Mechanical Behaviour of Biodegradable Agricultural Films. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. **12**(2), 65–81 [cit. 2019-02-22]. Dostupné z: <https://link-springer-com.proxy.k.utb.cz/content/pdf/10.1023%2FB%3AJOOE.0000010052.86786.ef.pdf>

BROCCA, D., E. ARVIN a H. MOSBÆK, 2002. Identification of organic compounds migrating from polyethylene pipelines into drinking water. *Water Research* [online]. **36**(2002), 3675–3680 [cit. 2019-05-16]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/136c/537aaaf3ac179ab125365e2686f11c876d7a.pdf>

BROOKE, J. S., 2012. Stenotrophomonas maltophilia: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **25**(1), 2–41 [cit. 2019-02-02]. DOI: 10.1128/CMR.00019-11. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00019-11>

BRYERS, J. D., ed., c2000. *Biofilms II: process analysis and applications*. New York: Wiley. ISBN 978-0-471-29656-0.

BUSSCHER, H. J. a H. C. VANDER MEI, 2006. Microbial Adhesion in Flow Displacement Systems. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **19**(1), 127–141 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1128/CMR.19.1.127-141.2006. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.19.1.127-141.2006>

CARGILL, J S a M UPTON, 2009. Low concentrations of vancomycin stimulate biofilm formation in some clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. *Journal of Clinical Pathology* [online]. **62**(12), 1112–1116 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1136/jcp.2009.069021. ISSN 0021-9746. Dostupné z: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.2009.069021>

CERCA, N. et al., 2005. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. *Research in Microbiology* [online]. **156**(4), 506–514 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/j.resmic.2005.01.007. ISSN 09232508. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250805000185>

COSTERTON, J. W. et al., 1987. Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annual Review of Microbiology* [online]. **41**(1), 435–464 [cit. 2018-09-11]. DOI: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002251. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>

COSTERTON, J. W. et al., 1995. Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology* [online]. **49**(1), 711–745 [cit. 2018-09-11]. DOI: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>

COSTERTON, J. W., P. S. STEWART a E. P. GREENBERG, 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* [online]. **284**(5418), 1318–1322 [cit. 2018-09-11]. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318. ISSN 00368075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5418.1318>

DAROUICHE, R. O., 2001. Device-Associated Infections: A Macroproblem that Starts with Microadherence. *Clinical Infectious Diseases* [online]. **33**(9), 1567–1572 [cit. 2018-09-11]. DOI: 10.1086/323130. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/323130>

DAVIES, D. G. et al., 1998. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* [online]. **280**(5361), 295–298 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1126/science.280.5361.295. ISSN 00368075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.280.5361.295>

DAVIS, D., 2007. *Biofilm* [obrázek]. In: MONROE, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol* [online]. 2007, **5**(11) [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050307. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0050307>.

DI BONAVENTURA, G. et al., 2004. Biofilm Formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: Modulation by Quinolones, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, and Ceftazidime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **48**(1), 151–160 [cit. 2019-05-16]. DOI: 10.1128/AAC.48.1.151-160.2004. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.48.1.151-160.2004>

DONLAN, R. M. a J. W. COSTERTON, 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **15**(2), 167–193 [cit. 2018-08-18]. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>

DÜRR, S. a J. C. THOMASON, ed., 2010. *Biofouling*. Singapore: Blackwell Publishing. ISBN 9781405169264.

EARL, A. M., R. LOSICK a R. KOLTER, 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* [online]. **16**(6), 269–275 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1016/j.tim.2008.03.004. ISSN 0966842X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X08000887>

ELISABETH PHARMACON, SPOL. S R.O., *UltraClean: Microbial DNA Isolation Kit*, 2007. Brno.

ESTEVEZJ, 2012. Sanger-sequencing. In: *Khan Academy* [obrázek]. [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-molecular-genetics/hs-biotechnology/a/dna-sequencing>

FALLER, M. a T. KOHLER, 2017. The Status of Biofilms in Penile Implants. *Microorganisms* [online]. **5**(2) [cit. 2018-09-12]. DOI: 10.3390/microorganisms5020019. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2076-2607/5/2/19>

FERREIRA, A. A. et al., 2014. Detection of exopolysaccharide production and biofilm-related genes in *Staphylococcus* spp. isolated from a poultry processing plant. *Food Science and Technology (Campinas)* [online]. **34**(4), 710–716 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1590/1678-457X.6446. ISSN 1678-457X. Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612014000400010&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612014000400010&lng=en&nrm=iso&tlng=en)

FIELDS, B. S., R. F. BENSON a R. E. BESSER, 2002. Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **15**(3), 506–526 [cit. 2018-09-13]. DOI: 10.1128/CMR.15.3.506-526.2002. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.15.3.506-526.2002>

FLEET, G. H, ed., c1993. *Wine microbiology and biotechnology*. Philadelphia, Pa.: Harwood Academic Publishers. ISBN 3718652935.

FLEMMING, H.-C., 1998. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials\*. *Polymer Degradation and Stability* [online]. **59**(1–3), 309–315 [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1016/S0141-3910(97)00189-4. ISSN 01413910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391097001894>

FREBOURG, N. B. et al., 2000. PCR-Based Assay for Discrimination between Invasive and Contaminating *Staphylococcus epidermidis* Strains. *J Clin Microbiol* [online]. **38**(2), 877–880 [cit. 2019-05-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86232/>

FREEMAN, DJ, FR FALKINER a CT KEANE, 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* **42**(8), 872–874.

GADDY, J. A. a L. A. ACTIS, 2009. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiology* [online]. **4**(3), 273–278 [cit. 2019-05-16]. DOI: 10.2217/fmb.09.5. ISSN 1746-0913. Dostupné z: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.09.5>

GALIÉ, S. et al., 2018. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Frontiers in Microbiology* [online]. **9**(898), 1–18 [cit. 2018-09-13]. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00898. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00898/full>

GARCÍA-SÁNCHEZ, S. et al., 2004. *Candida albicans* Biofilms: a Developmental State Associated With Specific and Stable Gene Expression Patterns. *Eukaryotic Cell* [online]. **3**(2), 536–545 [cit. 2019-01-30]. DOI: 10.1128/EC.3.2.536-545.2004. ISSN 1535-9778. Dostupné z: <http://ec.asm.org/lookup/doi/10.1128/EC.3.2.536-545.2004>

GATSON, J. W. et al., 2006. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. **56**(7), 1475–1484 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1099/ijms.0.63946-0. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <http://ijms.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.63946-0>

GERACI, JE., 1977. Vancomycin. *Mayo Clin Proc.* [online]. **52**(10), 631–634 [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21724929>

GOMEZ-SUAREZ, C., H. J. BUSSCHER a H. C. VAN DER MEI, 2001. Analysis of Bacterial Detachment from Substratum Surfaces by the Passage of Air-Liquid Interfaces. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **67**(6), 2531–2537 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1128/AEM.67.6.2531-2537.2001. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.67.6.2531-2537.2001>

GORMAN, S. P. a M. M. TUNNEY, 1997. Assessment of Encrustation Behaviour on Urinary Tract Biomaterials. *Journal of Biomaterials Applications* [online]. **12**(2), 136–166 [cit. 2018-09-11]. DOI: 10.1177/088532829701200204. ISSN 0885-3282. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/088532829701200204>



GROVER-LAKOMIA, L. I. a E. FONG, c1999. *Microbiology for health careers*. 6th ed. [rev. and updated]. Albany, NY: Delmar Publishers. ISBN 0-7668-0917-x.

GU, J-D., 2003. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. **52**(2), 69–91 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/S0964-8305(02)00177-4. ISSN 09648305. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830502001774>

HABIB ULLAH, M., W. N. L. MAHADI a T. A. LATEF, 2015. Aerogel Poly(butylene succinate) Biomaterial Substrate for RF and Microwave Applications. *Scientific Reports* [online]. **5**(1) [cit. 2018-09-15]. DOI: 10.1038/srep12868. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep12868>

HALL-STOODLEY, L. a P. STOODLEY, 2002. Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol*. **13**(3), 228-233.

HANDKE, L. D. et al., 2004. Genetic and phenotypic analysis of biofilm phenotypic variation in multiple *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Journal of Medical Microbiology* [online]. **53**(5), 367–374 [cit. 2019-01-30]. DOI: 10.1099/jmm.0.05372-0. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.05372-0>

HARMON, S. M., D. A. KAUTTER a F. D. MCCLURE, 1984. Comparison of Selective Plating Media for Enumeration of *Bacillus cereus* in Foods. *Journal of Food Protection* [online]. **47**(1), 65–67 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.4315/0362-028X-47.1.65. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-47.1.65>

HILL, E. E. et al., 2006. Evolving trends in infective endocarditis. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. **12**(1), 5–12 [cit. 2018-09-11]. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01289.x. ISSN 1198743X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14638921>

HSUEH, Y.-H. et al., 2006. Biofilm Formation by *Bacillus cereus* Is Influenced by PlcR, a Pleiotropic Regulator. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **72**(7), 5089–5092 [cit. 2019-05-16]. DOI: 10.1128/AEM.00573-06. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00573-06>

CHANDRA, J. et al., 2001. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of Bacteriology* [online]. **183**(18),

5385–5394 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001>

CHANDRA, R. a R. RUSTGI, 1998. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science* [online]. **23**(7), 1273–1335 [cit. 2019-02-22]. DOI: 10.1016/S0079-6700(97)00039-7. ISSN 00796700. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670097000397>

CHARACKLIS, W. G. a K. C. MARSHALL, ed., 1990. *Biofilms*. New York: Wiley. ISBN 978-0471826637.

CHRISTENSEN, G. D. et al., 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* **22**(6), 996–1006.

*ISO 472:2013: Plastics — Vocabulary*, 2013. 4th ed. Switzerland: International Organization for Standardization.

JEFFERSON, K., 2004. What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **236**(2), 163–173 [cit. 2018-08-19]. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.06.005. ISSN 03781097. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.femsle.2004.06.005>

KAISER, T. D. L. et al., 2013. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. **75**(3), 235–239 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.014. ISSN 07328893. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073288931200497X>

KNEIFEL, W., A. RAJAL a K. D. KULBE, 2009. In vitro growth behaviour of probiotic bacteria in culture media with carbohydrates of prebiotic importance. *Microbial Ecology in Health and Disease* [online]. **12**(1), 27–34 [cit. 2019-05-16]. DOI: 10.1080/089106000435563. ISSN 1651-2235. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/089106000435563>

KOCHKODAN, V. et al., 2008. Adhesion of microorganisms to polymer membranes: a photobactericidal effect of surface treatment with TiO<sub>2</sub>. *Desalination* [online]. **220**(1–3), 380–385 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1016/j.desal.2007.01.042. ISSN 00119164. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011916407006364>

KOLÍSKO, M., 2017. Moderní metody sekvenování DNA. *Živa* [online]. Academia, SSČ AV ČR, **2017**(3), 73–76 [cit. 2019-02-08]. Dostupné z: <http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/moderni-metody-sekvenovani-dna.pdf>

KOPECKÁ, J. a G. ROTKOVÁ, c2017. Metody sterilní práce, očkování a uchovávání mikroorganismů. *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií* [online]. Brno: Masarykova univerzita [cit. 2019-02-27]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni\\_mikrobiologie/web/pages/steril\\_prace\\_ockovani\\_uchovavani.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/steril_prace_ockovani_uchovavani.html)

KRASOWSKA, A. a K. SIGLER, 2014. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 4(112), 1–7 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00112. ISSN 2235-2988. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00112/abstract>

LEHTOLA, MJ., IT. MIETTINEN a PJ. MARTIKAINEN, 2002. Biofilm formation in drinking water affected by low concentrations of phosphorus. *Can J Microbiol.* **48**(6), 494–499.

LEWANDOWSKI, Z. a H. BEYENAL, 2007. *Fundamentals of biofilm research*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 978-0849335419.

LI, Y. - H. a X. TIAN, 2012. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. *Sensors* [online]. **12**(3), 2519–2538 [cit. 2019-03-28]. DOI: 10.3390/s120302519. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/12/3/2519>

LINDOW, S. E., E. I. HECHT-POINAR a V. J. ELLIOTT, 2002. *Phyllosphere microbiology*. St. Paul, Minn.: APS Press/American Phytopathological Society. ISBN 0890542864.

LOPES, M. S., A. L. JARDINI a R. M. FILHO, 2014. Synthesis and Characterizations of Poly (Lactic Acid) by Ring-Opening Polymerization for Biomedical Applications. *Chemical engineering transactions* [online]. **38**, 331–336 [cit. 2018-09-15]. DOI: 10.3303/CET1438056. ISSN 978-88-95608-29-7. Dostupné z: <http://www.aedic.it/cet/14/38/056.pdf>

MARIANA, N. S. et al., 2009. Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin– resistance *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research.* **3**(6), 330–338. ISSN 1996-0808.

MARSHALL, K. C., ed., 1984. *Microbial Adhesion and Aggregation*. 1. Berlín: Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. ISBN 9783642701399.

MCLAUGHLIN-BORLACE, L. et al., 1998. Bacterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis. *Journal of Applied Microbiology.* **84**(5), 827–838.

MCPHERSON, M. J. a S. G. MØLLER, c2006. *PCR*. 2nd ed. New York: Taylor & Francis. Basics (Routledge (Firm)). ISBN 0-4153-5547-8.

MELOUN, M. a J. MILITKÝ, 2012. *Kompendium statistického zpracování dat*. Praha: Karolinum. ISBN 9788024621968.

MOLECULAR PROBES, INC., *LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits*, c2004. Eugene. Dostupné také z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp07007.pdf>

MORIKAWA, M., 2006. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. **101**(1), 1–8 [cit. 2019-05-16]. DOI: 10.1263/jbb.101.1. ISSN 13891723. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172306705333>

MOROHOSHI, T. et al., 2018. Biofilm Formation and Degradation of Commercially Available Biodegradable Plastic Films by Bacterial Consortia in Freshwater Environments. *Microbes and Environments* [online]. **33**(3), 332–335 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1264/jsme2.ME18033. ISSN 1342-6311. Dostupné z: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsme2/33/3/33\\_ME18033/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsme2/33/3/33_ME18033/_article)

MORRIS, C. E. a J.-M. MONIER, 2003. The ecological significance biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology* [online]. **41**(1), 429–453 [cit. 2018-09-13]. DOI: 10.1146/annurev.phyto.41.022103.134521. ISSN 0066-4286. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.41.022103.134521>

MUTHURAJ, R., M. MISRA a A. K. MOHANTY, 2015. Hydrolytic degradation of biodegradable polyesters under simulated environmental conditions. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. **132**(27), 42189 [cit. 2019-02-24]. DOI: 10.1002/app.42189. ISSN 00218995. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.42189>

NARAYAN, R., 1994. Impact of Governmental Policies, Regulations, and Standards Activities on an Emerging Biodegradable Plastics Industry. In: *Biodegradable Plastics and Polymers*. New York: Eds., Y. Doi & K. Fukuda, s. 261. Dostupné také z: <https://msu.edu/~narayan/impactofgovernmentpolicy.htm>

NEU, T. R., 1996. Significance of Bacterial Surface-Active Compounds in Interaction of Bacteria with Interfaces. *Microbiological reviews*. **60**(1), 151–166.

NIKOLAEV, Y. A. a V. K. PLAKUNOV, 2007. Biofilm—“City of microbes” or an analogue of multicellular organisms?. *Microbiology* [online]. **76**(2), 125-138 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1134/S0026261707020014. ISSN 0026-2617. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S0026261707020014>

NUNES, A. et al., 2006. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. **27**(4), 307–315 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.11.013. ISSN 09248579. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857906000252>

NYČ, O. a K. BUBENÍČEK, 2015. MALDI TOF: špičková technologie pro mikrobiologii 21. století. *Královéhradecký laboratorní bulletin: Informace pro lékaře a zdravotníky* [online]. (3), 1–2 [cit. 2019-02-03]. Dostupné z: [http://www.medila.cz/website/download/bulletin/medila\\_bull\\_3\\_2015\\_hk\\_KOMPLET.pdf/\\_showFile.php?fileId=247](http://www.medila.cz/website/download/bulletin/medila_bull_3_2015_hk_KOMPLET.pdf/_showFile.php?fileId=247)

O'GARA, J. P., 2007. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **270**(2), 179–188 [cit. 2019-01-30]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x>

OMMEN, P., N. ZOBK a R. L. MEYER, 2017. Quantification of biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. *Journal of Microbiological Methods* [online]. **141**, 87–89 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.08.003. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701217302117>

PANDIT, S. et al., 2017. Low Concentrations of Vitamin C Reduce the Synthesis of Extracellular Polymers and Destabilize Bacterial Biofilms. *Frontiers in Microbiology* [online]. **8** [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02599. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02599/full>

PARVATHI, A. et al., 2009. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Braz J Microbiol* [online]. **40**(2), 269–275 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1590/S1517-838220090002000012. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3769717/>

PAULI, N-C. et al., 2017. Macrofouling communities and the degradation of plastic bags in the sea: an in situ experiment. *R Soc Open Sci* [online]. **4**(10) [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.1098 / rsos.170549. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5666253/>

PUCHALSKI, M. et al., 2018. Molecular and Supramolecular Changes in Polybutylene Succinate (PBS) and Polybutylene Succinate Adipate (PBSA) Copolymer during Degradation in Various Environmental Conditions. *Polymers* [online]. **10**(3) [cit. 2018-09-15]. DOI: 10.3390/polym10030251. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/10/3/251>

RAAD, I., 1998. Intravascular-catheter-related infections. *The Lancet* [online]. **351**(9106), 893–898 [cit. 2018-09-11]. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)10006-X. ISSN 01406736. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067369710006X>

RATHINAVELU, S., Y. ZAVROS a J. L. MERCHANT, 2003. Acinetobacter lwoffii infection and gastritis. *Microbes and Infection* [online]. **5**(7), 651–657 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1016/S1286-4579(03)00099-6. ISSN 12864579. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457903000996>

REGALADO, N. G., G. MARTIN a S. J. ANTONY, 2009. Acinetobacter lwoffii: Bacteremia associated with acute gastroenteritis. *Travel Medicine and Infectious Disease* [online]. **7**(5), 316–317 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1016/j.tmaid.2009.06.001. ISSN 14778939. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1477893909000933>

RIEGER, B. a M. AMANN, c2012. *Synthetic biodegradable polymers*. New York: Springer. Advances in polymer science, 245. ISBN 978-3-642-27153-3.

RIJNAARTS, H. H. M. et al., 1995. The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. **4**(4), 191–197 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1016/0927-7765(94)01164-Z. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/092777659401164Z>

RISS, T. L., 2018. Cell Viability Assays. SITTAMPALAM, G. S. et al., ed. *Assay Guidance Manual* [online]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD), 1. 7. 2016, s. 357–388 [cit. 2019-05-16]. Dostupné z: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/pdf/Bookshelf\\_NBK53196.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/pdf/Bookshelf_NBK53196.pdf)

- RIVAS, R. et al., 2004. Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes. *Journal of Microbiological Methods* [online]. **56**(3), 413–426 [cit. 2019-02-03]. DOI: 10.1016/j.mimet.2003.11.007. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701203003233>
- RUDNIK, E., c2008. *Compostable polymer materials*. Boston: Elsevier. ISBN 978-0-08-045371-2.
- RULÍK, M. et al., 2011. *Mikrobiální biofilmy*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-2747-8.
- RŮŽIČKA, F. et al., 2004. Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiologica* [online]. **49**(5), 596–600 [cit. 2018-09-15]. DOI: 10.1007/BF02931540. ISSN 0015-5632. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02931540>
- RŮŽIČKA, F. et al., 2007. Capillary Isoelectric Focusing — Useful tool for detection of the biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Microbiological Methods* [online]. **68**(3), 530–535 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.10.008. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701206003198>
- SEDLÁČEK, I., 2007. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-4207-9.
- SCHINDLER, J., 2001. Mikrobiální biofilm. *Vesmír*. **80**(4), 203–206. ISSN 1214-4029. Dostupné také z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2001/cislo-4/mikrobialni-biofilm.html>
- SCHINDLER, J., 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2. Praha: Grada. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4771-2.
- SIN, L. T., A. R. RAHMAT a W. A. W. A. RAHMAN, 2013. *Polylactic acid: PLA biopolymer technology and applications*. Boston: Elsevier, WA. ISBN 978-1-4377-4459-0.
- STEPANOVIĆ, S. et al., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* [online]. **115**(8), 891–899 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_630.x. ISSN 0903-4641. Dostupné z: [http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)

STICKLER, DJ. et al., 2002. Strategies for the control of catheter encrustation. *Int J Anti-microb Agents*. **19**(6), 499–506.

STODDARD, A. M. et al., 2015. Fertility after Intrauterine Device Removal: A Pilot Study. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care* [online]. **20**(3), 223–230 [cit. 2018-09-11]. DOI: 10.3109/13625187.2015.1010639. ISSN 1362-5187. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13625187.2015.1010639>

STOODLEY, P. et al., 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology* [online]. **56**(1), 187–209 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>

TEIXEIRA, P. a R. OLIVEIRA, 2002. Metabolism of *Alcaligenes denitrificans* in biofilm vs planktonic cells. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **92**(2), 256–260 [cit. 2018-08-19]. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01525.x. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2002.01525.x>

THOMAS, S. et al., 2013. *Natural polymers, biopolymers, biomaterials, and their composites, blends, and IPNs*. Toronto: Apple Academic Press. Advances in materials science, volume 2. ISBN 978-1-926895-16-1.

TSERKI, V. et al., 2006. Biodegradable aliphatic polyesters. Part I. Properties and biodegradation of poly(butylene succinate-co-butylene adipate). *Polymer Degradation and Stability* [online]. **91**(2), 367–376 [cit. 2019-02-23]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2005.04.035. ISSN 01413910. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391005002089>

TUMBARELLO, M. et al., 2007. Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **45**(6), 1843–1850 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1128/JCM.00131-07. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00131-07>

UHLÍK, O. et al., 2013. Identifikace a charakterizace bakterií s bioremediačním potenciálem – od kultivace k metagenomice. *Chemické listy* [online]. **107**, 614–622 [cit. 2019-02-03]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013\\_08\\_614-622.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_08_614-622.pdf)



VROMAN, I. a L. TIGHZERT, 2009. Biodegradable Polymers. *Materials* [online]. **2**(2), 307–344 [cit. 2019-02-22]. DOI: 10.3390/ma2020307. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/2/2/307>

WAITE, R. D. et al., 2005. Transcriptome Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Growth: Comparison of Gene Expression in Planktonic Cultures and Developing and Mature Biofilms. *Journal of Bacteriology* [online]. **187**(18), 6571–6576 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1128/JB.187.18.6571-6576.2005. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.187.18.6571-6576.2005>

WATANABE, Y. et al., 1976. Purification and properties of a polyvinyl alcohol-degrading enzyme produced by a strain of *Pseudomonas*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **174**(2), 575–581 [cit. 2019-02-22]. DOI: 10.1016/0003-9861(76)90386-6. ISSN 00039861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003986176903866>

WILLIAMS, S. C. et al., 1998. Distinguishing between living and nonliving bacteria: Evaluation of the vital stain propidium iodide and its combined use with molecular probes in aquatic samples. *Journal of Microbiological Methods* [online]. **32**(3), 225–236 [cit. 2019-02-08]. DOI: 10.1016/S0167-7012(98)00014-1. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701298000141>

XU, J. a B.-H. GUO, 2010. Poly(butylene succinate) and its copolymers: Research, development and industrialization. *Biotechnology Journal* [online]. **5**(11), 1149–1163 [cit. 2019-02-24]. DOI: 10.1002/biot.201000136. ISSN 18606768. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.201000136>

ZACHOVALOVÁ, A., 2011. *Mikrobiologie a parazitologie. 2*. Kroměříž: Tauferova střední odborná škola veterinární.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BAB-2	Krevní agarová báze 2 (Blood agar base 2)
BHI	Mozko-srdcová infuze (Brain-heart infusion)
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CRA	Agar s kongo červení (Congo-red agar)
CRAvc	Vankomycinový agar s kongo červení
CSLM	Konfokální skenovací laserová mikroskopie
CTT	Christensenova zkumavková metoda (Christensen tube test)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EC	<i>Escherichia coli</i>
G	Glukóza
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
JBPA	Japonská bioplastická asociace
MALDI-TOF	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem
mCRA	Modifikovaný agar s kongo červení
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)- 2H-tetrazolium
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
NaCl	Chlorid sodný
NK	Nukleová kyselina
PBAT	Poly(butylem adipát-co-tereftalát)
PBS	Poly(1,4-butylensukcinát)
PBSA	Polybutylem-sukcinát adipát

---

PCR	Polymerázová řetězová reakce
pI	Izoelektrický bod
PLA	Kyselina polymléčná
REF	Reference
S	Sacharóza
WST-1	2-(4-jodfenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium
XTT	2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-karboxanilid

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Vznik a vývoj biofilmu (Davis,2007; upraveno dle Rulík et al., 2011). .....	12
Obr. 2. Schéma Sangerovy sekvenace (Estevezj, 2012; upraveno dle Kolísko, 2017). .....	20
Obr. 3. Růstová křivka. Plná čára – celkový počet mikroorganismů (živých i mrtvých), přerušovaná – počet živých mikroorganismů (Kopecká a Rotková, c2017).....	21
Obr. 4. Mechanismus MTT metody. ....	25
Obr. 5. Celosvětová produkce biopolymerů pro jednotlivé aplikace v roce 2017 (* včetně jídelního servisu, ** včetně netkaných textilií a vláken, *** včetně pouzdra) (Biopolymers facts statistics 2018, 2018; upraveno). ....	27
Obr. 6. PLA.....	28
Obr. 7. PBAT.....	28
Obr. 8. PBS.....	29
Obr. 9. PBSA.....	29
Obr. 10. Mechanismus biodegradace polymerů (Davis,2007; upraveno dle Flemming, 1998).....	30
Obr. 11. Závislost absorbance na vlnové délce pro krystalovou violet'.....	39
Obr. 12. Růstová křivka testovaných bakteriálních kmenů.....	42
Obr. 13. Růst R25 na Agarové bázi Bacillus cereus.....	42
Obr. 14. Růst kolonií na CRA po 72 hodinách kultivace při 30 °C (1/1 – GK CIP 1/1, 5/1 – GK CIP 5/1 a E.C – Escherichia coli CCM 3954). ....	44
Obr. 15. Růst bakterií na CRA s 3,6 % sacharózy (vrchní) a 5 % sacharózy (spodní) po 72 hodinách kultivace ve 30 °C.....	45
Obr. 16. Růst bakterií na mCRA po 72 hodinách kultivace při 30 °C.....	46
Obr. 17. Růst bakterií na CRAbvc po 96 hodinách kultivace při 30 °C.....	46
Obr. 18. Růst bakterií na CRAbvc 2 % NaCl po 72 hodinách kultivace při 30 °C....	47
Obr. 19. Obarvené testované kmeny bakterií krystalovou violetí na sledovaných materiálech (A – kmen R23 na PLA, B – kmen R25 na skle, C – kmen R34 na PBAT, D – kmen R39 na PBS, E – kmen GK CIP 1/1 na PBSA, F – kmen GK CIP 5/1 na PBAT.....	49
Obr. 20. Obarvené bakteriální buňky GK CIP 1/1 fluorescenčním barvivem (zelené – živé, červené – mrtvé) na PLA po 24 hodinách a 5 dnech kultivace. ....	50

Obr. 21. Obarvené bakteriální buňky GK CIP 1/1 fluorescenčním barvivem (zelené – živé, červené – mrtvé) na PBAT po 24 hodinách a 5 dnech kultivace.....	51
Obr. 22. Obarvené bakteriální buňky GK CIP 1/1 fluorescenčním barvivem (zelené – živé, červené – mrtvé) na PBS po 24 hodinách a 5 dnech kultivace.....	51
Obr. 23. Obarvené bakteriální buňky GK CIP 1/1 fluorescenčním barvivem (zelené – živé, červené – mrtvé) na PBSA po 24 hodinách a 5 dnech kultivace.....	52
Obr. 24. Obarvené bakteriální buňky GK CIP 1/1 fluorescenčním barvivem (zelené – živé, červené – mrtvé) na sklu po 24 hodinách a 5 dnech kultivace. ....	52
Obr. 25. Velikost biofilmu stanovená pomocí průkazu biofilmu na mikrotitrační destičce. ....	55
Obr. 26. Velikost biofilmu stanovená pomocí MTT testu. ....	57
Obr. 27. Růstová křivka kmene R23 v různých bujónech (S – sacharóza, G – glukóza). ....	59
Obr. 28. Růstová křivka R25 v různých bujónech (S – sacharóza, G – glukóza). ....	60
Obr. 29. Růstová křivka kmene R34 v různých bujónech (S – sacharóza, G – glukóza). ....	60
Obr. 30. Růstová křivka kmene R39 v různých bujónech (S – sacharóza, G – glukóza). ....	61
Obr. 31. Růstová křivka kmene GK CIP 1/1 v různých bujónech (S – sacharóza, G – glukóza). ....	62
Obr. 32. Růstová křivka kmene GK CIP 5/1 v různých bujónech (S – sacharóza, G – glukóza). ....	63
Obr. 33. Velikost absorbance při průkazu biofilmu ovlivněnými různými bujóny (S – sacharóza, G – glukóza, REF – reference). ....	65

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1. Složení diagnostického agaru s kongo červení.....	23
Tab. 2. Teploty lisování pro použitý materiál.....	32
Tab. 3. Program PCR reakce. ....	35
Tab. 4. Složení připravených agarů s kongo červení (S – sacharóza). ....	37
Tab. 5. Identifikace pomocí 16S rDNA - nejvyšší dosažené shody částečných sekvenací studovaných kmenů s databází. ....	43
Tab. 6. Nejvyšší dosažená skóre u identifikace pomocí MALDI-TOF. ....	43
Tab. 7. Hraniční hodnoty pro průkaz tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce. ....	53
Tab. 8. Hraniční hodnoty pro MTT test.....	56
Tab. 9. Výsledky absorpance při průkazu biofilmu ovlivněné různými bujóny (S – sacharóza, G – glukóza, REF – reference). ....	64