

# **Inhibiční účinky vybraných mastných kyselin na biofilm pozitivní bakterie**

Lucie Žurková

---

Bakalářská práce  
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie Žurková**

Osobní číslo: **T16358**

Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Inhibiční účinky vybraných mastných kyselin na biofilm pozitivní bakterie**

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:

**SIVAMANI, Raja K., Jared R. JAGDEO, Peter ELSNER a Howard I. MAIBACH. *Cosmeceuticals and active cosmetics*. Third edition. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2016. ISBN 978-1-4822-1417-8.**

**BERLANGA, Mercedes, Laura GOMEZ-PEREZ a Ricardo GUERRERO. Biofilm formation and antibiotic susceptibility in dispersed cells versus planktonic cells from clinical, industry and environmental origins. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2017, 110(12), 1691-1704.**

**DOI: 10.1007/s10482-017-0919-2. ISSN 0003-6072. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-017-0919-2>**

**ALHEDE, Morten, Özge ER, Steffen EICKHARDT, et al. Bacterial biofilm formation and treatment in soft tissue fillers. *Pathogens and Disease*. 2014, 70(3), 339-346. DOI:**

**10.1111/2049-632X.12139. ISSN 2049632X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/2049-632X.12139>**

**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:

**20. května 2019**

Ve Zlíně dne 12. března 2019

L.S.

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

doc. Ing. Marián Lehotský, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## 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 užít 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 .....

.....

<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 požítovat 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, užíje-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 vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>31)</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). Dápirá-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 užit 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

Bakalářská práce je zaměřena na inhibiční účinky vybraných mastných kyselin na bakterie tvořící biofilm izolovaných z mléčných výrobků. V teoretické části práce je vysvětlen princip tvorby a struktura biofilmu i jeho význam. V práci je rovněž popsána charakteristika a struktura použitých mastných kyselin a obecný popis antibakteriálních účinků a fyzikálních vlastností. V experimentální části jsou zhodnoceny inhibiční účinky mastných kyselin na růst grampozitivních i gramnegativních tyčinek a tvorbu biofilmu. Největší antimikrobní vlastnosti vykazovala MK C<sub>11:1</sub> již při nízkých koncentracích na všechny testované bakterie. Bakteriostaticky působila MK C<sub>12:0</sub> již v koncentraci 25 mg·l<sup>-1</sup> na rod *Bacillus* kromě *Bacillus tequilensis*. Baktericidní účinky vykazovala MK C<sub>12:0</sub> při koncentraci 250 mg·l<sup>-1</sup> na všechny sledované bacily. Málo účinné mastné kyseliny vůči růstu bacilů byly MK C<sub>8:0</sub> a MK C<sub>18:0</sub>. Naopak na bakterii *Stenotrophomonas maltophilia* působila inhibičně MK C<sub>18:0</sub> již od koncentrace 25 mg·l<sup>-1</sup>. Biofilm produkovaný *Stenotrophomonas maltophilia* byl vůči působení všech MK odolný.

Klíčová slova: biofilm, MALDI TOF, mastné kyseliny, PCR, růstová křivka

## ABSTRACT

The bachelor thesis is focused on the inhibitory effects of selected fatty acids on biofilm bacteria isolated from dairy products. The theoretical part explains the principle of biofilm formation and structure and its importance. The thesis also describes the characteristics and structure of fatty acids used and a general description of antibacterial effects and physical properties. In the experimental part, the inhibitory effects of fatty acids on the growth of gram-positive and gram-negative rods and biofilm formation are evaluated. MK C<sub>11:1</sub> showed the greatest antimicrobial properties even at low concentrations on all tested bacteria. MK C<sub>12:0</sub> was already bacteriostatically active at a concentration of 25 mg·l<sup>-1</sup> per genus *Bacillus* except *Bacillus tequilensis*. MK C<sub>12:0</sub> showed a bactericidal effect at a concentration of 250 mg·l<sup>-1</sup> on all the observed bacilli. Low potency fatty acids to bacilli growth were MK C<sub>8:0</sub> and MK C<sub>18:0</sub>. On the other hand, *Stenotrophomonas maltophilia* was inhibited by MK C<sub>18:0</sub> already at 25 mg·l<sup>-1</sup>. The biofilm produced by *Stenotrophomonas maltophilia* was resistant to all MK.

Keywords: biofilm, MALDI TOF, fatty acids, PCR, growth curve

## Poděkování

Ráda bych poděkovala mému vedoucímu bakalářské práce Ing. Pavlu Plevovi Ph.D. za cenné rady a čas, který mi věnoval při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Veronice Kučabové a Olze Vlčkové za vstřícnost a pomoc při realizaci experimentů v mikrobiologické laboratoři. V neposlední řadě chci také poděkovat prof. Ing. Miroslavě Kačániové Ph.D. za zpracování výsledků a identifikaci bakterií pomocí hmotnostní spektrometrie a svému příteli za psychickou podporu a motivaci.

## Prohlášení

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

# OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ÚVOD.....</b>  | <b>10</b> |
| <b>I TEORETICKÁ ČÁST.....</b>                             | <b>11</b> |
| <b>1 BIOFILM .....</b>                                    | <b>12</b> |
| 1.1    DEFINICE BIOFILMU .....                            | 12        |
| 1.2    VÝZNAM BIOFILMU .....                              | 13        |
| 1.2.1    Zubní plak .....                                 | 13        |
| 1.2.2    Biofilm na umělých površích .....                | 14        |
| 1.2.3    Biofilm v kosmetice .....                        | 15        |
| 1.2.4    Biofilm v potravinářství .....                   | 15        |
| 1.3    TVORBA A ZÁNİK BIOFILMU.....                       | 16        |
| 1.4    PREVENCE VZNIKU A ZPŮSOBY ODSTRANĚNÍ BIOFILMU..... | 17        |
| 1.5    METODY PRŮKAZU BIOFILMU.....                       | 18        |
| <b>2 MASTNÉ KYSELINY .....</b>                            | <b>19</b> |
| 2.1.1    Kyselina kaprylová.....                          | 19        |
| 2.1.2    Kyselina kaprinová.....                          | 20        |
| 2.1.3    Kyselina laurová.....                            | 20        |
| 2.1.4    Kyselina palmitová.....                          | 21        |
| 2.1.5    Kyselina stearová .....                          | 21        |
| 2.1.6    Kyselina undecenová .....                        | 21        |
| 2.2    FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI MASTNÝCH KYSELIN .....        | 22        |
| 2.3    ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINKY MASTNÝCH KYSELIN .....      | 22        |
| <b>3 BAKTERIE.....</b>                                    | <b>24</b> |
| 3.1    GRAMNEGATIVNÍ BAKTERIE.....                        | 24        |
| 3.1.1 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....           | 24        |
| 3.2    GRAMPOZITIVNÍ BAKTERIE.....                        | 25        |
| 3.2.1 <i>Bacillus tequilensis</i> .....                   | 25        |
| 3.2.2 <i>Bacillus subtilis</i> .....                      | 25        |
| 3.2.3 <i>Bacillus pumilus</i> .....                       | 26        |
| 3.2.4 <i>Bacillus cereus</i> .....                        | 26        |
| <b>4 ANALÝZA DNA A IDENTIFIKACE BAKTERIÍ.....</b>         | <b>27</b> |
| 4.1    PCR – POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE .....           | 27        |
| 4.2    MALDI TOF – HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....          | 27        |
| <b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>                            | <b>29</b> |
| <b>5 ZAŘÍZENÍ, POMŮCKY A CHEMIKÁLIE .....</b>             | <b>30</b> |
| 5.1    POUŽITÉ ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY .....                   | 30        |
| 5.2    POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....                            | 30        |
| <b>6 METODIKA PRÁCE.....</b>                              | <b>32</b> |



|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 6.1      | POSTUP IZOLACE DNA .....  | 32        |
| 6.2      | PŘÍPRAVA PCR REAKČNÍ SMĚSI .....  | 33        |
| 6.3      | PRŮBĚH PCR.....   | 33        |
| 6.4      | PŘÍPRAVA VZORKU PRO HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRII .....                      | 34        |
| 6.5      | VÝSLEDKY IDENTIFIKAČNÍCH METOD.....                                     | 34        |
| 6.6      | PŘÍPRAVA ŽIVNÉHO MÉDIA A BAKTERIÁLNÍ SUSPENZE .....                     | 35        |
| 6.7      | SLEDOVÁNÍ INHIBIČNÍHO ÚČINKU MK NA RŮST BAKTERIÍ A JEJICH BIOFILM ..... | 35        |
| <b>7</b> | <b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>  | <b>37</b> |
| 7.1      | KYSELINA KAPRYLOVÁ .....  | 37        |
| 7.2      | KYSELINA KAPRINOVÁ .....  | 40        |
| 7.3      | KYSELINA LAUROVÁ .....  | 43        |
| 7.4      | KYSELINA PALMITOVÁ .....  | 46        |
| 7.5      | KYSELINA STEAROVÁ.....  | 49        |
| 7.6      | KYSELINA UNDECENOVÁ.....  | 52        |
| <b>8</b> | <b>ZÁVĚR.....</b>   | <b>55</b> |
|          | <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>                                   | <b>56</b> |
|          | <b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>                          | <b>66</b> |
|          | <b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>   | <b>67</b> |
|          | <b>SEZNAM TABULEK.....</b>  | <b>68</b> |

## ÚVOD

Bakterie a jiné mikroorganismy v přírodě mohou žít ve formě planktonu nebo mnohem častěji vytvářejí společenstva, která jsou přichycena k podkladu a vytváří organizovanou strukturu – biofilm. Mikrobiální biofilmy byly poprvé popsány v roce 1936 a následný výzkum odhalil jejich všudypřítomnost a fyziologické rozdíly od volně žijících planktonických mikroorganismů. Tato organizovaná struktura je tvořena polysacharidovou nebo proteinovou substancí, jež je protkaná sítí mikrokanálek zajišťující přísun živin.

Kromě přírodního prostředí, kde se mohou biofilmy tvořit zejména ve vodním prostředí, se také vyskytují na cizích tělesech v lidském těle, dále v podobě zubního plaku nebo způsobují koroze. Na druhou stranu mají i prospěšnou roli nejen v biotechnologiích a technologiích pro čištění odpadních vod, ale jsou i součástí střevní mikroflóry člověka.

Bakterie tvořící biofilm jsou schopné na rozdíl od planktonických forem mikroorganismů přežít v extrémních podmínkách, mají vyšší odolnost vůči působení toxických látek a ultrafialového záření a vykazují vyšší stupeň rezistence k antimikrobiálním látkám (Rulík, 2011).

Těmito látkami použitými v mé práci jsou mastné kyseliny. Jsou to látky přírodního charakteru, jejichž antimikrobiální aktivita je závislá na stupni a typu nasycenosti a délce uhlíkového řetězce.

Cílem mé práce je zhodnotit inhibiční účinek vybraných mastných kyselin na růst bakterií a tvorbu biofilmu.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 BIOFILM

## 1.1 Definice biofilmu

Bakteriální buňky volně žijící jsou neustále napadány nepředvídatelnými podmínkami, které jsou závislé na počasí, lidské činnosti, množství antimikrobiálních látek a invazi různých druhů predátorů. Existence a tvorba biofilmu je pro bakterie z mnoha důvodů výhodnější a ve většině prostředí také je základním způsobem jejich přirozené existence. Bakterie mají přirozenou tendenci se lepit, přilnout na pevný povrch (Schindler, 2001). Oproti bakteriím rostoucím v planktonické formě, biofilm buňkám pomáhá koncentrovat zředěné živiny ve vodě, zprostředkovávat aktivní interakce mezi druhy pro expresi a přenos vhodného genetického materiálu (Lee, c2013). Také chrání buňky v biofilmu před mechanickým poškozením, vysušením, UV zářením, toxickým látkám a bakteriofágy (Rulík, 2011).

Bakterie mohou tvořit biofilmy na površích biotických (ovoce, maso) nebo abiotických (stěny potrubí, kanalizace, zařízení) (Ray a Bhunia, 2014). Biofilm lze nalézt i v lékařských a průmyslových zařízeních, v půdních a vodních prostředích, ale také na površích v živých tkáních či součástí mikroflóry člověka (Lee, c2013).

Biofilm není homogenní struktura, ale skládá se z četných dutin a agregátů. Bakterie jsou v biofilmu rozloženy nerovnoměrně, rostou ve shlucích (mikrokoloniích), které mohou být kuželovitého nebo houbovitého tvaru. Tyto mikrokolonie jsou spojeny pomocí spleťových kanálků (Schindler, 2001). Biofilm je složen především z vody, organických látek, anorganických usazenin, které jsou přinášeny kapalinou omývající biofilm zvenčí, z životaschopných buněk, ale i mrtvých, které produkují sliz, jež je tvořen extracelulární polymerní substancí (EPS), která obsahuje směs polysacharidů, proteinů a DNA (Lee, c2013). EPS je zdrojem živin, pomáhá odolávat dezinfekci a fyzickému odstranění z povrchu (Ray a Bhunia, 2014). Obecně lze říci, že podíl EPS v biofilmech se může pohybovat v rozmezí zhruba 50 až 90 % celkové organické hmoty (Schulte *et al.*, 2005).

## 1.2 Význam biofilmu

Pro mikroorganismy tvořící biofilm je typické, že se běžně vyskytují jako součást normální mikroflóry například v trávicím traktu, kde dochází k rozkladu látek, které naše vlastní enzymy nejsou schopny štěpit, stejně jako produkce látek, které si lidské tělo samo vyrobit nedokáže (např. vitamín K). Dalším příkladem může být tvorba bakteriocinů nebo kyseliny mléčné, jež je produkována laktobacily na vaginální sliznici. Pokud dojde k narušení přirozené mikroflóry, mohou být zástupci mikroflóry příčinou zánětu v daném místě (Holá, 2012).

Bakterie v biofilmu způsobují také řadu chronických a obtížně léčitelných onemocnění (Holá, 2012). Příkladem může být těžká pneumonie u pacientů s cystickou fibrózou. Jedná se infekci způsobenou *Burkholderia cepacia* a *Pseudomonas aeruginosa* (Parsek a Singh, 2003). Problémem u tohoto onemocnění je nadměrná tvorba viskózního hleny v dolních cestách dýchacích v důsledku kolonizace pseudomodánami produkující alginát, který usnadňuje adhezi buněk na povrch epitelu, chrání před účinky antibiotik a snižuje samočisticí schopnost plic. Výsledkem je rozvoj těžké nemoci špatně reagující na terapii a v konečném důsledku vedoucí ke smrti pacienta (Jamal *et al.*, 2018).

Biofilm se snadno tvoří na tracheálních cévách nebo umělých implantátech, jako jsou kardiostimulátory, umělé kloubní náhrady, umělé srdeční chlopně, nitroděložní tělíška apod. V průmyslu působí mnohé problémy, neboť znečišťuje povrchy, na nichž se tvoří, případně je poškozují korozí a snižuje estetickou kvalitu upravené vody. Většina bakteriální biomasy se vyskytuje na povrchu stěn různých nádrží, filtrů a rozvodných potrubí. Na druhé straně má metabolická činnost biofilmu nezastupitelnou roli v čištění odpadních vod v konvekčních a alternativních čistírnách (Rulík, 2011).

### 1.2.1 Zubní plak

Zubní plak je asi nejznámějším mikrobiálním biofilmem vyskytující se v lidském těle. Je tvořen mnoha bakteriemi, které jsou součástí normální mikrobiální flóry, jejíž adhezi usnadňuje povlak vytvořený na povrchu zubů (Rulík, 2011). Jeho tvorbu podporuje sacharóza, kterou přijímáme v potravě. Plak lze odstranit, ale vždy se vytvoří znovu (Schindler, 2001). Je tvořen směsí fosfoproteinů, glykoproteinů, lipidů, polysacharidů, albuminu, lysozymu aj. Povrch zubů je velmi snadno a rychle kolonizován a v průběhu několika dnů je doplněn dalšími bakteriemi, tzv. sekundárními a terciálními kolonizátory. Typickými

sekundárními kolonizátory jsou aktynomycety a *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus salivarius*, zástupci rodu *Prevotella*, *Veillonella* aj. (Holá, 2012).

V hlubších vrstvách biofilmu dochází k hromadění kyselých produktů metabolismu a jejich účinkem dochází k naleptání zubní skloviny, což vede k tvorbě zubního kazu. Za nejvýznamnější původce zubního kazu je považován *Streptococcus mutans* a rod *Lactobacillus*. Naproti tomu zubní kámen vzniká mineralizací zubního plaku. Biofilm vytvořený v oblasti zubního krčku způsobuje zánětlivé onemocnění periodontitidu. Příčinou je špatná ústní hygiena, což v horších případech vede až ke ztrátě zubů. Obvykle je toto onemocnění způsobeno *Pseudomonas aeruginosa* a *Fusobacterium nucleatum* (Jamal *et al.*, 2018). Zubní plak i orální biofilm mohou vyvolat infekce krevního řečiště a to například mechanickým poškozením dásní při čištění zubů (Rulík, 2011).

### 1.2.2 Biofilm na umělých površích

Používání umělých implantátů zavedených do krevního řečiště je jednou z příčin vzniku závažného onemocnění spojeného s přítomností biofilmu. Osídlení implantátů bakteriemi je značně usnadněno pokrytím jejich povrchu vrstvou tkáňových proteinů hostitele, krevních destiček a dalších složek krve či jiných tělních tekutin. Důvodem rozvoje infekcí může být materiál, ze kterého je implantát vyroben (Rulík, 2011).

Biofilmy se nejčastěji vyskytují na povrchu katétrů, cévních protéz, umělých chlopenních náhrad, kontaktních čoček a dalších (Jamal *et al.*, 2018). Nejčastějšími izolovanými mikroorganismy z katétrů jsou *Staphylococcus epidermidis* a další koagulázanegativní stafylokoky, dále pak *Staphylococcus aureus*, enterobakterie, kvasinky rodu *Candida* a další (Holá, 2012).

Velmi častými jsou i infekce vyvolané dlouhodobou katertizací močových cest. Bakterie se na povrch katétrů mohou dostat už při jejich zavádění. Močové katetry jsou nejčastěji kolonizovány *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa* (Jamal *et al.*, 2018). Poslední ze zmiňovaných patogenů je schopen tvořit biofilm na povrchu kontaktních čoček, což může vést k chronickému dráždění rohovky. Také kolonizace nitroděložních tělísek může způsobovat záněty dělohy a dalších oblastí pánve. Biofilmopozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* se podílí při infekcích kloubních náhrad v oblasti mezi samotnou kloubní náhradou a kostí.

Infekce kloubních náhrad vede k jejímu uvolnění a k nesprávné funkci umělého kloubu (Rulík, 2011).

### 1.2.3 Biofilm v kosmetice

Celý povrch kůže pokrývá biofilm. K jeho vzniku napomáhá tvorba kožního mazu, ekrinní a apokrinální sekrece, zbytky korneocytů a kosmetiky, přípravky pro péči o pokožku a léky. Velmi silným antimikrobiálním činidlem je Triclosan, který je běžnou součástí mýdel na ruce, deodorantů, past na zuby, ústních vod a čisticích prostředků, má silné účinky na grampozitivní i gramnegativní bakterie (Draeos, 2010).

Nežádoucí účinky biofilmu jsou spojovány s aplikací různých plnidel, botulotoxinu nebo s liposukcí. Tyto látky určené k omlazení pleti se injekčně aplikují přes kůži na požadované místo. Problém nastává, jestliže je zaveden i bakteriální biofilm, který později vede k okulní infekci (Draeos, 2010).

Tween 80 (polysorbát 80) je neionogenní povrchově aktivní látka, která je široce používána jako emulgátor v kosmetice, v léčivech a potravinářských výrobcích. *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* a *Pseudomonas fluorescens* jsou častými příčinami chorob spojenými se znehodnocenými potravinami. Přidáním 0,1% Tweenu 80 do růstového média má za následek nejen zvýšený růst planktonického *Staphylococcus aureus*, ale i jeho růst v biofilmu. Naproti tomu snižuje adhezi bakterií *Listeria monocytogenes* a *Pseudomonas fluorescens* a rovněž má i inhibiční účinek na jejich biofilm (Nielsen *et al.*, 2016).

Vysoce účinnými antibiofilmními činidly, které způsobují smrt bakteriálních buněk, jsou mikroemulze. V experimentu, kde byla připravena stabilní emulze o/v, která sestávala z 15% Tweenu 80, 6% pentanolu a 3% ethyl oleátu, byl prokázán pozitivní účinek na biofilm bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (Al-Adham *et al.*, 2003).

### 1.2.4 Biofilm v potravinářství

Výskyt biofilmu v potravinářství je zcela běžný. Jeho přítomnost v potravinářském průmyslu může způsobit poškození vybavení, kontaminaci produktů, energetické ztráty a nebezpečí infekcí. Na druhou stranu je možné zužitkovat proces tvorby biofilmu u technologicky významných kmenů ve výrobním procesu či se s ním setkat jako součást potravinářských výrobků. Prospěšné postavení má biofilm v octářství, vinařství nebo pivovarnictví. Dále pak při výrobě plísňových sýrů (Rulík, 2011).

Mikrobiálními původci nemocí přenosných potravinami a tvořící biofilm je *Campylobacter jejuni*. Syrové maso, neošetřená voda, neošetřené mléko a domácí zvířata jsou hlavními zdroji infekce. *Listeria monocytogenes* nejčastěji přežívá v savčích hostitelích, v půdě a v krmivu upraveném silážováním. Hlavní příčinou infekce je konzumace kontaminovaných potravin, zejména mlékárenských produktů, syrového masa a syrové zeleniny. Onemocnění vyvolané tímto patogenem je označováno jako listerióza. Kontaminované mléčné výrobky, syrové maso a vejce mohou být spojovány i s kontaminací salmonely (Rulík, 2011).

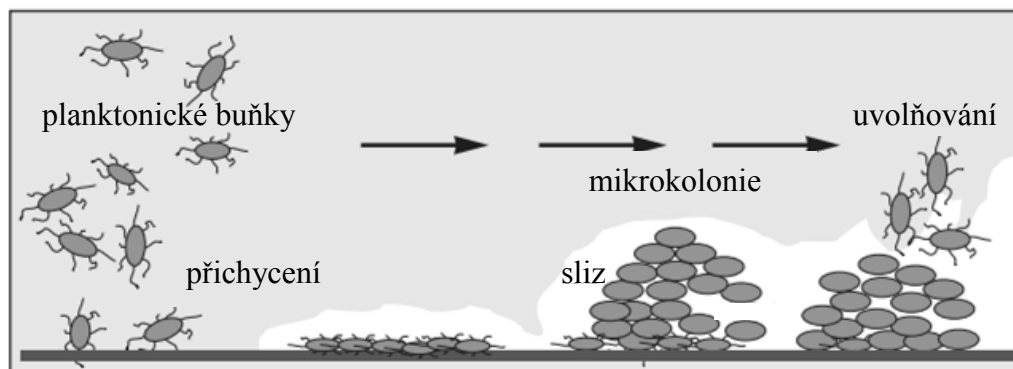
### 1.3 Tvorba a zánik biofilmu

Bylo navrženo několik možných mechanismů, kterými se mikrobiální buňky připevňují na pevný povrch a vytváří biofilm. Cyklus tvorby biofilmu lze popsat třemi kroky (Obr. 1): připojení (adheze) buněk k pevnému povrchu, zrání (maturace) a tvorba biofilmu, fáze odlučování buněk (Ray a Bhunia, 2014).

Po prvním přichycení na vhodný povrch začínají buňky produkovat primární biofilm, na který se mohou přichytávat další buňky tzv. sekundárního biofilmu (Rulík a Holá, 2012). V první fázi je planktonická buňka přidržována k povrchu slabými silami Van der Waalsového typu. Tato fáze je vratná (reverzibilní). Ve druhé fázi bakterie tvoří EPS, čímž vytváří extracelulární matici, ve které jsou fixovány. V této fázi buňky rostou v těsné blízkosti, což jim umožňuje intenzivnější výměnu genetické informace, komunikují mezi sebou, rostou, vytváří síť mikrokánálek a tvoří se veškerá odolnost biofilmu proti vysušení, antibiotikům a toxickým látkám. Tato fáze je nevratná (ireverzibilní). Jakmile se vytvoří zralý biofilm, některé buňky se z kolonií odloučí, přecházejí do planktonického stavu a opět se připojují k novému povrchu. Oddělení mikrobiálních buněk a přemístění na nové místo pomáhá při šíření infekcí (Ray a Bhunia, 2014). Příčinou tohoto chování je pravděpodobně zvyšující se konkurence a neúnosnost další existence ve společenství anebo nedostatek živin. Produkované chemické signály upozorňují buňky na jejich přítomnost a zabraňují dalšímu přemnožení populace. Tento způsob komunikace uvnitř biofilmu se označuje pojmem vnímání množství tzv. quorum sensing (Lewis, 2001).

Tvorba biofilmu a schopnost buněk adherovat silně závisí na povaze povrchu. Přichycení k podkladu je také usnadněno přítomností fimbrií na povrchu buněk (Lewis, 2001). Dostupnost živin, osmolarita, pH, množství kyslíku nebo teplota jsou faktory, které jsou důvodem přechodu z planktonického života k růstu na povrchu (Schulte *et al.*, 2005).





Obr. 1. Vznik a struktura biofilmu (upraveno dle Schindler, 2001)

#### 1.4 Prevence vzniku a způsoby odstranění biofilmu

K odstranění biofilmu v potravinářském a kosmetickém průmyslu se využívá fyziologických, chemických a biologických postupů. Mikrobiální tvorba biofilmu na povrchu zařízení na površích potravin je vůči odstraňování a usmrcování buněk velmi odolná (Ray a Bhunia, 2014). Existuje mnoho faktorů, které jsou odpovědné za rezistenci biofilmu k antimikrobiálním látkám. Jeden z důvodů může být difúzní bariéra (Lewis, 2001). Biofilm by měl být odstraněn v rané fázi. Planktonické buňky v počáteční fázi tvorby biofilmu jsou mnohem citlivější k dezinfekci než přilehlé buňky v biofilmech (Ray a Bhunia, 2014). Bylo prokázáno, že bakterie v biofilmech mohou tolerovat 100 až 1000krát vyšší koncentrace antibiotik a dezinfekčních přípravků než planktonické buňky (Macia, *et al.* 2014). Zajímavý příklad difúzní bariéry byl popsán u *Pseudomonas aeruginosa*, jehož planktonické buňky byly velmi citlivé na peroxid vodíku o koncentraci  $1700 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , ale buňky v biofilmu byly účinně chráněny (Lewis, 2001). Způsobem odstranění může být použití detergentu založeného na enzymech, který rozkládá glykokalyx. Dále některá oxidační činidla, chlór, peroxid vodíku nebo bakteriociny jsou účinné proti širokému spektru mikroorganismů. Velký potenciál k odstranění biofilmu mají i bakteriofágy. Bakteriofág se nevrátne váže na bakteriálního hostitele, infikuje jej, čímž dochází k lýze bakteriální buňky. Aby se zabránilo tvorbě biofilmu na potravinách, je třeba je uchovávat při nízkých skladovacích teplotách a používat vhodné konzervační přísady (Ray a Bhunia, 2014). V průmyslových systémech se používají chemické látky tzv. biocidy, které inaktivují patogenní i nepatogenní živé organismy. Biocidy mohou reagovat s makromolekulami, jako jsou proteiny, enzymy, nukleové kyseliny a polysacharidy. Výsledkem je narušení membrán s únikem intracelulárních složek a destrukce mnoha buněčných funkcí, včetně replikace, transkripce, syntézy proteinů a obecného metabolismu (Schulte *et al.*, 2005).

## 1.5 Metody průkazu biofilmu

Široce používanou metodou je Christensenova zkumavková metoda. Jedná se o standardní test pro detekci tvorbu biofilmu, jehož provedení spočívá v obarvení skleněné zkumavky krystalovou violetí, ve které byl v bujónu kultivován mikrob tvořící biofilm. Tvorba biofilmu je považována za pozitivní, jestliže se vytvoří viditelná vrstva na vnitřní stěně zkumavky. Tato metoda je pouze orientační. Objektivní výsledky poskytuje spektrofotometrické vyhodnocení na mikrotitračních destičkách. Provedení průkazu biofilmu na mikrotitračních destičkách je obdobné jako u předchozí zkumavkové metody s tím rozdílem, že vázané barvivo se extrahuje ethanolem a intenzita zbarvení výluhu v jednotlivých jamkách se měří spektrofotometricky (Lewis, 2001). Další metodou pro ověření tvorby biofilmu je kultivace bakterií na agaru s kongo červení. Po kultivaci se hodnotí vzhled kolonií, kdy za pozitivní výsledek se považují černé kolonie se suchým a drsným povrchem (Mathur *et al.*, 2006).

Biofilm lze detekovat a zkoumat pomocí instrumentálních metod. Světelná mikroskopie je nejpoužívanější mikroskopickou metodou, která umožňuje pozorovat biofilm přichycený k průhlednému podkladu. Strukturu biofilmu lze zvýraznit obarvením krystalovou violetí nebo karbolfuchsinem. Pro hladké a neprůhledné povrchy, jako je kov, plast nebo keramika, lze využít fluorescenční mikroskopii na základě fluorescenčně barvených vzorků. Skenovací elektronová mikroskopie slouží k pozorování morfologie bakterií ulpívajících na povrchu materiálu, morfologii povrchu materiálu a vztahů mezi nimi (An a Friedman, 1997). K poznání struktury biofilmu nestačí jen běžné metody optické nebo elektronové mikroskopie. K tomuto nejlépe slouží tzv. konfokální laserový mikroskop, kdy s použitím rastrovací techniky lze prohlížet plochy ve zvolené hloubce objektu, a tím prostudovat celou prostorovou strukturu biofilmu (Schindler, 2001).

## 2 MASTNÉ KYSELINY

Z chemického hlediska to jsou alifatické monokarboxylové kyseliny, které lze získat hydrolyzou přírodních lipidů. Mastné kyseliny se od sebe odlišují délkou uhlovodíkového řetězce, stupněm nenasycenosti a isomerií dvojných vazeb *cis* a *trans*. Mastné kyseliny, které obsahují více než 10 uhlíkových atomů se označují jako vyšší. Podle přítomnosti a počtu dvojných vazeb se MK dělí na nasycené (neobsahují dvojnou vazbu v řetězci) a nenasycené (obsahují dvojnou nebo trojnou vazbu) (Kodíček *et al.*, 2015).

Nicol *et al.*, (2018) zkoumali inhibiční účinek kyseliny palmitolejové a myristové na tvorbu biofilmu. Ukázalo se, že tyto kyseliny o koncentraci  $0,02 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  jsou schopny snížit tvorbu biofilmu *Acinetobacter baumannii* až o 38 %. Bylo také zjištěno, že tyto mastné kyseliny mohou mít vliv na komunikační systém bakterií tzv. quorum sensing. Je prokázáno, že kyselina mravenčí, kapronová a laurová vykazují největší antibakteriální aktivitu, ale vůči *Candida albicans* jsou mastné kyseliny s krátkým a středně dlouhým řetězcem méně účinné (Huang *et al.*, 2011). Vůči této kvasince jsou účinné polynenasycené mastné kyseliny. Bylo zjištěno, že kyselina eikosapentaenová (EPA), dokosapentaenová a dokosa-hexaenová (DHA) o koncentraci  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  mají inhibiční účinek na mitochondriální metabolismus a vliv na produkci biomasy *Candida albicans* (Thibane *et al.*, 2010). Kyselina EPA a DHA jsou nezbytnou součástí obranného systému lidského těla a hrají klíčovou roli při imunitních reakcích. Tělo si je nedokáže vytvořit samo, proto se označují jako esenciální a musí se přijímat v potravě. Tyto kyseliny se přirozeně vyskytují v rybím oleji. Bylo prokázáno, že tyto kyseliny přítomné ve sled'ovém oleji, snižují tvorbu biofilmu *Staphylococcus aureus*. Tento patogen je původcem řady infekcí krevního řečiště. Přidáním těchto MK do živného média obsahující krev, vede ke snížení hemolytického účinku červených krvinek a k inhibici růstu tohoto patogenu (Kim *et al.*, 2018).

### 2.1.1 Kyselina kaprylová

Kyselina kaprylová je mastná kyselina s 8 atomy uhlíku, která se přirozeně vyskytuje v mléčných tucích v množství 1 až 4 %, v palmovém a kokosovém oleji ze 2 až 8 %. Je to bezbarvá kapalina nepříjemného zápachu (Ullrich, 1963).

Vyazuje inhibiční účinky běžných patogenů hovězí mastitidy, jako jsou *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* a *Staphylococcus aureus*. Bylo prokázáno, že kyselina kaprylová, která byla přidána do mléka, vyka-

zovala při koncentraci  $14\ 000\ \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  značnou inhibici a snížení počtu životaschopných buněk, přičemž nejcitlivější z těchto pěti patogenů byla *Escherichia coli* (Nair *et al.*, 2005). Skřivanová *et al.* (2006) prokázala, že kyselina kaprylová koncentrací  $3000\ \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  viditelně inhibuje růst *Salmonella* sp.

### 2.1.2 Kyselina kaprinová

Tato nasycená mastná kyselina s 10 atomy uhlíku se nachází společně s kyselinou kaprylovou a kapronovou v kozím mléce (Hoza a Sumczynski, 2005). Také se vyskytuje ve stejných olejích a přibližně ve stejném množství jako kyselina kaprylová. Ve vodě je téměř nerozpustná, její alkalické soli mají mýdlový charakter (Ullrich, 1963).

Kyselina kaprinová o koncentraci  $1700\ \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  dokáže účinně inhibovat *Campylobacter jejuni*, jež je potravinářským patogenem (Thormar *et al.*, 2006). Bergsson *et al.* (2002) zjistili se, že kyselina kaprinová o koncentraci  $1700\ \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  inhibuje růst *Helicobacter pylori*, který je rizikovým kolonizátorem žaludku a původcem rakoviny (Bergsson, Steingrímsson a Thormar, 2002). Mbandi *et al.* (2004) prokázali, že kyselina kaprinová o koncentraci  $150\ \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  dokáže inhibovat růst *Listeria monocytogenes*, jež je patogenem kontaminující masné výrobky (Mbandi, Brywig a Shelef, 2004). Kyselina kaprinová má též antifungicidní účinek (Murzyn *et al.*, 2010).

### 2.1.3 Kyselina laurová

Kyselina laurová je nasycená mastná kyselina se 12 atomy uhlíku, vyskytující se v tucích semen mnohých tropických rostlin, kde je obsažena v množství až 50 %. Při normální teplotě je to tuhá krystalická látka, specifické vůně připomínající kokosový tuk. Ve vodě je nerozpustná a její alkalické soli mají už výslovně mýdlový charakter. (Ullrich, 1963) Používá se k výrobě kapalných čisticích prostředků a tělových mýdel. Připravuje se neutralizací hydroxidem draselným (Iwata a Shimada, c2013).

Ze všech mastných kyselin, které mají délku řetězce od 6 do 18 uhlíků, bylo zjištěno, že kyselina laurová vykazuje největší antibakteriální účinek proti grampozitivním bakteriím. Nejvíce náchylné jsou streptokoky a pneumokoky, zatímco bakterie *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis* jsou náchylné nejméně (Thormar, 2011). Petschow *et al.* (1996) zjistili, že kyselina laurová byla jediná mastná kyselina se středním řetězcem, která vykazovala baktericidní účinnost proti *Helicobacter pylori* (Petschow, Batema a Ford, 1996).

#### 2.1.4 Kyselina palmitová

Tato mastná kyselina se 16 atomy uhlíku je nejrozšířenější nasycená mastná kyselina, která se v množství 5 až 6 % vyskytuje ve všech tučných rostlinného i živočišného původu. Tuky s velkým obsahem této kyseliny jsou velmi vhodné pro výrobu mýdel. Kyselina palmitová je bílá krystalická látka bez zápachu (Ullrich, 1963).

Altieri *et al.* (2009) zkoumali účinky kyseliny palmitové a jejího monoacylglyceridu proti gramnegativním bakteriím *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* a *Salmonella* přičemž zjistili, že 20 mg·l<sup>-1</sup> kyseliny palmitové vykazovalo po 24hodinové inkubaci 60–80% aktivitu.

#### 2.1.5 Kyselina stearová

Nejběžněji se vyskytující 18-uhlíkatá nasycená kyselina, která je z 20 % zastoupena v bambuckém a kakaovém másle. Směsi kyseliny stearové a kyseliny palmitové jsou nejrozšířenějšími mastnými kyselinami používaných v kosmetice, zejména v krémech (Iwata a Shimada, c2013). Je nevhodná pro přípravu mýdel z důvodu špatné rozpustnosti jejích alkalických solí ve vodě vedoucí k nepěnovosti mýdla. Kyselina stearová je bílá krystalická vosku podobná látka bez vůně, která je nerozpustná ve vodě. Připravuje se zpravidla hydrogenací kyseliny olejové (Ullrich, 1963). Ve většině studií, které zkoumali antibakteriální účinek této kyseliny, bylo zjištěno, že vykazuje inhibiční účinek až při vyšších koncentracích.

#### 2.1.6 Kyselina undecenová

Kyselina undecenová (mykoseptin) je nenasycená mastná kyselina, která se používá lokálně při léčení mnohých dermatomykóz. Připravuje se tepelným rozkladem kyseliny ricinolejové (Hampl a Paleček, 2002). Kyselina undecenová může mít jistý vliv na plísňovou infekci, ale přesný mechanismus její inhibice je nejasný. Bylo prokázáno, že inhibuje tvorbu biofilmu a hyf *Candida albicans* s optimální koncentrací vyšší než 3 mmol·l<sup>-1</sup>, kdy buňky pod elektronovým mikroskopem vykazují atrofický vzhled. Naopak koncentrace nižší jak 3 mmol·l<sup>-1</sup> nemají na biofilm žádný vliv (Shi *et al.*, 2016).

## 2.2 Fyzikální vlastnosti mastných kyselin

Mastné kyseliny, jak volné, tak vázané mají funkci tepelné izolace, metabolického paliva a jsou základními složkami všech membrán. Hlavními zdroji mastných kyselin jsou rostlinné oleje, mléčné výrobky, masné výrobky, obilí, ryby nebo rybí oleje (Desbois a Smith, 2010).

Karboxylová skupina mastných kyselin je hydrofilní a uhlovodíkový řetězec hydrofóbní, čímž má molekula amfipatický charakter. Kvůli svým amfipatickým vlastnostem mohou mít soli mastných kyselin funkci detergentů a mýdel (Desbois a Smith, 2010). Mastné kyseliny tvoří podle způsobu krystalizace krystaly s různými modifikacemi, jsou tedy polymorfni. Jednotlivé modifikace se označují jako  $\alpha$ ,  $\beta$ , a  $\gamma$ . Mastné kyseliny s méně než 10 uhlíkovými atomy jsou za běžné teploty kapalné, ty s větším počtem uhlíků jsou tuhé. Snadno se rozpouštějí v organických rozpouštědlech jako je ether, benzín nebo benzen (Ullrich, 1963). Ve vodě se rozpouštějí pouze nižší mastné kyseliny, vyšší mastné kyseliny mají tendenci se sdružovat, což vede k tvorbě monovrstev nebo micel. Nasycené mastné kyseliny jsou velmi stabilní, zatímco nenasycené kyseliny jsou náchylné k oxidaci. Čím více dvojných vazeb mastná kyselina obsahuje, tím je více náchylná k oxidaci. Mastné kyseliny nacházející se v konfiguraci *trans* jsou mnohem odolnější vůči oxidaci než příslušné kyseliny s *cis* konfigurací. Antioxidanty jsou velmi důležité látky v prevenci proti oxidaci a tvorbě radikálů (Rustan a Drevon, 2001). Počet nenasycených vazeb a délka uhlovodíkového řetězce ovlivňuje bod tání. Čím je řetězec kratší a čím je větší počet dvojných vazeb, tím je bod tání nižší (Škárka a Ferenčík, 1987). Přítomnost konfigurace *cis* v molekule také výrazně snižuje teplotu tání (Scrimgeour, 2005).

## 2.3 Antibakteriální účinky mastných kyselin

Mastné kyseliny mohou bakterie zabít (baktericidní účinek) nebo inhibovat jejich růst (bakteriostatický účinek), což je reverzibilní stav a znamená to, že bakterie zůstává životaschopná, ale nemůže projít buněčným dělením. Přesný mechanismus působení mastných kyselin je nejasný. Hlavním cílem je pravděpodobně buněčná membrána, kde narušují proces elektronového transportu a oxidační fosforylace. Antibakteriální účinek by také mohl spočívat v inhibici enzymové aktivity a tvorbě toxických produktů (Desbois a Smith, 2010). Bylo zjištěno, že působením tepla a snížením hodnoty pH se narušuje permeabilita vnější membrány bakterií, což umožňuje proniknutí mastné kyseliny do buňky (Thormar, 2011). Kromě přímých antimikrobiálních účinků na růst bakterií mohou být mastné kyseli-

ny schopny bránit mikrobům kolonizovat k povrchu. Biofilmy umožňují mikrobiálním buňkám ulpět na biologických nebo neživých površích a je známo, že tyto struktury hrají zásadní roli v mnoha onemocněních a infekcích. Volné mastné kyseliny mohou zabránit adhezi a vzniku biofilmu nebo narušit komunikaci mezi buňkami (P. Desbois, 2012). Schopnost některých bakterií měnit hydrofobicitu na povrchu buněk může snižovat účinek mastných kyselin. Stejně tak přítomnost karotenoidů umístěných v membráně zvyšuje odolnost některých bakteriálních kmenů (Desbois a Smith, 2010).

Antibakteriální aktivita mastných kyselin závisí na délce uhlovodíkového řetězce a na přítomnosti, počtu a poloze dvojných vazeb. Tuto aktivitu zajišťuje karboxylová skupina, protože koncová methylová skupina vykazuje nízkou nebo vůbec žádnou aktivitu. Nenasycené mastné kyseliny se středně dlouhým až dlouhým řetězcem mají tendenci být aktivnější proti grampozitivním bakteriím než proti gramnegativním. Také mastné kyseliny, které se přirozeně vyskytují v konfiguraci *cis*, mají větší antibakteriální aktivitu než kyseliny v konfiguraci *trans*. Z nasycených mastných kyselin vykazují antibakteriální aktivitu kyseliny s 10 nebo 12 uhlíky, přičemž s klesající nebo s rostoucí délkou řetězce aktivita klesá. Existují však studie, které tvrdí, že kyseliny se 16 nebo 18 atomy uhlíku mohou být proti některým druhům bakterií účinnější (Desbois a Smith, 2010).

### 3 BAKTERIE

Bakterie jsou jednobuněčné, mikroskopické a všudypřítomné organismy s jednoduchou vnitřní strukturou. Jejich DNA je uložena buď volně v cytoplazmě v podobě plazmidů anebo je zkroutěná do nukleoidu. Na povrchu buňky je buněčná stěna, která ovlivňuje jejich barvitelnost, podle čehož se bakterie dělí na grampozitivní a gramnegativní. Jsou původci mnoha onemocnění, avšak mohou mít pro člověka i prospěšnou roli při kysání jogurtu nebo při trávení. (Ross, 2019)

#### 3.1 Gramnegativní bakterie

Při Gramově barvení se krystalová violet dostává do buněk a s Lugolovým roztokem vytváří modře zbarvený komplex. V následujícím kroku je rozpuštěna buněčná stěna, komplex je vyplaven alkoholem a bakteriální buňky jsou dobarveny safraninem, který jim dodá červenou barvu (Rogers a J. Kadner, 2018).

##### 3.1.1 *Stenotrophomonas maltophilia*

*Stenotrophomonas maltophilia* je gramnegativní, striktně aerobní pohyblivá tyčinka, která úzce souvisí s rody *Pseudomonas*. Dobře roste na běžně používaných laboratorních médiích, včetně medií obsahující krev a na agaru McConkey. Bývá často izolována z půdy, vody, zvířat, rostlinné hmoty a vybavení nemocnic. Má přirozenou schopnost adherovat k cizím materiálům a vytvářet biofilm, čímž je zajištěna ochrana proti hostitelské imunitní obraně. Je nejčastěji spojována s respiračními infekcemi u lidí. *Stenotrophomonas maltophilia* byla nejprve izolována v roce 1943 jako *Bacterium bookeri*. Infekce spojené s tímto patogenem postihují nejčastěji dýchací systém (pneumonie). Způsobuje bakterémii, biliární sepsi, infekce kostí a kloubů, močových cest a měkkých tkání, endoftalmitidu, oční infekce, endokarditidu a meningitidu. *Stenotrophomonas maltophilia* je také významným patogenem u pacientů s rakovinou, zvláště u pacientů s obstrukčním karcinomem plic. Infekce *Stenotrophomonas maltophilia* mohou nastat jak u dětí, tak u dospělých. Léčba infekcí je velmi obtížná, protože tento patogen vykazuje rezistenci vůči široké řadě antibiotik včetně  $\beta$ -laktamových antibiotik, cefalosporinů, fluorochinolonů, aminoglykosidů, chloramfenikolu, tetracyklinů a polymyxinů. Důvodem rezistence je nízká membránová propustnost, tvorba biofilmu a přítomnost enzymů modifikujících antibiotika (Brooke, 2012).



## 3.2 Grampozitivní bakterie

Při Gramově barvení nedochází k rozpuštění buněčné stěny rozpouštědlem. Modrý komplex, který se vytváří reakcí krystalové violeti s Lugolovým roztokem tedy nelze vyplavit alkoholem. Po dobarvení safraninem mají bakteriální buňky modrofialovou barvu (Rogers a J. Kadner, 2018).

### 3.2.1 *Bacillus tequilensis*

*Bacillus tequilensis* je grampozitivní, aerobní tyčinkovitá bakterie. Její unikátnost spočívá v produkci amylázy, která má široké využití v potravinářských a kosmetických aplikacích. Tento enzym se používá například ke štěpení škrobu nebo při výrobě detergentů za účelem zvýšení jejich čistící schopnosti. Roste v širokém rozmezí pH a při teplotách 15–85 °C. Tolerance vůči teplotě, pH, organickým rozpouštědlům, iontům kovů a povrchově aktivním látkám usnadňuje jeho použití pro různé procesy za stresových podmínek (Tiwari *et al.*, 2014).

*Bacillus tequilensis* má schopnost přilnout ke střevním epitelovým buňkám a eliminovat adhezi střevních patogenů. Je tedy probiotickou bakterií, která udržuje střevní mikrobiální rovnováhu. Inhibice invaze patogenů, jako je například *Listeria monocytogenes*, byla prokázána použitím buněk karcinomu tlustého střeva. Zvýšená aktivita proti *Listeria monocytogenes* je způsobena produkcí antilisteriálního proteinu Subtilosinu A. Také produkce EPS, zvyšuje probiotickou kolonizaci. Tvorba biofilmu tedy kompetitivně vylučuje adhezi patogenů na střevních buňkách (Parveen Rani *et al.*, 2016).

*Magnaporthe oryzae* je aktinomyceta napadající rýži. Ztráty způsobené touto fytopatogenní houbou způsobují velké snížení výnosu rýže. Li *et al.* (2018) experimentem zjistili, že *Bacillus tequilensis* produkuje enzymy, které inhibují růst *Magnaporthe oryzae*. Silná antifungální aktivita a netoxičita vůči rýži vykazují potenciál tohoto druhu při ochraně rýže proti rostlinným patogenům.

### 3.2.2 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* je aerobní, grampozitivní tyčinka schopná růstu v různých prostředích. Roste v půdě, ale může růst i v těsném spojení s povrchy kořenů rostlin. Vzhledem k tomu, že mnoho zvířat konzumuje rostliny, není divu, že tato bakterie se nachází i v gastrointestinálním traktu býložravců. Lze jej také nalézt v několika komerčně dostupných fermentovaných potravinářských výrobcích. *Bacillus subtilis* není považován za pa-

togenní bakterii. Je schopen tvořit vysoce rezistentní endospory (Earl, Losick a Kolter, 2008). Endospora je metabolicky spící buňka odolná vůči extrémním teplotám, vysychání a ionizujícímu záření. Proces, kterým buňky obnovují svůj růst, se nazývá germinace neboli klíčení (Higgins a Dworkin, 2012). *Bacillus subtilis* je modelový mikroorganismus pro studium replikace bakteriálního chromozomu, buněčné diference a tvorby biofilmu (Earl, Losick a Kolter, 2008).

### 3.2.3 *Bacillus pumilus*

*Bacillus pumilus* je aerobní, grampozitivní tyčinkovitá bakterie, kterou lze izolovat z půd a rostlin. Stejně jako ostatní rody *Bacillus*, tvoří *Bacillus pumilus* spory, které jsou odolné vůči hladovění, vysychání, UV a gama záření a chemickým dezinfekcím (Gioia *et al.*, 2007). Některé kmeny *Bacillus pumilus* mohou způsobovat hniloby zázvoru. Napadá oddenky, roste v mimobuněčném prostoru a produkuje enzymy, které ničí rostlinnou buněčnou stěnu. Je také široce používán v průmyslových procesech při výrobě fermentovaných výrobků. Pozitivní roli má i při čištění odpadních vod a degradaci látek znečišťujících životní prostředí. Některé kmeny mají dokonce pozitivní vliv na rostliny, ve smyslu podpory jejich růstu, příjmu živin, fixaci dusíku, interakcí se symbiotickými mikroorganismy a produkcí antimikrobiálních látek proti patogenním bakteriím a plísním. Několik kmenů se také využívá jako probiotikum (Yuan a Gao, 2015).

### 3.2.4 *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* je aerobní, grampozitivní, sporující tyčinka, která obvykle způsobuje otravu jídlem. V případě nakažené, špatně tepelně opracované potraviny může dojít ke klíčení spor. Ponechání těchto potravin při pokojové teplotě vede k růstu vegetativních forem a produkci emetického toxinu a enterotoxinu. Otrava se projevuje průjmem a zvracením a odezní do 24 hodin, tudíž není nutná lékařská pomoc. Nejčastěji se vyskytuje v rýži, ale je také často izolován z masa, vajec a mléčných výrobků (Granum a Lund, 1997). Kromě otrav jídlem způsobuje *Bacillus cereus* řadu systémových a lokálních infekcí u imunologicky ohrožených jedinců. Nejčastěji infikovanými jsou novorozenci, uživatelé drog, pacienti s chirurgickými ranami a se zavedenými katétry. Mezi infekce způsobené *Bacillus cereus* patří fulminantní bakteriémie, meningitida, mozkový absces, endoftalmitida, zápal plic a kožní infekce podobné gangréně (Bottone, 2010).

## 4 ANALÝZA DNA A IDENTIFIKACE BAKTERIÍ

### 4.1 PCR – Polymerázová řetězová reakce

Jedná se v současné době o jednu z nejúčinnějších a nejvíce rozvíjejících metod molekulární biologie. PCR byla objevena v roce 1983 Kary B. Mullisem, americkým biochemikem, který v roce 1993 získal Nobelovu cenu za chemii (Garibyan a Avashia, 2013).

V průběhu této reakce dochází k namnožení (amplifikace) určitého úseku DNA *in vitro*. Každý test PCR vyžaduje přítomnost templátové DNA, primerů, nukleotidů a DNA polymerázy. DNA polymeráza je klíčovým enzymem, který spojuje jednotlivé nukleotidy dohromady (Garibyan a Avashia, 2013). K syntéze nového vlákna DNA se využívá DNA-polymeráza termofilních bakterií. Nukleotidy zahrnují čtyři báze – adenin, thymin, cytosin a guanin. Ty fungují jako stavební bloky, které DNA polymeráza používá k vytvoření výsledného produktu PCR. Primery v reakci vymezují přesný úsek DNA, který má být amplifikován (Porta a Enners, 2012).

PCR je třístupňový proces, který probíhá v zařízení zvaném thermocykler v opakovaných cyklech. Prvním krokem je denaturace molekuly DNA, což je dosaženo zahřátím výchozího materiálu na teplotu přibližně 93–95 °C. Důsledkem denaturace je zánik vodíkových vazeb mezi nukleotidovými páry bází a separace molekuly DNA na dva řetězce. Získaná jednořetězcová vlákna slouží jako templát. Ve druhém kroku se sníží teplota 45–65 °C a dochází k nasedání primerů. Ve třetím kroku se teplota zvýší na 72 °C, DNA polymeráza nasedne na primery a připojuje volné nukleotidy k vláknu DNA na základě komplementarity dusíkatých bází (Porta a Enners, 2012). S každým opakováním těchto tří kroků se počet kopií molekul DNA zdvojnásobí (Garibyan a Avashia, 2013).

### 4.2 MALDI TOF – Hmotnostní spektrometrie

System MALDI slouží k identifikaci mikroorganismů, jako jsou grampozitivní a gramnegativní bakterie, kvasinky a mnohobuněčné houby izolované z biologického materiálu, potravin, zvířat i vnějšího prostředí (Croxatto *et al.*, 2012).

Jedná se o techniku, kdy při analýze jsou detekovány ionty, které vznikají ionizací vzorku působením matrice, která zajišťuje kontakt analyzované molekuly s laserem, tak aby nedošlo k nežádoucímu rozpadu molekuly analytu. V analýze MALDI se vzorky připraví smícháním s matricí, což vede k jeho krystalizaci. Základním požadavkem matrice je absorpce

vlnové délky paprsku laseru. Mezi nejčastěji používané matrice patří kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, kyselina, kyselina sinapová, kyselina ferulová a kyselina 2,4-hydroxyfenylbenzoová. Směs vzorku a matrice jsou nanášeny na povrch kovové destičky. Směs se poté zavádí do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF a ta je následně vystavena nanosekundovým pulsem laseru. Matrice absorbuje energii z laseru a její rozklad ionizuje molekuly vzorku. Ionizované molekuly vzorku jsou urychlovány silným elektrostatickým polem a vstupují do vakua v trubici detektoru, kde se pohybují rychlostí úměrnou jejich hmotnosti a náboji. Detektor měří dobu letu iontů, která se výpočetně konvertuje jako poměr molekulové hmotnosti a náboje. Tato metoda umožňuje identifikaci analytů na základě jejich hmotnostních spekter. Hmotnostní spektra získaná během analýzy jsou specifická pro velký počet mikroorganismů a slouží jako identifikátor – fingerprint. Vzorek je pak identifikován porovnáním jeho hmotnostního spektra s referenční databází kontrolních kmenů (Croxatto *et al.*, 2012).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 ZAŘÍZENÍ, POMŮCKY A CHEMIKÁLIE

### 5.1 Použité zařízení a pomůcky

Biohazard box EUROFLOW (Schoeller Instruments, ČR)

Autokláv Systec 2540 EL (Systec, Linden, Německo)

Biologický termostat Memmert INE 600 (Memmert, Schwabach, Německo)

Tecan infinite 200Pro (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)

Thermocykler Aeris Thermal Cycler (ESCO, Singapur, Singapur)

Optický mikroskop Olympus (Olympus Corporation, Německo)

Vortex IKA MS 3 basic

Laboratorní předvážky KERN

Kahan

Bakteriologické kličky

Automatické mikropipety

Mikrotitrační destičky

Laboratorní sklo (Petriho misky, kádinky, zkumavky, odměrné válce, zásobní láhve)

### 5.2 Použité chemikálie

Ethanol denaturovaný, 96% (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)

Krystalová violet (Penta, Praha, ČR)

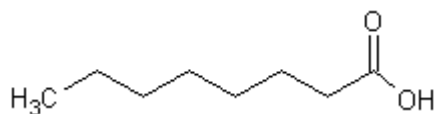
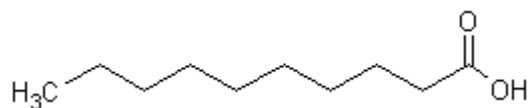
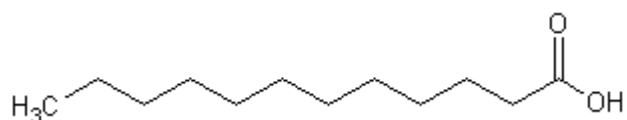
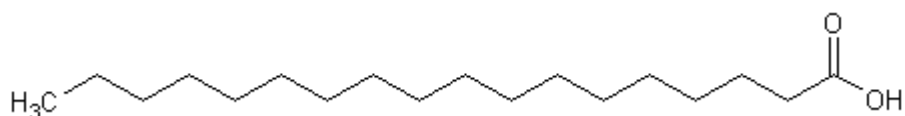
Lugolův roztok (Sigma-Aldrich, USA)

Aceton (Sigma-Aldrich, USA)

Safranin (Sigma-Aldrich, USA)

PCR Taq Master Mix, Primer RD1, Primer FD1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Mastné kyseliny (Fakulta technologická, UTB ve Zlíně, ČR)

MK C<sub>8:0</sub> – kyselina kaprylováMK C<sub>10:0</sub> – kyselina kaprinováMK C<sub>12:0</sub> – kyselina laurováMK C<sub>16:0</sub> – kyselina palmitováMK C<sub>18:0</sub> – kyselina stearováMK C<sub>11:1</sub> – kyselina undecenová

## 6 METODIKA PRÁCE

### 6.1 Postup izolace DNA

Mikrobiologický izolát byl kultivován ve zkumavce a po 24 hodinách bylo odebráno 1,8 ml kultury a centrifugováno při 10 000 RPM po dobu 30 sekund při pokojové teplotě. Poté byl odstraněn supernatant a vzorky byly opět podrobeny centrifugaci. Po odstranění supernatantu byla na vortexu při nižších otáčkách rozsuspendována buněčná peleta ve 300 µl dezintegračního pufru. Roztok dezintegračního pufru obsahuje soli a pufry, čímž se stabilizovaly a rovnoměrně rozptýlily mikrobiální buňky. Ke vzniklé suspenzi, která byla převedena do rozbíjecí mikrozkuhavky, bylo přidáno 50 µl roztoku MD1. Roztok MD1 obsahuje SDS a další činidla pro rozrušení buněk. Mikrozkuhavky byly řádně uzavřeny a vloženy v horizontální poloze do adaptéru vortexu a vortexovány při maximální rychlosti 10 minut. Poté byly mikrozkuhavky centrifugovány při 10 000 RPM po dobu 30 sekund. Rozpadlý buněčný materiál byl nahromaděn na dně zkumavky, zatímco DNA zůstalo v supernatantu. K supernatantu, který byl převeden do čisté 2 ml mikrozkuhavky, bylo přidáno 100 µl roztoku MD2. Roztok MD2 obsahuje reagent ke sražení organických a anorganických sloučenin, které by mohly snížit čistotu DNA. Poté byly mikrozkuhavky vortexovány 5 sekund, inkubovány při teplotě 4 °C po dobu 5 minut a po inkubaci opět centrifugovány 1 minutu při 10 000 RPM. Veškerý supernatant byl převeden do čisté 2 ml mikrozkuhavky, bylo přidáno 900 µl roztoku MD3 a vortexováno po dobu 5 sekund. Roztok MD3 obsahuje vysoce koncentrovaný solný roztok, který zajišťuje podmínky nutné pro připojení DNA na filtr v kolonce. Asi 700 µl získaného roztoku bylo přeneseno do kolonky a centrifugováno při 10 000 RPM po dobu 30 sekund. Profiltrovaný roztok byl odstraněn a do mikrozkuhavky byl přidán zbytek roztoku získaného v předešlém kroku. Mikrozkuhavky byly opět podrobeny centrifugaci při 10 000 RPM po dobu 30 sekund, přičemž byl opět odstraněn profiltrovaný roztok. Tento krok byl opakován 3krát. Do kolonky bylo přidáno 300 µl roztoku MD4 a centrifugováno při 10 000 RPM po dobu 30 sekund. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a mikrozkuhavky byly opět centrifugovány. Roztok MD4 je promývací roztok na bázi ethanolu, který vyčistí DNA, jež je připevněna k silika filtru uvnitř kolonky. Poté byla kolonka převedena do čisté 2 ml mikrozkuhavky, bylo přidáno 50 µl roztoku MD5 do středu bílé membrány uprostřed kolonky a centrifugováno při 10 000 RPM po dobu 30 sekund. Roztok MD5 je eluční pufry. Kolonka byla odstraněna a DNA v mikrozkuhavce byla připravena pro PCR reakci.



## 6.2 Příprava PCR reakční směsi

Příprava PCR směsi byla prováděna v PCR boxu, který byl vysvícen UV světlem po dobu 15 minut. Všechny úkony byly prováděny v rukavicích. Chemikálie pro PCR směs byly šetrně rozmrazeny, promíchány a centrifugovány. Byly připraveny eppendorfové mikrokumavky a pipety vhodné pro PCR. Jednotlivé chemikálie byly pipetovány, jak je uvedeno v Tab. 1.

Tab. 1. Chemikálie pro přípravu PCR reakční směsi

| PCR reakční směs   | Vzorek     | Negativní kontrola |
|--------------------|------------|--------------------|
| PCR Taq Master Mix | 10 $\mu$ l | 10 $\mu$ l         |
| Primer RD1         | 1 $\mu$ l  | 1 $\mu$ l          |
| Primer FD1         | 1 $\mu$ l  | 1 $\mu$ l          |
| H <sub>2</sub> O   | 7 $\mu$ l  | 7 $\mu$ l          |
| Matrice DNA        | 1 $\mu$ l  | -                  |

PCR Taq Master Mix obsahuje termostabilní DNA polymerázu a optimalizovaný reakční pufr. Jako negativní kontrola byl použit vzorek, který obsahoval všechny komponenty PCR reakční směsi bez DNA matrice, čímž bylo ověřeno, že žádná složka PCR reakční směsi nebyla kontaminována. Takto připravené vzorky v mikrokumavkách byly promíchány, centrifugovány a vloženy do thermocyklu.

## 6.3 Průběh PCR

Připravené mikrokumavky se vzorky byly vloženy do stojánku thermocyklu Aerus Thermal Cycler. Amplifikace probíhala dle programu:

|                      |       |         |            |
|----------------------|-------|---------|------------|
| Počáteční denaturace | 94 °C | 2 min   | } 30 cyklů |
| Denaturace           | 94 °C | 30 sec  |            |
| Nasedání primerů     | 57 °C | 30 sec  |            |
| Syntéza řetězce DNA  | 72 °C | 1,5 min |            |
| Závěrečná extenze    | 72 °C | 10 min  |            |

Po skončení PCR lze na thermocyklu nastavit teplotu 4 °C na neomezeně dlouhou dobu, což umožňuje uchovávat vzorky před detekcí PCR produktu.

Vzorky podrobené PCR byly následně zaslány do společnosti SEQme s.r.o., kde proběhlo Sangerovo sekvenování. Případné chyby v sekvenaci byly opraveny v programu DNA Baser Assembler a výsledky porovnávány se sekvencemi v databázi BLAST.

#### 6.4 Příprava vzorku pro hmotnostní spektrometrii

Z BHI agaru byla sterilní kličkou odebrána 24hodinová kultura bakterií, která byla následně převedena do sterilní eppendorfky a rozesuspendována ve 150 µl sterilní destilované vody. Následně bylo přidáno 450 µl 96% ethanolu. Takto připravený vzorek byl zaslán do Slovenské poľnohospodárskej univerzity v Nitre, kde bylo provedeno srovnání hmotnostních spekter s databází kontrolních kmenů. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí softwarového systému MALDI Biotyper.

#### 6.5 Výsledky identifikačních metod

K testování byly použity bakterie (5 kmenů) izolované z mléčných výrobků, které byly poskytnuty z Výzkumného ústavu mlékárenského v Praze. Identifikace bakterií byla zjišťována pomocí sekvenace a MALDI TOF. Nejvyšší dosažené shody a skóre jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2. Nejvyšší dosažená skóre u identifikace pomocí MALDI TOF a nejvyšší dosažené shody sekvenace

| Kmen      | Identifikovaný druh                 | Shoda (%) | Skóre |
|-----------|-------------------------------------|-----------|-------|
| R23       | <i>Bacillus tequilensis</i>         | 99        | 1,432 |
| R25       | <i>Bacillus subtilis</i>            | 100       | 1,531 |
| R34       | <i>Bacillus pumilus</i>             | 99        | 1,490 |
| R39       | <i>Bacillus cereus</i>              | 99        | 1,755 |
| GKCIP 5/1 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 100       | 2,280 |

Skóre je indikátorem posouzení kvality proběhnuté identifikace, tedy určuje míru pravděpodobnosti správného určení vyšetřovaného kmene. Kmeny R23, R25 a R34 dosáhly nízkého skóre u identifikace pomocí MALDI TOF, což značí nespolehlivou identifikaci. Kmeny R39 a GKCIP 5/1 dosáhly vysokého skóre, proto je pravděpodobné, že byl druh

správně identifikován. Přestože dosažená skóre u MALDI TOF nebyla vysoká, lze s porovnáním výsledků obou identifikačních metod určit bakteriální druh, nikoli bakteriální kmen.

## 6.6 Příprava živného média a bakteriální suspenze

Při přípravě živného média byl BHI bujón (Himedia, Bombaj, Indie) navážen s přesností na 0,01 g a rozpuštěn v požadovaném množství destilované vody. V případě tekutého živného média byl bujón rozpipetován po 4,5 ml do zkumavek, a poté sterilován v autoklávu Systec 2540 EL při 121 °C po dobu 15 min. BHI agar byl po sterilaci přelit na Petriho misky, které sloužily k uchování mikroorganismů. Bakteriální suspenze byla připravena zaočkováním bakterií z Petriho misek do zkumavek se 4,5 ml sterilního BHI bujónu. Takto připravená suspenze byla kultivována v termostatu Memmert INE 600 na 24 hodin při teplotě 30 °C.

## 6.7 Sledování inhibičního účinku MK na růst bakterií a jejich biofilm

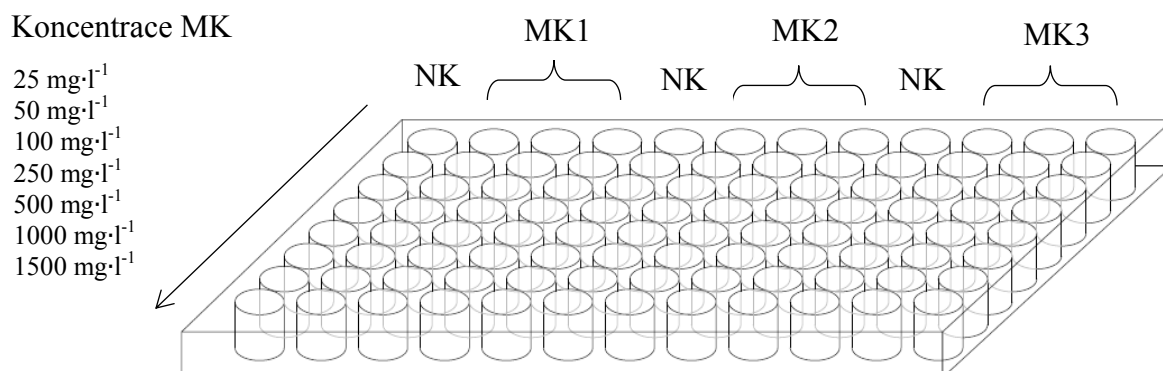
Růst bakterií v přítomnosti MK o různých koncentracích byl sledován po dobu 24 hodin.

Nejprve byly připraveny roztoky MK o koncentracích 25–1500 mg·l<sup>-1</sup> do zkumavek se 4,5 ml BHI bujónu, jak je uvedeno v Tab. 3.

Tab. 3. Množství MK potřebného pro přípravu roztoku MK v bujónu o dané koncentraci

| Koncentrace MK [mg·l <sup>-1</sup> ] | Pipetovaný objem MK [ml] |
|--------------------------------------|--------------------------|
| 25                                   | 2,25                     |
| 50                                   | 4,5                      |
| 100                                  | 9                        |
| 250                                  | 22,5                     |
| 500                                  | 45                       |
| 1000                                 | 90                       |
| 1500                                 | 135                      |

Takto připravené roztoky byly pipetovány v množství 250 µl do jamek mikrotitrační destičky, které byly následně zaočkovány 5 µl 24hodinové bakteriální suspenze. Na jedné mikrotitrační destičce byl sledován inhibiční účinek tří mastných kyselin na jeden bakteriální kmen, viz Obr. 2.



Obr. 2. Zaočkování mikrotitrační destičky

V jamkách pro pozitivní kontrolu nebyla pipetována mastná kyselina. Symboly NK značí negativní kontrolu a symboly MK1–MK3 značí 3 různé testované mastné kyseliny. Koncentrace mastné kyseliny byla seřazena vzestupně od 0 mg·l<sup>-1</sup> po 1500 mg·l<sup>-1</sup>. Mastná kyselina o dané koncentraci byla vždy pipetována ve třech opakováních.

Na takto připravené mikrotitrační destičce byla po dobu 24 hodin při 30 °C měřena růstová křivka (změna optické denzity suspenze buněk). Na přístroji Tecan infinite 200Pro byly nastaveny následující podmínky analýzy: míchání po dobu 15 sekund s frekvencí 2 mm před každým měřením, měření optické denzity po půl hodinových intervalech při vlnové délce 600 nm a teplota kultivace 30 °C. Výsledná data byla zaznamenávána softwarem Microsoft Excel 2010. Z naměřených hodnot byl vypočítán průměr a sestrojena růstová křivka. Pro kontrolu, zda MK o dané koncentraci mají baktericidní nebo bakteriostatický účinek, byla kultura z jamky zaočkována sterilní kličkou na agar hádkem.

Poté byl proveden průkaz biofilmu na mikrotitrační destičce. Inhibiční účinek MK na biofilm byl sledován pouze u takových koncentrací mastných kyselin, které vykazovaly inhibiční účinek na růst bakterií. Obsah jamek byl vylit, jamky opakovaně vymyty vodou a fixovány denaturovaným ethanolem po dobu 20 min. Po skončení fixace byly jamky naplněny 250 µl roztokem krystalové violeti po dobu 20 min. Poté bylo barvivo z jamek odstraněno a jamky promyty vodou. Po usušení byly jednotlivé jamky naplněny 250 µl 96% ethanolu, který vyluhoval barvivo z obarvené vytvořené vrstvy biofilmu. Intenzita zbarvení vyluhu v jednotlivých jamkách byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 600 nm.

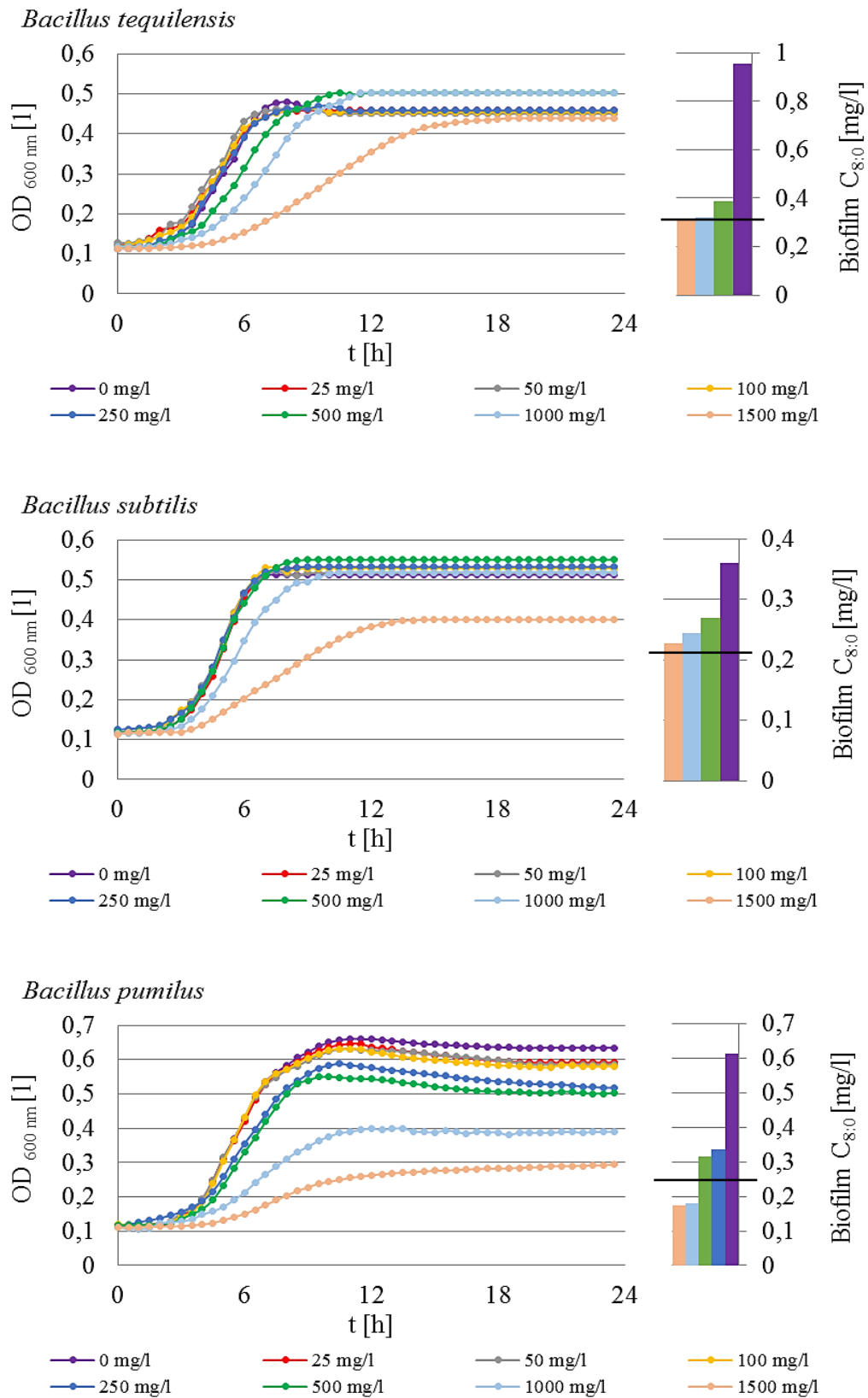
## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Účinek dané mastné kyseliny v určité koncentraci byl hodnocen pomocí růstových křivek, a to od doby lag-fáze až po fázi stacionární. Růst bakterií byl vyhodnocen jako změna optické denzity buněk v čase při 600 nm. Optická denzita byla měřena po dobu 24 hodin. V grafech (Obr. 3–14) jsou znázorněny růstové křivky a tvorba biofilmu testovaných bakterií. Kontrolou byl růst bakterií v kultivačním médiu bez přítomnosti mastné kyseliny (fialové křivky). Inhibiční účinek MK na biofilm byl sledován pouze u takových koncentrací mastných kyselin, které vykazovaly inhibiční účinek na růst bakterií. U *Bacillus cereus* nebyla zaznamenána tvorba biofilmu, tudíž byl vyhodnocen jako biofilmnegativní, a proto u příslušného grafu s jeho růstovými křivkami chybí sloupcový graf, který prezentuje tvorbu biofilmu v určitých koncentracích mastné kyseliny.

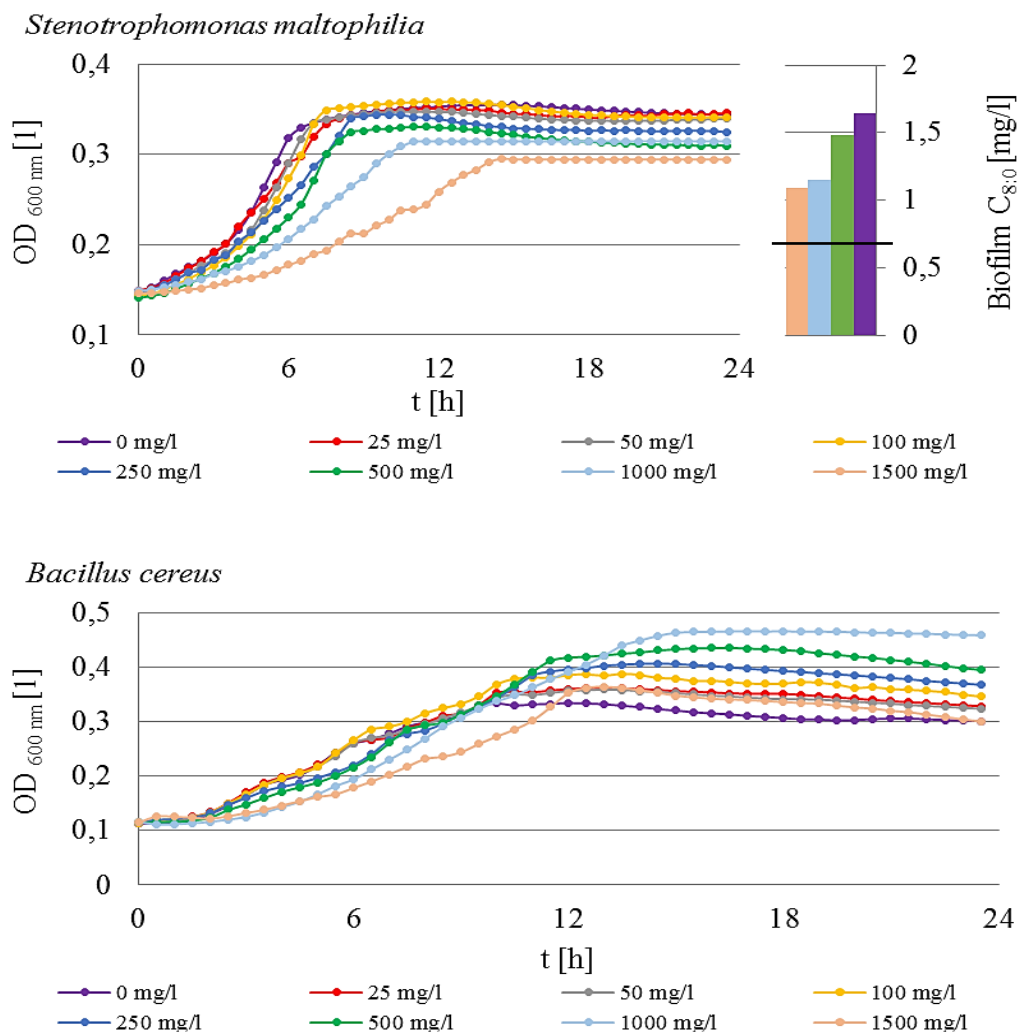
### 7.1 Kyselina kaprylová

MK C<sub>8:0</sub> neměla příliš výrazné inhibiční účinky. Nejvíce působila na růst *Stenotrophomonas maltophilia*, kdy znatelný bakteriostatický účinek nastal již při 100 mg·l<sup>-1</sup> (Obr. 4). Částečný inhibiční účinek vykazovala MK C<sub>8:0</sub> na růst *Bacillus cereus* (Obr. 4) a *Bacillus pumilus* při koncentraci 250 mg·l<sup>-1</sup>, a na růst *Bacillus tequilensis* od koncentrace 500 mg·l<sup>-1</sup> (Obr. 3). U tří posledních zmiňovaných bacilů nastal úplný inhibiční účinek pouze u *Bacillus pumilus* a to od koncentrace 1500 mg·l<sup>-1</sup>, kde lze zaznamenat snížený, ale přesto sledovatelný růst. MK C<sub>8:0</sub> o koncentraci 1000 mg·l<sup>-1</sup> u bakterií *Bacillus pumilus* a *Stenotrophomonas maltophilia* měla vliv na prodloužení lag-fáze na 4 hodiny a na zkrácení exponenciální fáze růstu, která skončila po 11 hodinách. MK C<sub>8:0</sub> nevykazuje baktericidní účinky, což bylo ověřeno zaočkováním kultury na agar. Inhibiční účinek MK C<sub>8:0</sub> zkoumal Bergsson *et al.* (2002), přičemž zjistili, že koncentrace 1400 mg·l<sup>-1</sup> vykazuje střední antibakteriální aktivitu proti gramnegativní patogenní tyčince *Helicobacter pylori*, jež napadá sliznici žaludku (Bergsson, Steingrímsson a Thormar, 2002). Podobných výsledků bylo dosaženo v této práci, kdy MK C<sub>8:0</sub> vykazovala při nejvyšší koncentraci střední antibakteriální aktivitu proti gramnegativní patogenní tyčince *Stenotrophomonas maltophilia*.

Biofilm *Bacillus subtilis* (Obr. 3) a *Stenotrophomonas maltophilia* v přítomnosti MK C<sub>8:0</sub> o koncentracích 500–1500 mg·l<sup>-1</sup> byl nejodolnější a v těchto koncentracích se tvořil i přesto, že znatelná inhibice růstu u *Stenotrophomonas maltophilia* byla při 100 mg·l<sup>-1</sup> této MK. To znamená, že použité koncentrace MK C<sub>8:0</sub> nemají významný vliv na tvorbu biofilmu.



Obr. 3. Inhibiční účinky MK C<sub>8:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus pumilus*



Obr. 4. Inhibiční účinky MK C<sub>8:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu *Stenotrophomonas maltophilia* a růst *Bacillus cereus*

Nejméně odolný byl biofilm *Bacillus tequilensis* a *Bacillus pumilus*, který se tvořil velmi slabě do koncentrace 500 mg·l<sup>-1</sup> a vyššími koncentracemi byl úspěšně inhibován.

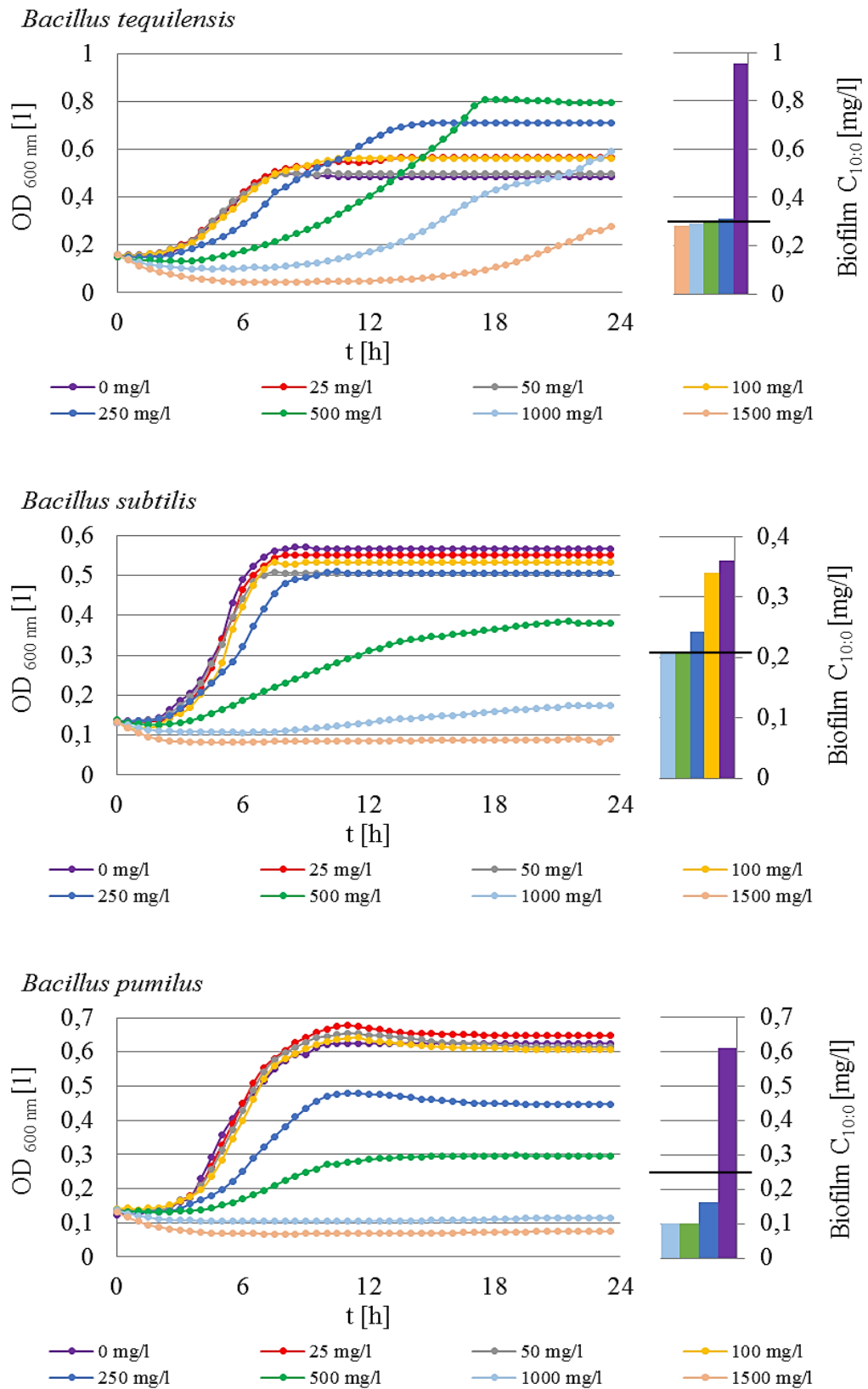
Skřivanová *et al.* (2006) testovali MK C<sub>8:0</sub> a další MK na gramnegativní kmeny *Salmonella* a sporující tyčinku *Clostridium perfringens* a zjistili, že MIC MK C<sub>8:0</sub> se pohybovala v rozmezí 1000–3000 mg·l<sup>-1</sup>. Je tedy pravděpodobné, že použitý rod *Bacillus* by byl také úspěšně inhibován při vyšší koncentraci než 1500 mg·l<sup>-1</sup>. Rosenblatt *et al.* (2015) testovali inhibiční účinky MK C<sub>8:0</sub> v kombinaci s glyceriltrinitrátem na biofilm *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans*. Zjistili, že tato kombinace může eradikovat jejich biofilmy během 2 hodin (Rosenblatt, Reitzel a Raad, 2015).

## 7.2 Kyselina kaprinová

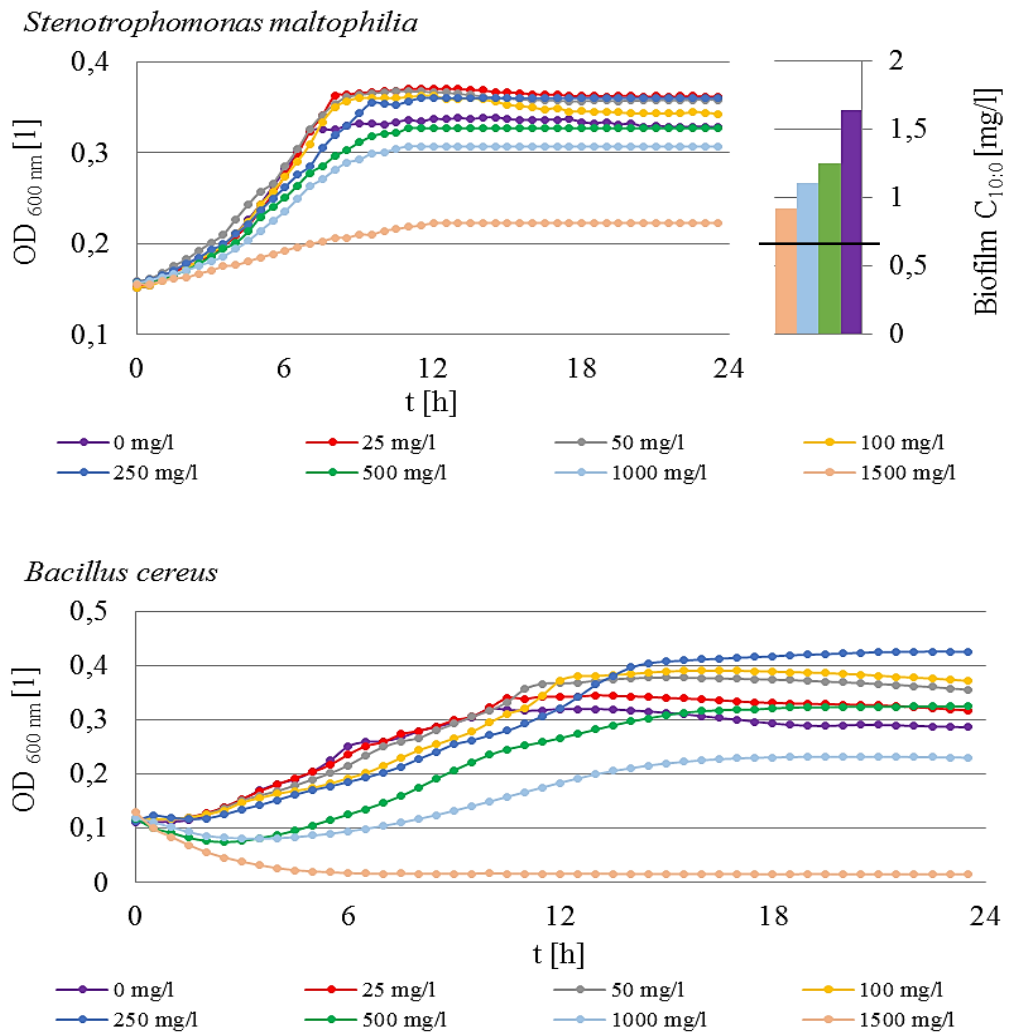
MK C<sub>10:0</sub> působila na všechny testované bakterie inhibičně. Nejcitlivější z pěti bakterií byl *Bacillus subtilis* (Obr. 5) a *Bacillus cereus* (Obr. 6), jejichž růst byl znatelně inhibován touto kyselinou již při koncentraci 100 mg·l<sup>-1</sup>. Mbandi *et al.* (2004) prokázali, že MK C<sub>10:0</sub> o koncentraci 150 mg·l<sup>-1</sup> dokáže inhibovat růst *Listeria monocytogenes*, jež je patogenem kontaminující masné výrobky (Mbandi, Brywig a Shelef, 2004). Tato studie se téměř shoduje s touto prací, protože *Listeria monocytogenes* je grampozitivní tyčinka podílející se na kontaminaci potravin, stejně jako *Bacillus cereus*. Nejvíce odolný byl *Bacillus tequilensis*, *Bacillus pumilus* (Obr. 5) a *Stenotrophomonas maltophilia* (Obr. 6), kdy byl zaznamenán částečný inhibiční účinek v koncentraci 250 mg·l<sup>-1</sup>. V grafu s růstovou křivkou *Bacillus pumilus* lze při této koncentraci sledovat vliv na prodloužení lag-fáze na 4 hodiny a zkrácení exponenciální fáze, která skončila po 10 hodinách. Sporulující grampozitivní tyčinka *Clostridium perfringens* byla inhibována touto kyselinou s MIC 280 mg·l<sup>-1</sup> (Skrivanova *et al.*, 2005). Minimální inhibiční koncentrací na růst *Bacillus subtilis* a *Bacillus cereus* je 1500 mg·l<sup>-1</sup> avšak u *Bacillus pumilus* lze zaznamenat MIC při 1000 mg·l<sup>-1</sup>. MK C<sub>10:0</sub> a její esterifikovaná forma vykazuje antibakteriální účinky na gramnegativní bakterii *Chlamydia trachomatis* v koncentraci 1700 mg·l<sup>-1</sup> (Bergsson *et al.*, 1998). V grafu s růstovou křivkou gramnegativní patogenní tyčinky *Stenotrophomonas maltophilia* lze zaznamenat při nejvyšší koncentraci snížený, ale přesto sledovatelný růst. Inhibiční účinky MK C<sub>10:0</sub> na růst jsou o něco větší než u MK C<sub>8:0</sub>. Tato MK také nevykazuje baktericidní účinky.

Nejméně odolný biofilm vytvářely *Bacillus tequilensis* a *Bacillus pumilus*, který byl úspěšně inhibován při koncentracích 250 mg·l<sup>-1</sup>. S použitím nižších koncentrací je pravděpodobné, že by biofilm tvořili. *Bacillus subtilis* vykazoval silnou tvorbu biofilmu v této kyselině o koncentraci 100 mg·l<sup>-1</sup>, avšak při koncentraci 250 mg·l<sup>-1</sup> byla produkce snížena a při vyšších koncentracích byl inhibován úplně. *Stenotrophomonas maltophilia* produkovala silný biofilm ve všech sledovaných koncentracích. Murzyn *et al.* (2010) testovali inhibiční účinek MK C<sub>10:0</sub>, jež je vylučována probiotickou kvasinkou *Saccharomyces boulardii*, na původce plísňového onemocnění kůže *Candida albicans*. Tato studie prokázala, že MK C<sub>10:0</sub> dokáže účinně inhibovat růst *Candida albicans* a je zodpovědná za inhibici tvorby hyf a částečně také za tvorbu biofilmu.





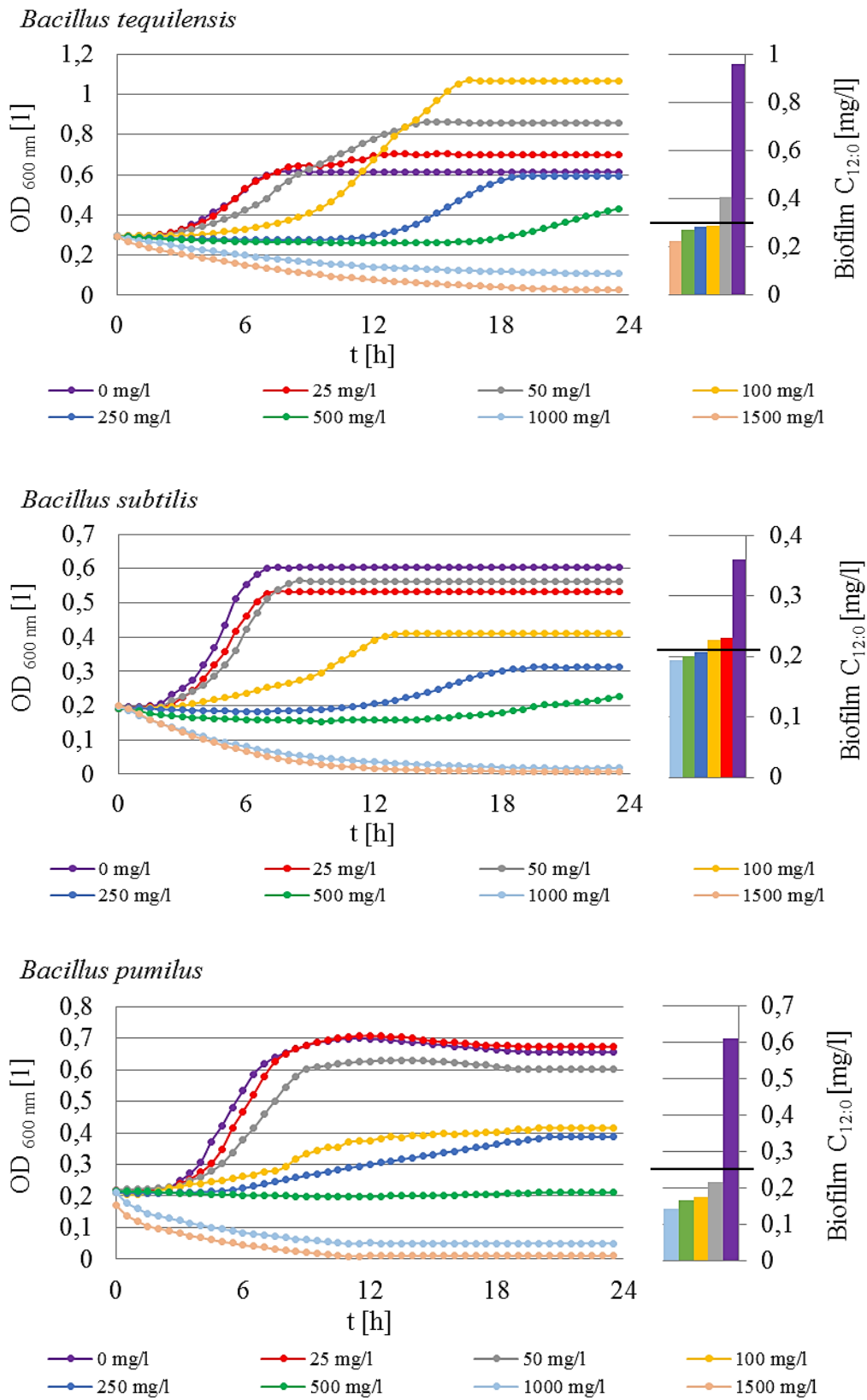
Obr. 5. Inhibiční účinky MK C<sub>10:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus pumilus*



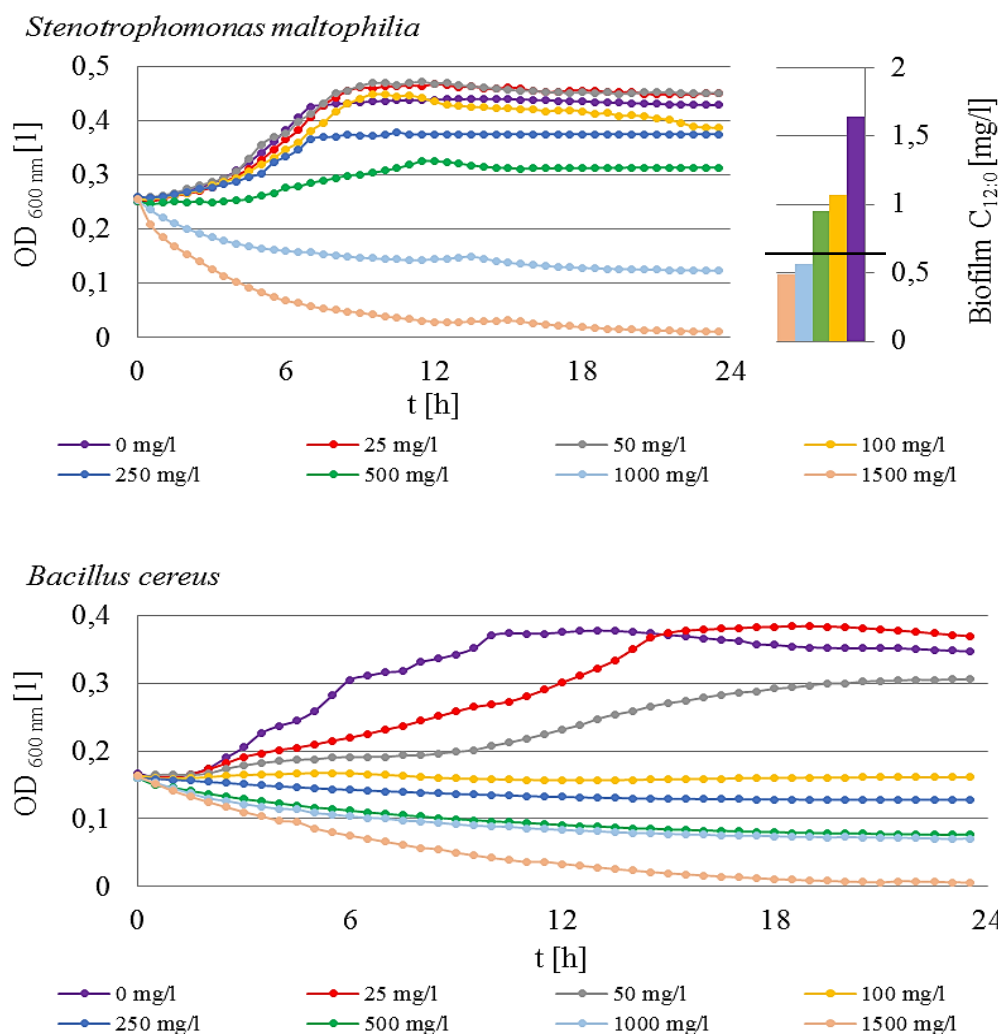
Obr. 6. Inhibiční účinky MK C<sub>10:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu *Stenotrophomonas maltophilia* a růst *Bacillus cereus*

### 7.3 Kyselina laurová

MK C<sub>12:0</sub> má největší antibakteriální aktivitu ze všech alifatických mastných kyselin se středním řetězcem. Její účinek se zvyšuje, jestliže je esterifikována na monolaurin, který je obecně účinný proti grampozitivním bakteriím (Thormar, 2011). MK C<sub>12:0</sub> vykazovala inhibiční účinky již při nízkých koncentracích u všech sledovaných bakterií. Znatelně inhibovala růst *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* (Obr. 7) a *Bacillus cereus* (Obr. 8) již v koncentraci 25 mg·l<sup>-1</sup>. U těchto bakterií lze sledovat baktericidní účinek, a to od koncentrace 250 mg·l<sup>-1</sup>. Tento účinek lze sledovat i u *Bacillus tequilensis*, kdy tato koncentrace měla vliv na prodloužení lag-fáze až na 12 hodin a zkrácení exponenciální fáze růstu, která skončila po 18 hodinách (Obr. 7). Baktericidní účinek měla MK C<sub>12:0</sub> v těch koncentracích, ve kterých bacily přestaly produkovat biofilm. Testované koncentrace MK C<sub>12:0</sub> nemají na *Stenotrophomonas maltophilia* baktericidní účinky. Baktericidní účinek byl ověřen zaočkováním kultury na agar. Významný inhibiční efekt byl zaznamenán u *Bacillus subtilis* při koncentraci 100 mg·l<sup>-1</sup>, kdy byla lag-fáze prodloužena na 4 hodiny a exponenciální fáze skončila po 12 hodinách. MK C<sub>12:0</sub> nejméně působila na růst *Stenotrophomonas maltophilia*, kdy částečný inhibiční účinek nastal až při koncentraci 100 mg·l<sup>-1</sup> (Obr. 8). Antibakteriální aktivita MK C<sub>12:0</sub> byla zkoumána na růst grampozitivních bakterií *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus curvatus* a *Lactobacillus sake*, které se podílejí na kažení masa. Bylo zjištěno, že MK C<sub>12:0</sub> byla účinná vůči růstu těchto bakterií s MIC 250–500 mg·l<sup>-1</sup> (Ouattara *et al.*, 1997). MIC na růst *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis* a *Stenotrophomonas maltophilia* byla zjištěna při 1000 mg·l<sup>-1</sup>. U *Bacillus pumilus* byla MIC při 500 mg·l<sup>-1</sup>, avšak u *Bacillus cereus*, který je také spojen s kontaminací potravin, byla zaznamenána MIC již při 100 mg·l<sup>-1</sup>. Podobných výsledků bylo dosaženo i ve studii antibakteriálních účinků MK na sporulující grampozitivní tyčinku *Clostridium perfringens*, kdy MK C<sub>12:0</sub> vykazovala MIC při 100 mg·l<sup>-1</sup> (Skřivanová *et al.* 2006). Ve studii, kde byly zkoumány inhibiční účinky MK se středně dlouhým řetězcem a jejich MAGy na rody *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* a další grampozitivní bakterie bylo zjištěno, že MAGy vykazovaly větší aktivitu, ale *Listeria monocytogenes* byla citlivější na MK C<sub>12:0</sub> (Batovska *et al.*, 2009). Inhibiční účinky MK C<sub>12:0</sub> na tuto grampozitivní tyčinku testovali Wang a Johnson (1992). Zjistili, že MK C<sub>12:0</sub> vykazovala baktericidní účinky v koncentraci 10 mg·l<sup>-1</sup>, přičemž snížení pH z 6 na pH 5 tento účinek ještě zvýší.



Obr. 7. Inhibiční účinky MK C<sub>12:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus pumilus*



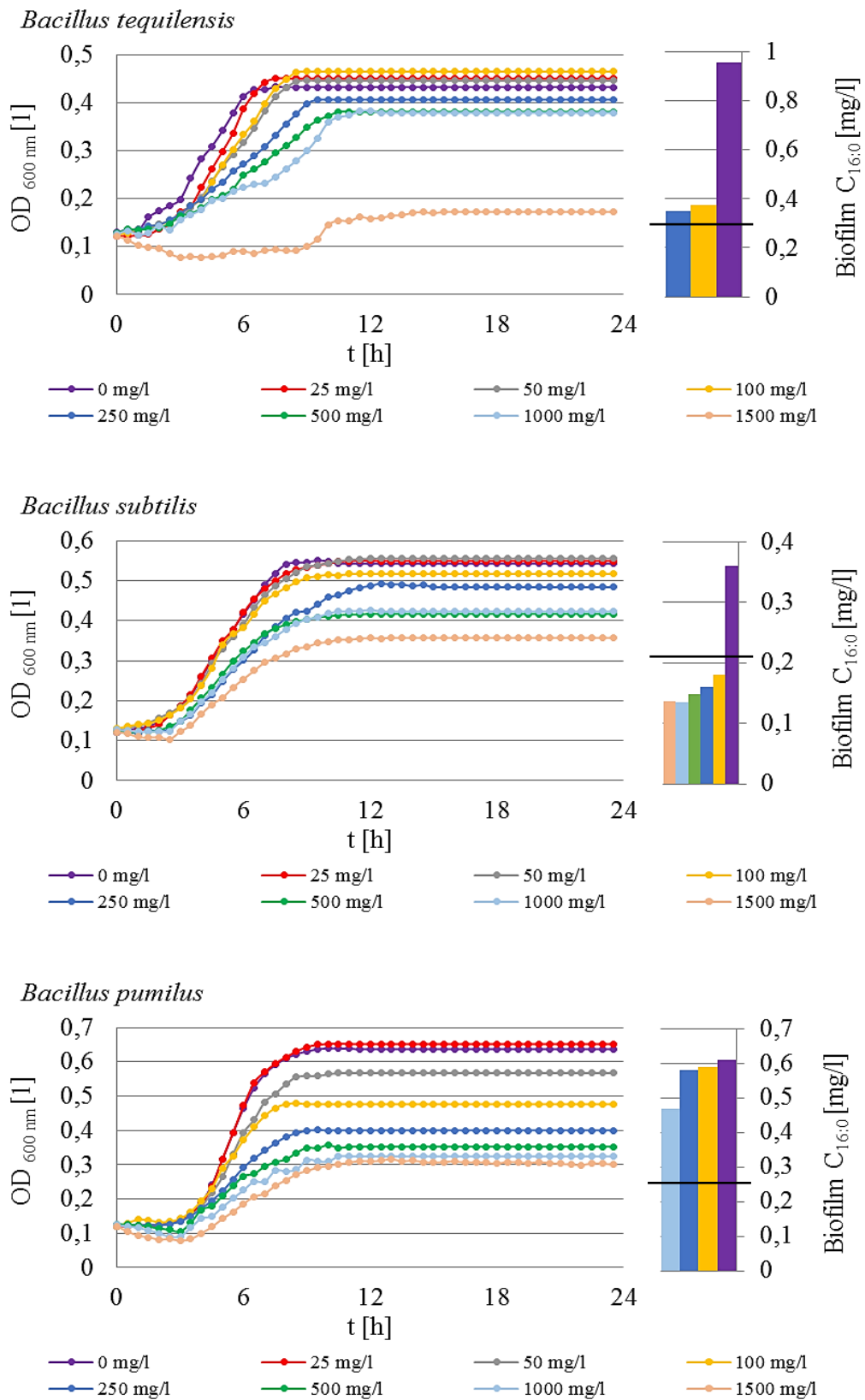
Obr. 8. Inhibiční účinky MK C<sub>12:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu *Stenotrophomonas maltophilia* a růst *Bacillus cereus*

Nejméně odolný biofilm vůči MK C<sub>12:0</sub> vytvářel *Bacillus tequilensis*, který tvořil slabý biofilm do koncentrace 50 mg·l<sup>-1</sup> a *Bacillus pumilus*, který již od této koncentrace přestal biofilm produkovat. Biofilm *Bacillus subtilis* se vytvářel velmi slabě do koncentrace 100 mg·l<sup>-1</sup> a nejvíce odolný biofilm byl tvořen *Stenotrophomonas maltophilia*, která jej silně produkovala do koncentrace 500 mg·l<sup>-1</sup>. Koncentrace 1000 a 1500 mg·l<sup>-1</sup> byly pro růst a tvorbu biofilmu všech bakterií inhibiční. Schlievert *et al.* (2012) testovali antibakteriální účinky MK C<sub>12:0</sub> a MAG C<sub>12:0</sub>. MAG C<sub>12:0</sub> vykazoval několikrát větší účinnost než MK C<sub>12:0</sub> vůči růstu *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*. Také zabraňuje tvorbě biofilmu *Staphylococcus aureus* a *Haemophilus influenzae* a vykazuje vůči oběma bakteriím baktericidní účinky. (Schlievert, Peterson a Kaufmann, 2012)

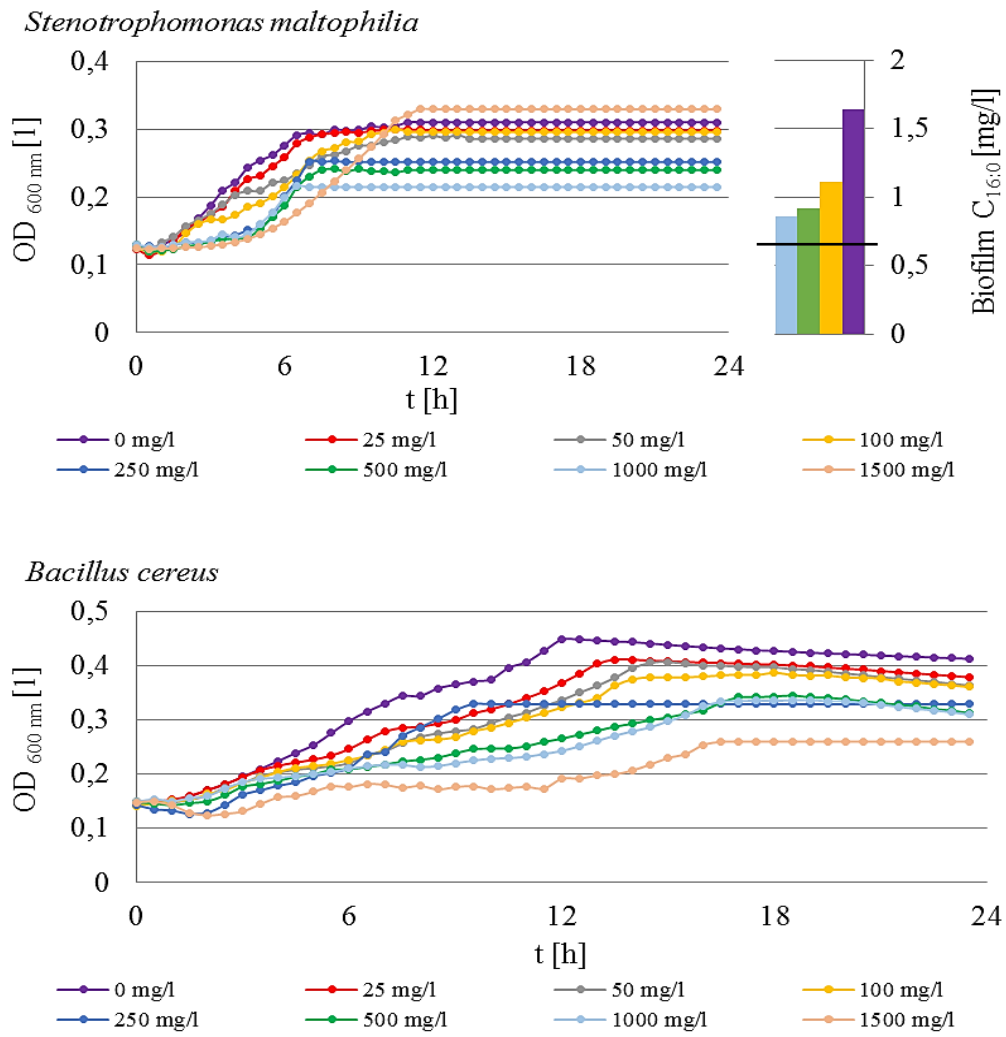
## 7.4 Kyselina palmitová

MK C<sub>16:0</sub> byla velmi účinná vůči růstu *Bacillus tequilensis*, *Bacillus pumilus* (Obr. 9), *Bacillus cereus* a *Stenotrophomonas maltophilia* (Obr. 10), kdy znatelný inhibiční účinek lze zaznamenat už při nejnižších koncentracích tj. 25–50 mg·l<sup>-1</sup>. Částečný bakteriostatický účinek nastal u všech sledovaných bakterií při koncentraci 250 mg·l<sup>-1</sup>. Při této koncentraci se u všech bakterií výrazně neprodlužuje lag-fáze, avšak u růstové křivky *Bacillus pumilus* lze zaznamenat zkrácení exponenciální fáze na 8 hodin a u růstové křivky *Bacillus subtilis* lze vyčíst, že exponenciální fáze růstu skončila až po 12 hodinách (Obr. 9). MK C<sub>16:0</sub> nemá ani na jednoho z testovaných mikrobů baktericidní účinek. Jak bylo zmíněno výše, antimikrobní účinky MK na grampozitivní tyčinku *Listeria monocytogenes* zkoumali Wang a Johnson (1992). Zjistili, že největší aktivitu vykazovala MK C<sub>12:0</sub> a MAG C<sub>12:0</sub>, ale mezi testovanými byla i MK C<sub>16:0</sub> a MK C<sub>18:0</sub>. Inhibiční účinek těchto dvou mastných kyselin nebyl prokázán. MK C<sub>16:0</sub> v této práci nemá na testované bakterie úplný inhibiční účinek. Antimikrobní vlastnosti MK C<sub>16:0</sub> a MK C<sub>18:0</sub> testovali i Marounek *et al.* (2003) na gramnegativní tyčinku *Escherichia coli*, kdy inhibiční koncentrace byla větší než 5000 mg·l<sup>-1</sup> (Marounek, Skřivanová a Rada, 2003). Tato studie se shoduje s výsledky MK C<sub>16:0</sub> na růst gramnegativní tyčinky *Stenotrophomonas maltophilia*, kdy inhibiční účinek na růst této bakterie by byl úplný až při použití vyšších koncentrací než 1500 mg·l<sup>-1</sup>.

Biofilm *Bacillus subtilis* byl v přítomnosti MK C<sub>16:0</sub> odolný nejméně. Ve všech sledovaných koncentracích *Bacillus subtilis* biofilm tvořil. Je pravděpodobné, že při koncentracích 25 mg·l<sup>-1</sup> a 50 mg·l<sup>-1</sup> by se biofilm tvořil, protože zde není inhibiční účinek na růst této bakterie. *Bacillus tequilensis* při koncentracích 100 mg·l<sup>-1</sup> a 250 mg·l<sup>-1</sup> tvořil slabý biofilm, takže lze předpokládat, že při vyšších koncentracích již biofilm produkovat nebude. Silný biofilm produkoval *Bacillus pumilus* a *Stenotrophomonas maltophilia*, který se tvořil v koncentracích 100–1000 mg·l<sup>-1</sup> (Obr. 10). I přesto, že znatelná inhibice růstu u *Stenotrophomonas maltophilia* byla 100 mg·l<sup>-1</sup> a u *Bacillus pumilus* 50 mg·l<sup>-1</sup> se biofilm tvořil ve všech koncentracích. Znamená to tedy, že MK C<sub>16:0</sub> nemá významný vliv na jejich tvorbu biofilmu.



Obr. 9. Inhibiční účinky MK C<sub>16:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus pumilus*



Obr. 10. Inhibiční účinky MK C<sub>16:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu *Stenotrophomonas maltophilia* a růst *Bacillus cereus*

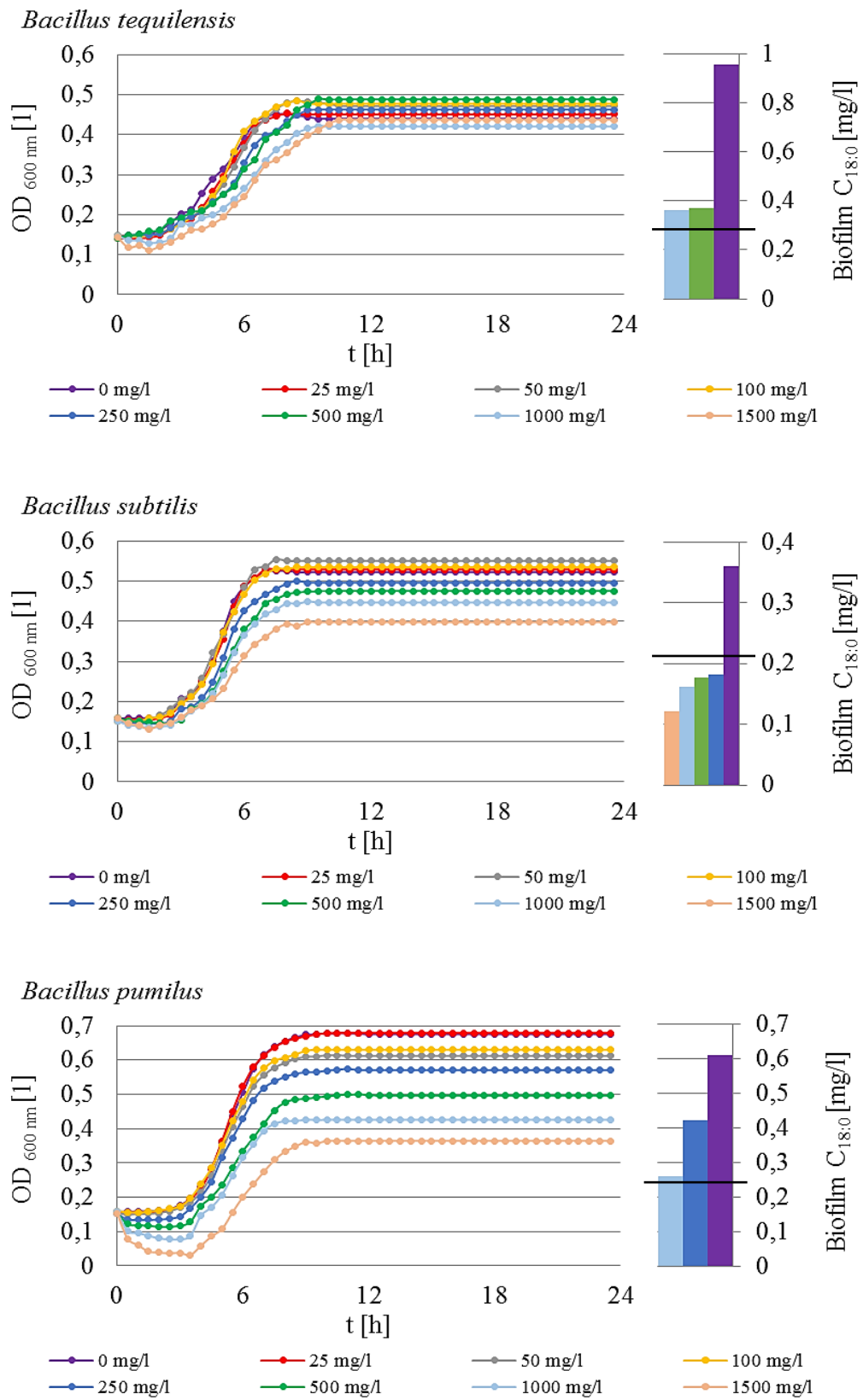


## 7.5 Kyselina stearová

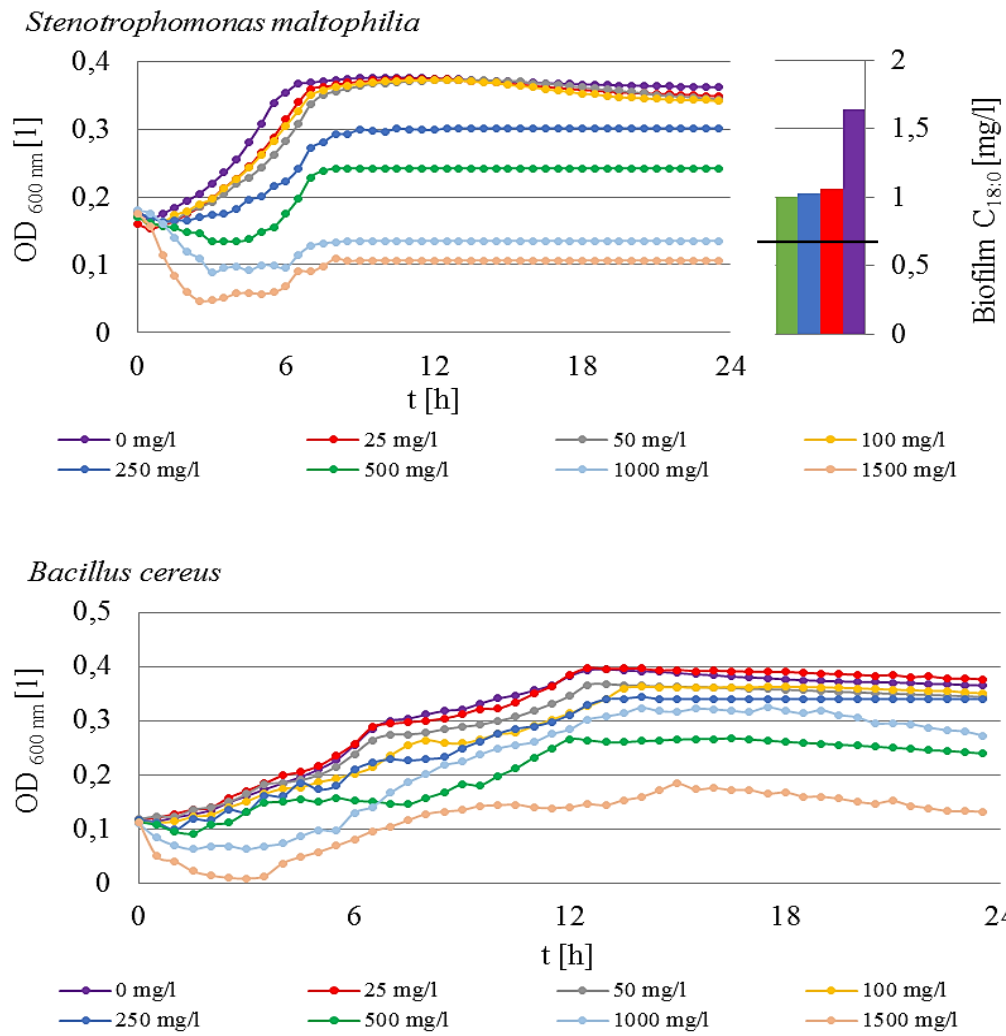
MK C<sub>18:0</sub> neměla téměř žádné inhibiční účinky na bacily, naopak na gramnegativní tyčinku *Stenotrophomonas maltophilia* měla znatelný inhibiční účinek již při koncentracích 25–100 mg·l<sup>-1</sup> (Obr. 12). Významný inhibiční účinek na růst všech testovaných bakterií nastal až při koncentraci 250 mg·l<sup>-1</sup>. Z dostupné literatury nebylo možné zjistit, zda kyselina stearová může mít potenciálně větší antibakteriální účinky proti gramnegativním než proti grampozitivním bakteriím, protože neexistují studie, které by se touto problematikou zabývali. Z růstové křivky *Bacillus pumilus* lze vyčíst, že koncentrace 500 mg·l<sup>-1</sup> měla vliv na zkrácení exponenciální fáze růstu, která skončila po 10 hodinách (Obr. 11). Úplný inhibiční účinek této mastné kyseliny by byl prokazatelný s použitím vyšší koncentrace než 1500 mg·l<sup>-1</sup>. MK C<sub>18:0</sub> stejně jako MK C<sub>16:0</sub> nemá baktericidní účinky na tyto bakterie.

Biofilm *Bacillus subtilis* byl opět nejméně odolný. Při koncentracích nižších než 250 mg·l<sup>-1</sup> by se mohl pravděpodobně biofilm tvořit, protože se při nižších koncentracích, stejně jako u kyseliny palmitové, neprojevuje inhibiční účinek na růst (Obr. 11). *Stenotrophomonas maltophilia* tvořila silný biofilm v koncentracích 25–500 mg·l<sup>-1</sup>. *Bacillus tequilensis* (Obr. 11) a *Bacillus pumilus* produkovali biofilm velmi slabě při koncentraci 1000 mg·l<sup>-1</sup>. Je tedy pravděpodobné, že při nejvyšší koncentraci by biofilm tvořit přestali. I přestože růst *Bacillus subtilis* nebyl nijak výrazně inhibován, tvorba biofilmu v přítomnosti této mastné kyseliny byla výrazně snížena (Obr. 11). Naopak odolnost růstu *Stenotrophomonas maltophilia* a *Bacillus pumilus* v přítomnosti této mastné kyseliny byla nejnižší, ale tvorba biofilmu nejvyšší.

ABABOUCH *et al.* (1992) testovali mastné kyseliny na spory *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes* a *Bacillus cereus*. Zjistili, že nejvíce inhibující byla MK C<sub>12:0</sub> s MIC 150 mg·l<sup>-1</sup> a kyselina linolenová 10 mg·l<sup>-1</sup>. MK C<sub>8:0</sub>, MK C<sub>10:0</sub>, MK C<sub>16:0</sub> a MK C<sub>18:0</sub> vykazovaly též inhibiční efekt, ale až při koncentracích vyšších než 150 mg·l<sup>-1</sup> (ABABOUCH, CHAIBI a BUSTA, 1992).



Obr. 11. Inhibiční účinky MK C<sub>18:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus pumilus*

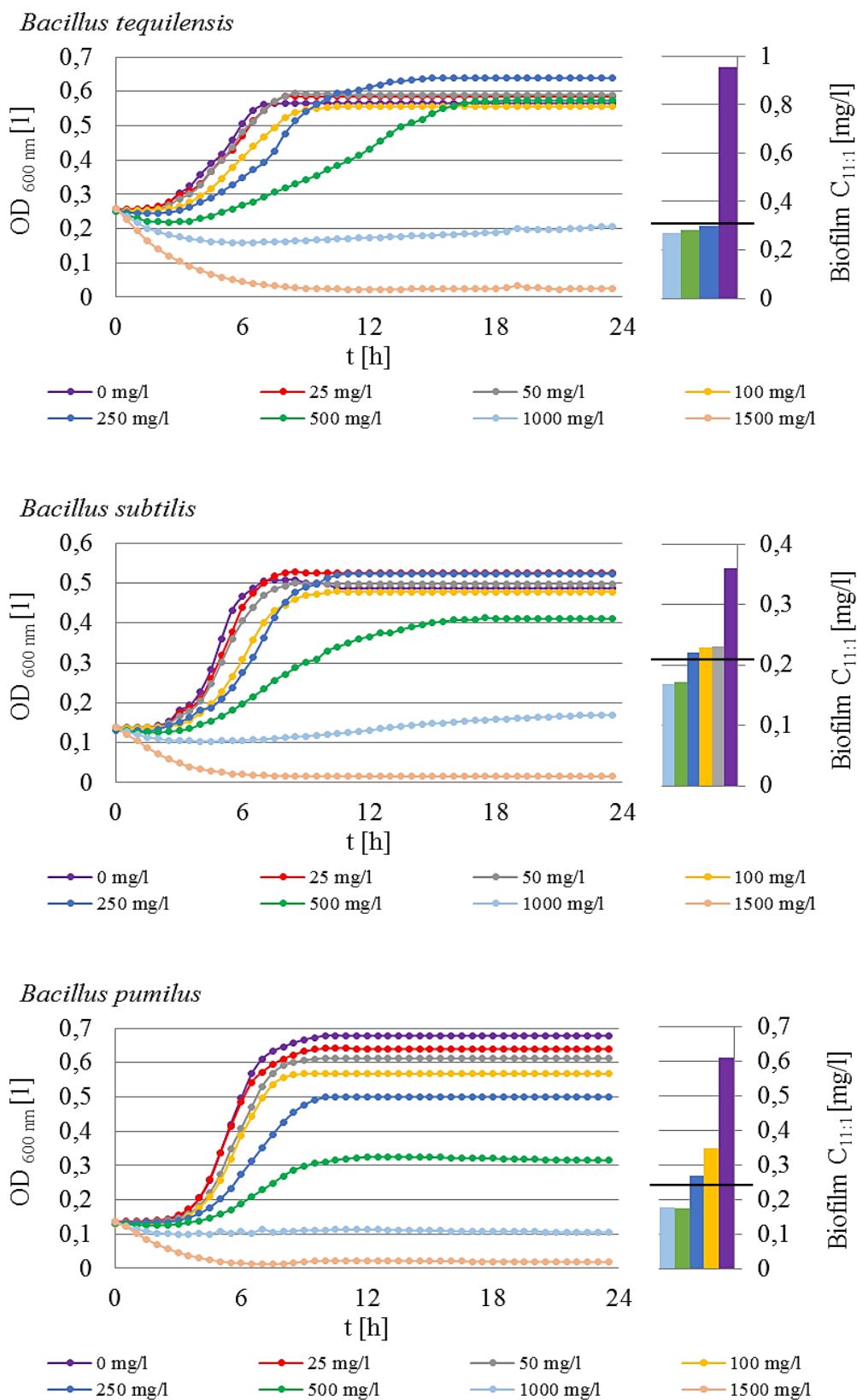


Obr. 12. Inhibiční účinky MK C<sub>18:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu *Stenotrophomonas maltophilia* a růst *Bacillus cereus*

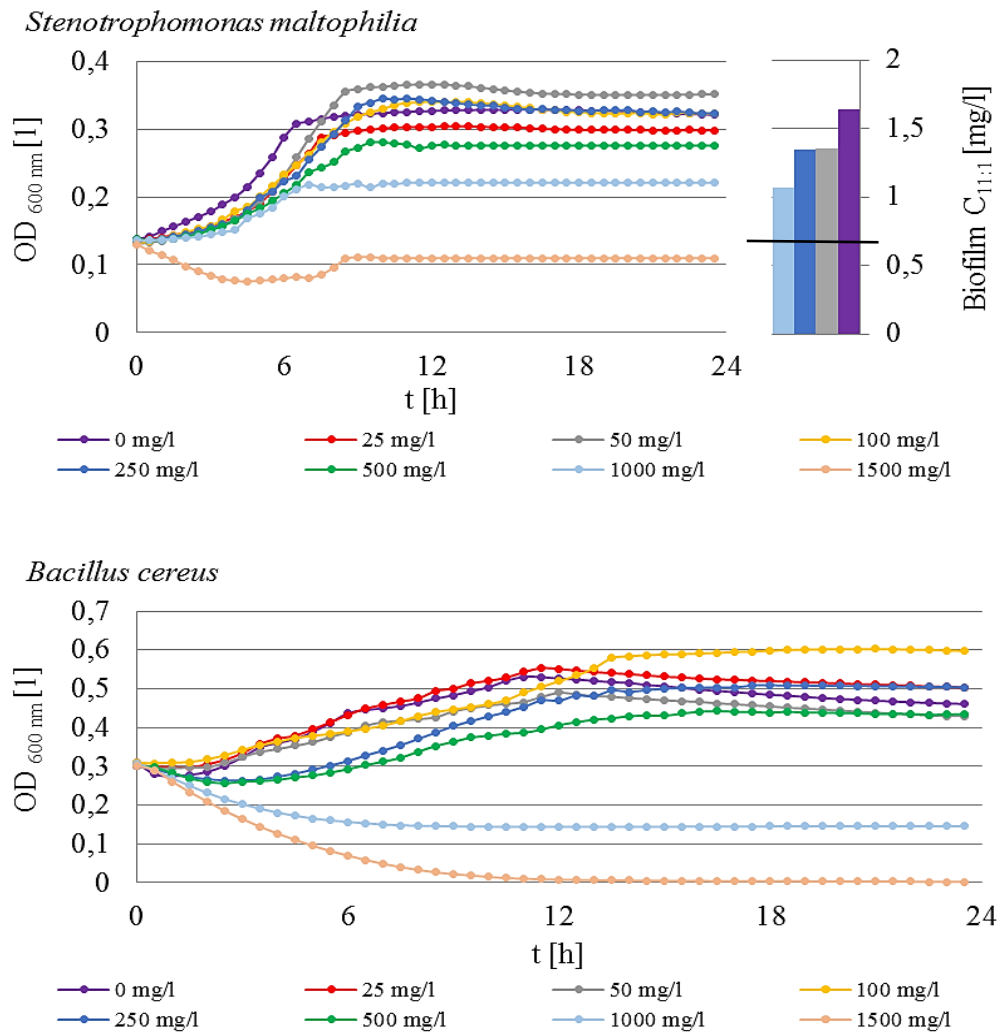
## 7.6 Kyselina undecenová

MK C<sub>11:1</sub> stejně jako MK C<sub>12:0</sub> vykazovala znatelné inhibiční účinky již při 50 mg·l<sup>-1</sup> a to na téměř všechny testované bakterie, kromě *Bacillus tequilensis*, u něhož byl zaznamenán znatelný inhibiční účinek při koncentraci 100 mg·l<sup>-1</sup> (Obr. 13). Obecně však měla MK C<sub>11:1</sub> větší antimikrobní efekt na všechny bacily. Podle Desbois a Smith (2010) mají nenasycené mastné kyseliny se středně dlouhým až dlouhým řetězcem tendenci být aktivnější proti grampozitivním bakteriím než proti gramnegativním. Doležalová *et al.*, (2010) zkoumali antimikrobní účinky MAG C<sub>11:0</sub> a MAG C<sub>11:1</sub> a zjistili, že obě tyto látky úspěšně inhibovaly grampozitivní koky *Staphylococcus aureus* a sporulující tyčinky *Bacillus cereus*, ale gramnegativní bakterie byly vysoce odolné na inhibici těmito MAGy. MK C<sub>11:1</sub> vykazovala také na *Bacillus cereus* značné antibakteriální účinky již při koncentraci 50 mg·l<sup>-1</sup> (Obr. 14). Významný bakteriostatický účinek tvořila tato kyselina o koncentraci 500 mg·l<sup>-1</sup>, kdy u růstových křivek *Bacillus tequilensis* a *Bacillus subtilis* došlo k prodloužení lag-fáze na 4 hodiny a exponenciální fáze růstu skončila až po 18 hodinách (Obr. 13). U *Bacillus pumilus* (Obr. 13) a *Stenotrophomonas maltophilia* (Obr. 14) bylo prodloužení lag-fáze stejné jako u výše zmíněných dvou bacilů, ale exponenciální fáze růstu skončila již po 10 hodinách. U *Bacillus pumilus* byla exponenciální fáze kratší oproti kontrole bez MK. U všech bacilů byla zaznamenána MIC při 1000 mg·l<sup>-1</sup>. MK C<sub>11:1</sub> v koncentraci 1500 mg·l<sup>-1</sup> měla baktericidní účinek na *Bacillus pumilus* a *Bacillus cereus*. Účinek opět ověřen zaočkováním na agar. Lee *et al.* (2002) uvádí, že růst *Bacillus cereus* byl úspěšně inhibován nenasycenou MK C<sub>18:2</sub> s minimální inhibiční koncentrací 20 mg·l<sup>-1</sup> (Lee, Kim a Shin, 2002). Lze tedy usoudit, že antibakteriální účinnost nenasycených MK vůči růstu *Bacillus cereus* se zvyšuje s rostoucím počtem uhlíků v řetězci.

*Bacillus subtilis* a *Bacillus pumilus* produkovali slabý biofilm do koncentrace 250 mg·l<sup>-1</sup>, vyššími koncentracemi byl biofilm obou bacilů úspěšně inhibován. I přestože byly inhibiční účinky na růst této mastné kyseliny u všech testovaných bakterií zcela shodné, *Stenotrophomonas maltophilia* prokázala největší produkci silného biofilmu při všech koncentracích MK C<sub>11:1</sub>.



Obr. 13. Inhibiční účinky MK C<sub>11:1</sub> na růst a biofilm *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus pumilus*



Obr. 14. Inhibiční účinky MK C<sub>11:1</sub> na růst a tvorbu biofilmu *Stenotrophomonas maltophilia* a růst *Bacillus cereus*

## 8 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium inhibičních účinku mastných kyselin na bakterie tvořící biofilm. Vliv mastných kyselin byl sledován u 4 druhů bacilů a u jedné gramnegativní tyčinky. Největší antimikrobní vlastnosti vykazovala MK C<sub>11:1</sub> a to již při nízkých koncentracích na všechny testované bakterie. Bakteriostaticky působila MK C<sub>12:0</sub> v koncentraci 25 mg·l<sup>-1</sup> na rod *Bacillus* mimo *Bacillus tequilensis*. Baktericidní účinky vykazovala MK C<sub>12:0</sub> při koncentraci 250 mg·l<sup>-1</sup> na všechny sledované bacily. *Stenotrophomonas maltophilia* byla vůči působení MK C<sub>12:0</sub> odolnější. Nejméně účinné mastné kyseliny vůči růstu bacilů byly MK C<sub>8:0</sub> a MK C<sub>18:0</sub>. Naopak na bakterii *Stenotrophomonas maltophilia* způsobila MK C<sub>18:0</sub> znatelnou inhibici již od koncentrace 25 mg·l<sup>-1</sup>. Biofilm významně inhibovala MK C<sub>10:0</sub> i MK C<sub>12:0</sub> přičemž biofilm produkovaný *Stenotrophomonas maltophilia* byl vůči působení všech MK nejodolnější. U této bakterie byl biofilm tvořen bez ohledu na to, zda daná kyselina inhibovala růst již při nízkých koncentracích.

S posouzením všech výsledků, by se antimikrobiální vlastnosti mastných kyselin daly využít pro různé aplikace v medicíně, zemědělství, ke konzervaci potravin a kosmetiky a pro prevenci a léčbu infekcí. Mastné kyseliny jsou přírodního původu a jsou použitelné v případech, kdy je vyžadována antimikrobní aktivita a použití antibiotik je nežádoucí nebo zakázané. Vzhledem k tomu, že se zvyšuje rezistence mnoha bakterií k antibiotikům, je zde důvod dále zkoumat mastné kyseliny jako antibakteriální činidla pro lidské zdraví a medicínu.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

ABABOUC, LAHSEN, AHMED CHAIBI a FRANCIS F. BUSTA, 1992. Inhibition of Bacterial Spore Growth by Fatty Acids and Their Sodium Salts. *Journal of Food Protection* [online]. **55**(12), 980-984 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.4315/0362-028X-55.12.980. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-55.12.980>

AL-ADHAM, I.S.I et al., 2003. Microemulsions are highly effective anti-biofilm agents. *Letters in Applied Microbiology*. 36(2), 97-100.

ALTIERI, Clelia et al., 2009. Effectiveness of fatty acids and their monoglycerides against gram-negative pathogens. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. **44**(2), 359-366 [cit. 2019-01-20]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2008.01744.x. ISSN 09505423. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2008.01744.x>

AN, Yuehuei H a Richard J FRIEDMAN, 1997. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *Journal of Microbiological Methods* [online]. **30**(2), 141-152 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1016/S0167-7012(97)00058-4. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701297000584>

BATOVSKA, Daniela I. et al., 2009. Antibacterial Study of the Medium Chain Fatty Acid and Their 1-Monoglycerides: Individual Effects and Synergistic Relationship. *Polish Journal of Mikrobiology* [online]. (1), 43-47 [cit. 2019-05-10].

BERGSSON, Gudmundur et al., 1998. In Vitro Inactivation of Chlamydia trachomatis by Fatty Acids and Monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **42**(9), 2290-2294 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1128/AAC.42.9.2290. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.42.9.2290>

BERGSSON, Gudmundur, Ólafur STEINGRÍMSSON a Halldor THORMAR, 2002. Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on Helicobacter pylori. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. **20**(4), 258-262 [cit. 2019-01-20]. DOI: 10.1016/S0924-8579(02)00205-4. ISSN 09248579. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857902002054>



BOTTONE, E. J., 2010. Bacillus cereus, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **23**(2), 382-398 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1128/CMR.00073-09. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00073-09>

BROOKE, J. S., 2012. Stenotrophomonas maltophilia: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **25**(1), 2-41 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1128/CMR.00019-11. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00019-11>

CROXATTO, Antony, Guy PROD'HOM a Gilbert GREUB, 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. **36**(2), 380-407 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>

DESBOIS, Andrew P. a Valerie J. SMITH, 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **85**(6), 1629-1642 [cit. 2018-12-10]. DOI: 10.1007/s00253-009-2355-3. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2355-3>

DOLEŽALOVÁ, Magda et al., 2010. Antimicrobial properties of 1-monoacylglycerols prepared from undecanoic (C11: 0) and undecenoic (C11. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. **112**(10), 1106-1114 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1002/ejlt.200900295. ISSN 14387697. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.200900295>

DRAELOS, Zoe Diana, 2010. Editorial Echoes: The biofilm. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. **9**(3), 167-168 [cit. 2018-12-07]. DOI: 10.1111/j.1473-2165.2010.00517.x. ISSN 14732130. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1473-2165.2010.00517.x>

EARL, Ashlee M., Richard LOSICK a Roberto KOLTER, 2008. Ecology and genomics of Bacillus subtilis. *Trends in Microbiology* [online]. **16**(6), 269-275 [cit. 2019-04-13]. DOI:

10.1016/j.tim.2008.03.004. ISSN 0966842X. Dostupné z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X08000887>

GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA, 2013. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*[online]. **133**(3), 1-4 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1038/jid.2013.1.

ISSN 0022202X. Dostupné z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1536139X>

GIOIA, Jason et al., 2007. Paradoxical DNA Repair and Peroxide Resistance Gene Conservation in *Bacillus pumilus* SAFR-032. *PLoS ONE* [online]. **2**(9) [cit. 2019-04-13]. DOI:

10.1371/journal.pone.0000928. ISSN 1932-6203. Dostupné z:

<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0000928>

GRANUM, Per Einar a Terje LUND, 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **157**(2), 223-228 [cit. 2019-04-13]. DOI:

10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776.x. ISSN 03781097. Dostupné z:

<https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776.x>

HAMPL, František a Jaroslav PALEČEK, 2002. *Farmakochemie*. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 80-7080-495-5.

HIGGINS, Douglas a Jonathan DWORKIN, 2012. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. **36**(1), 131-148 [cit. 2019-04-13]. DOI:

10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x. ISSN 1574-6976. Dostupné z:

<https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x>

HOLÁ, Veronika, 2012. Mikrobiální biofilmy 3. Biofilmová společenstva lidského těla a biofilmové infekce. *Živa*. (6), 271-275. Dostupné také z: <http://ziva.avcr.cz/2012-6/mikrobalni-biofilmy-3-biofilmova-spolecenstva-lidskeho-tela-a-biofilmove-infekce.html>

HOZA, Ignác a Daniela SUMCZYNSKI, 2005. *Potravinářská biochemie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. ISBN 978-80-7318-295-3.

HUANG, Chifu B. et al., 2011. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology* [online]. **56**(7), 650-654 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.01.011. ISSN 00039969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003996911000318>

IWATA, Hiroshi a Kunio SHIMADA, c2013. *Formulas, ingredients and production of cosmetics: technology of skin- and hair-care products in Japan*. New York: Springer. ISBN 4431540601.

JAMAL, Muhsin et al., 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association* [online]. **81**(1), 7-11 [cit. 2019-03-11]. DOI: 10.1016/j.jcma.2017.07.012. ISSN 17264901. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1726490117302587>

KIM, Yong-Guy et al., 2018. Herring Oil and Omega Fatty Acids Inhibit Staphylococcus aureus Biofilm Formation and Virulence. *Frontiers in Microbiology* [online]. **9** [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01241. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01241/full>

KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK, 2015. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7080-927-3.

LEE, Ji-Young, Yong-Suk KIM a Dong-Hwa SHIN, 2002. Antimicrobial Synergistic Effect of Linolenic Acid and Monoglyceride against Bacillus cereus and Staphylococcus aureus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **50**(7), 2193-2199 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1021/jf011175a. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf011175a>

LEE, Y. K., c2013. *Microbial biotechnology: principles and applications*. 3rd ed. New Jersey: World Scientific. ISBN 978-9814366823.

LEWIS, K., 2001. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **45**(4), 999-1007 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>

LI, Hui et al., 2018. Isolation and evaluation of endophytic *Bacillus tequilensis* GYLH001 with potential application for biological control of *Magnaporthe oryzae*. *PLOS ONE* [online]. **13**(10) [cit. 2019-04-13]. DOI: 10.1371/journal.pone.0203505. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0203505>

MACIA, M.D., E. ROJO-MOLINERO a A. OLIVER, 2014. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. **20**(10), 981-990 [cit. 2019-03-11]. DOI: 10.1111/1469-0691.12651. ISSN 1198743X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14653647>

MAROUNEK, M., E. SKŘIVANOVÁ a V. RADA, 2003. Susceptibility of *Escherichia coli* to C2-C18 fatty acids. *Folia Microbiologica* [online]. **48**(6), 731-735 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1007/BF02931506. ISSN 0015-5632. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02931506>

MATHUR, T et al., 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: An evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology* [online]. **24**(1) [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.4103/0255-0857.19890. ISSN 0255-0857. Dostupné z: <http://www.ijmm.org/text.asp?2006/24/1/25/19890>

MBANDI, Evelyne, Mary BRYWIG a Leora A SHELEF, 2004. Antilisterial effects of free fatty acids and monolaurin in beef emulsions and hot dogs. *Food Microbiology* [online]. **21**(6), 815-818 [cit. 2019-01-20]. DOI: 10.1016/j.fm.2003.12.005. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002003001254>

MURZYN, Anna et al., 2010. Capric Acid Secreted by *S. boulardii* Inhibits *C. albicans* Filamentous Growth, Adhesion and Biofilm Formation. *PLoS ONE* [online]. **5**(8) [cit.

2019-05-12]. DOI: 10.1371/journal.pone.0012050. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0012050>

NAIR, M.K.M. et al., 2005. Antibacterial Effect of Caprylic Acid and Monocaprylin on Major Bacterial Mastitis Pathogens. *Journal of Dairy Science* [online]. **88**(10), 3488-3495 [cit. 2018-12-27]. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(05)73033-2. ISSN 00220302. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030205730332>

NICOL, Marion et al., 2018. Unsaturated Fatty Acids Affect Quorum Sensing Communication System and Inhibit Motility and Biofilm Formation of *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **19**(1) [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.3390/ijms19010214. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/1/214>

NIELSEN, Christina K. et al., 2016. Effects of Tween 80 on Growth and Biofilm Formation in Laboratory Media. *Frontiers in Microbiology* [online]. **7** [cit. 2018-12-07]. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01878. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01878/full>

OUATTARA, Blaise et al., 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **37**(2-3), 155-162 [cit. 2019-05-19]. DOI: 10.1016/S0168-1605(97)00070-6. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160597000706>

P. DESBOIS, Andrew, 2012. Potential Applications of Antimicrobial Fatty Acids in Medicine, Agriculture and Other Industries. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* [online]. **7**(2), 111-122 [cit. 2019-05-12]. DOI: 10.2174/157489112801619728. ISSN 1574891X. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1574891X&volume=7&issue=2&spage=111>

PARSEK, Matthew R. a Pradeep K. SINGH, 2003. Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. *Annual Review of Microbiology* [online]. **57**(1), 677-701 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090720. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.57.030502.090720>

PARVEEN RANI, Rizwana et al., 2016. Purification of Antilisterial Peptide (Subtilosin A) from Novel *Bacillus tequilensis* FR9 and Demonstrate Their Pathogen Invasion Protection Ability Using Human Carcinoma Cell Line. *Frontiers in Microbiology* [online]. **7** [cit. 2019-04-13]. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01910. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01910/full>

PETSCHOW, B W, R P BATEMA a L L FORD, 1996. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium-chain monoglycerides and free fatty acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **40**(2), 302-306 [cit. 2018-12-28]. DOI: 10.1128/AAC.40.2.302. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.40.2.302>

PORTA, Angela R. a Edward ENNERS, 2012. Determining Annealing Temperatures for Polymerase Chain Reaction. *The American Biology Teacher* [online]. **74**(4), 256-260 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1525/abt.2012.74.4.9. ISSN 00027685. Dostupné z: <http://abt.ucpress.edu/cgi/doi/10.1525/abt.2012.74.4.9>

RAY, Bibek a Arun K BHUNIA, 2014. *Fundamental food microbiology*. Fifth edition. Boca Raton: CRS Press, Taylor & Francis Group, an informa business. ISBN 978-1-4665-6443-5.

ROGERS, Kara a Robert J. KADNER, 2018. Bacteria. *Encyklopaedia Britannica* [online]. Encyklopaedia Britannica [cit. 2019-01-26]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/bacteria>

ROSENBLATT, Joel, Ruth A. REITZEL a Issam RAAD, 2015. Caprylic Acid and Glycerol Trinitrate Combination for Eradication of Biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemo-*

*therapy* [online]. **59**(3), 1786-1788 [cit. 2019-05-19]. DOI: 10.1128/AAC.04561-14. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.04561-14>

ROSS, Rachel, 2019. What are bacteria?. *Live Science* [online]. [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: <https://www.livescience.com/51641-bacteria.html>

RULÍK, Martin a Veronika HOLÁ, 2012. Mikrobiální biofilmy 1. Všudypřítomný a přitom málo známý fenomén. *Živa* [online]. **60**(3), 104-106 [cit. 2018-12-07]. ISSN 0044-4812. Dostupné z: <http://ziva.avcr.cz/2012-3/mikrobialni-biofilmy-1-vsudypritomny-a-pritom-malo-znamy-fenomen.html>

RULÍK, Martin, 2011. *Mikrobiální biofilmy*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-2747-8.

RUSTAN, Arild C a Christian A DREVON, 2001. Fatty Acids: Structures and Properties. *Encyclopedia of Life Sciences* [online]. Chichester: John Wiley [cit. 2018-12-09]. DOI: 10.1038/npg.els.0003894. ISBN 0470016175. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0003894>

SCRIMGEOUR, Charlie, 2005. Chemistry of Fatty Acids. SHAHIDI, Fereidoon, ed. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley [cit. 2018-12-09]. DOI: 10.1002/047167849X.bio005. ISBN 047167849X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/047167849X.bio005>

SHI, Dongmei et al., 2016. Antifungal effects of undecylenic acid on the biofilm formation of *Candida albicans*. *Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* [online]. **54**(05), 343-353 [cit. 2018-12-10]. DOI: 10.5414/CP202460. ISSN 0946-1965. Dostupné z: [http://www.dustri.com/article\\_response\\_page.html?artId=14184&doi=10.5414/CP202460&L=0](http://www.dustri.com/article_response_page.html?artId=14184&doi=10.5414/CP202460&L=0)

SCHINDLER, Jiří, 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>

SCHLIEVERT, Patrick M., Marnie L. PETERSON a Gunnar F. KAUFMANN, 2012. Glycerol Monolaurate Antibacterial Activity in Broth and Biofilm Cultures. *PLoS ONE* [online]. 7(7) [cit. 2019-05-19]. DOI: 10.1371/journal.pone.0040350. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0040350>

SCHULTE, Simone, Jost WINGENDER a Hans-Curt FLEMMING, 2005. Fields of application: efficacy of biocides against biofilms. *Chemistry and materials science*. 10(5), 93-120.

SKRIVANOVA, E. et al., 2005. Susceptibility of Clostridium perfringens to C2-C18 fatty acids. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 41(1), 77-81 [cit. 2019-05-19]. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01709.x. ISSN 0266-8254. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2005.01709.x>

SKŘIVANOVÁ, Eva et al., 2006. Susceptibility of Escherichia coli, Salmonella sp. and Clostridium perfringens to organic acids and monolaurin. *Veterinární medicína* [online]. 51(3), 81-88 [cit. 2019-05-19]. Dostupné z: <http://vri.cz/docs/vetmed/51-3-81.pdf>

ŠKÁRKA, Bohumil a Miroslav FERENČÍK, 1987. *Biochémiá: Učebnica pre chemicko-technologické, prírodovedecké a lekárske fakulty*. 2. Přeprac. vyd. Bratislava: ALFA. ISBN (váz.).

THIBANE, Vuyisile S. et al., 2010. Effect of Marine Polyunsaturated Fatty Acids on Biofilm Formation of Candida albicans and Candida dubliniensis. *Marine Drugs* [online]. 8(10), 2597-2604 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.3390/md8102597. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/8/10/2597>

THORMAR, H., H. HILMARSSON a G. BERGSSON, 2006. Stable Concentrated Emulsions of the 1-Monoglyceride of Capric Acid (Monocaprin) with Microbicidal Acti-



vities against the Food-Borne Bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **72**(1), 522-526 [cit. 2019-01-20]. DOI: 10.1128/AEM.72.1.522-526.2006. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.1.522-526.2006>

THORMAR, Halldor, 2011. *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. Chichester, West Sussex: J. Wiley. ISBN 9780470976623.

TIWARI, Soni et al., 2014. Enhanced Production and Characterization of a Solvent Stable Amylase from Solvent Tolerant *Bacillus tequilensis* RG-01: Thermostable and Surfactant Resistant. *The Scientific World Journal* [online]. **2014**, 1-11 [cit. 2019-04-13]. DOI: 10.1155/2014/972763. ISSN 2356-6140. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/972763/>

ULLRICH, Ladislav, 1963. *Chémia a technológia jedlých tukov a olejov*. Bratislava: Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry. ISBN 63-025-63.

WANG, Lih-Ling a Eric A. JOHNSON, 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Fatty Acids and Monoglycerides. *Applied and environmental microbiology* [online]. 624-629 [cit. 2019-05-12].

YUAN, Yihui a Meiyong GAO, 2015. Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy. *Scientific Reports* [online]. **5**(1) [cit. 2019-04-13]. DOI: 10.1038/srep10259. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep10259>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

|           |  |
|-----------|--|
| BHI       | Mozkosrdcová infuze  |
| DHA       | Kyselina dokosahexaenová   |
| DNA       | Deoxyribonukleotidová kyselina   |
| EPA       | Kyselina eikosapentaenová  |
| EPS       | Extracelulární polymerní substance   |
| MAG       | Monoacylglycerol   |
| MALDI TOF | Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem |
| MIC       | Minimální inhibiční koncentrace  |
| MK        | Mastná kyselina  |
| MO        | Mikroorganismus  |
| O/V       | Olej ve vodě   |
| OD        | Optická denzita  |
| PCR       | Polymerázová řetězová reakce   |
| SDS       | Dodecylsírán sodný   |
| UV        | Ultrafialové záření  |

## SEZNAM OBRÁZKŮ

|  |    |
|--|----|
| Obr. 1. Vznik a struktura biofilmu (upraveno dle Schindler, 2001) .....  | 17 |
| Obr. 2. Zaočkování mikrotitrační destičky .....  | 36 |
| Obr. 3. Inhibiční účinky MK C <sub>8:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu <i>Bacillus tequilensis</i> ,<br><i>Bacillus subtilis</i> a <i>Bacillus pumilus</i> .....   | 38 |
| Obr. 4. Inhibiční účinky MK C <sub>8:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu <i>Stenotrophomonas</i><br><i>maltophilia</i> a růst <i>Bacillus cereus</i> .....           | 39 |
| Obr. 5. Inhibiční účinky MK C <sub>10:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu <i>Bacillus tequilensis</i> ,<br><i>Bacillus subtilis</i> a <i>Bacillus pumilus</i> .....  | 41 |
| Obr. 6. Inhibiční účinky MK C <sub>10:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu <i>Stenotrophomonas</i><br><i>maltophilia</i> a růst <i>Bacillus cereus</i> .....          | 42 |
| Obr. 7. Inhibiční účinky MK C <sub>12:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu <i>Bacillus tequilensis</i> ,<br><i>Bacillus subtilis</i> a <i>Bacillus pumilus</i> .....  | 44 |
| Obr. 8. Inhibiční účinky MK C <sub>12:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu <i>Stenotrophomonas</i><br><i>maltophilia</i> a růst <i>Bacillus cereus</i> .....          | 45 |
| Obr. 9. Inhibiční účinky MK C <sub>16:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu <i>Bacillus tequilensis</i> ,<br><i>Bacillus subtilis</i> a <i>Bacillus pumilus</i> .....  | 47 |
| Obr. 10. Inhibiční účinky MK C <sub>16:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu <i>Stenotrophomonas</i><br><i>maltophilia</i> a růst <i>Bacillus cereus</i> .....         | 48 |
| Obr. 11. Inhibiční účinky MK C <sub>18:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu <i>Bacillus tequilensis</i> ,<br><i>Bacillus subtilis</i> a <i>Bacillus pumilus</i> ..... | 50 |
| Obr. 12. Inhibiční účinky MK C <sub>18:0</sub> na růst a tvorbu biofilmu <i>Stenotrophomonas</i><br><i>maltophilia</i> a růst <i>Bacillus cereus</i> .....         | 51 |
| Obr. 13. Inhibiční účinky MK C <sub>11:1</sub> na růst a biofilm <i>Bacillus tequilensis</i> , <i>Bacillus</i><br><i>subtilis</i> a <i>Bacillus pumilus</i> .....  | 53 |
| Obr. 14. Inhibiční účinky MK C <sub>11:1</sub> na růst a tvorbu biofilmu <i>Stenotrophomonas</i><br><i>maltophilia</i> a růst <i>Bacillus cereus</i> .....         | 54 |

**SEZNAM TABULEK**

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Tab. 1. Chemikálie pro přípravu PCR reakční směsi .....</i>   | <i>33</i> |
| <i>Tab. 2. Nejvyšší dosažená skóre u identifikace pomocí MALDI TOF a nejvyšší<br/>dosažené shody sekvenace .....</i> | <i>34</i> |
| <i>Tab. 3. Množství MK potřebného pro přípravu roztoku MK v bujónu o dané<br/>koncentraci .....</i>                  | <i>35</i> |

